ГОСТ 25102—90

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СПОР МЕЗОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Издание официальное

ИПК ИЗДАТЕЛЬСТВО СТАНДАРТОВ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.12.04.576.8:006.354 Группа Н19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных бактерий

ГОСТ 25102—90

Milk and milk products.
Methods for determination of the spores content of mesophilic anaerobic bacteria.

МКС 07.100.30
67.100.10
ОКСТУ 9209

Дата введения 01.07.91

Настоящий стандарт распространяется на сырое и подвергнутое тепловой обработке молоко, сыры и устанавливает методы определения в них содержания спор мезофильных анаэробных бактерий.

Методы основаны на высеве определенного количества прогретых при температуре (75±1) °С в течение (30±3) мин проб молока или сыра в плотные или жидкие питательные среды, культивировании посевов в течение 72 ч при температуре (37±1) °С, регистрации видимых признаков роста микроорганизмов, определении их наиболее вероятного числа.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 13928, ГОСТ 9225, ГОСТ 26809.

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА СПОР МЕЗОФИЛЬНЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Метод основан на способности мезофильных анаэробных бактерий, содержащихся в образцах молока и сыра, размножаться и давать видимые признаки роста в питательных средах.

2.1. Аппаратура, материалы, реактивы

Анализатор потенциометрический, класс точности 1,5 по ГОСТ 19881.

Баня водяная.

Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и пределом допускаемой погрешности ±15 мг по ГОСТ 24104*.

Весы для статического взвешивания среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 10 кг по ГОСТ 29329.

Допускается применение других весов с метрологическими характеристиками не ниже указанных.

Воронки лабораторные по ГОСТ 25336.

Кастрюли разные по ГОСТ 17151.

Колбы плоскодонные исполнения 1 или 2, вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-го или 2-го классов точности исполнения 1, вместимостью 1,2 $см^3$, исполнения 4, 5, 6, 7, вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ по ГОСТ 29169.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Пробирки типов П1, П2 диаметром 16 мм, высотой 150 мм и диаметром 21 мм, высотой 200 мм по ГОСТ 25336.

Пробки корковые по ГОСТ 5541.

Пробки резиновые конусные по ТУ 38 1051835.

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001.

Секундомер механический и часы по нормативно-технической документации.

Скальпели и ножи медицинские по ГОСТ 21240.

Спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 25336 или горелки газовые.

Стаканчики для взвешивания типов СВ и СН по ГОСТ 25336.

Стерилизатор воздушный по ГОСТ 22649.

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569* или аналогичный стерилизатор, обеспечивающий требуемые технологические режимы.

Термометры стеклянные жидкостные (нертутные) с диапазоном измерения 0—100 °С и ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

Термостат, позволяющий поддерживать температуру от 25 до 55 °С с отклонением от заданной температуры ±1 °С.

Цилиндры исполнения 1 или 2, вместимостью 10, 25, 100 и 1000 см³ по ГОСТ 1770.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Шпатели.

Штатив для пробирок.

Автолизат дрожжевой сухой по ТУ 6–09—3979.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода питьевая по ГОСТ 2874**.

Глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975.

Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171.

Крахмал растворимый по ГОСТ 10163.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 10970.

Среда агаровая модифицированная для определения споровых анаэробных бактерий в молоке и молочных продуктах по ТУ 49 513.

Кислота аскорбиновая пищевая по ГФ СССР, X, ст. 6.

Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199, ч. д. а.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, ч. д. а.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

Панкреатин медицинский активностью 50 ед. в 1 г по ТУ 49.619.

Хлороформ технический по ГОСТ 20015.

Цистеин солянокислый по ТУ 6–09—3251.

2.2. Подготовка к анализу

2.2.1. Подготовка аппаратуры и материалов — по ГОСТ 9225.

2.2.2. *Приготовление сред*

2.2.2.1. *Приготовление раствора хлористого натрия*

В 1 дм³ питьевой воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, затем раствор разливают в чистые стеклянные пробирки диаметром 21 мм по 10 см³, а в колбы по 93 см³, емкости закрывают ватной пробкой и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин. После стерилизации должно остаться в пробирках около 9 см³, а в колбах около 90 см³ раствора хлористого натрия.

2.2.2.2. *Приготовление дрожжевого автолизата*

1 кг хлебопекарных дрожжей разводят в 1 дм³ питьевой воды и помещают в термостат при температуре (55±1) °С на 72 ч. Полученную суспензию переносят в стерилизатор и выдерживают при температуре (115±2) °С 15 мин. Автолизат фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Осадок промывают таким количеством питьевой воды, чтобы общее количество фильтрата составило 4 дм³.

Фильтрат нейтрализуют раствором с массовой долей гидроокиси натрия 20% до pH (6,8±0,1), разливают в пробирки диаметром 21 мм по (32±3) см³, закрывают ватной пробкой и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

2.2.2.3. *Приготовление гидролизованного молока*

Готовят восстановленное обезжиренное молоко с массовой долей сухих веществ 10%, для чего 100 г сухого обезжиренного молока растворяют в 900 см³ подогретой до температуры (45±1) °С дис-

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51935—2002.

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51232—98.

тиллированной воды. pH (7,6±0,2) восстановленного обезжиренного молока, подогретого до температуры (45±1) °С, устанавливают раствором с массовой долей гидроокиси натрия 20%. К подготовленному молоку добавляют от 0,5 до 1,0 г панкреатина, предварительно разведенного в 20—30 см³ дистиллированной воды температурой (45±1) °С. Через 3—5 мин к молоку с панкреатином добавляют 5 см³ хлороформа. Колбу закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате при температуре (40±1) °С в течение 18—24 ч. В течение первых 3 ч молоко несколько раз перемешивают (пробку после встряхивания приоткрывают для удаления паров хлороформа). Через указанное время колбу вынимают из термостата, гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят питьевой водой, добавляя к 1 части гидролизованного молока 2 части воды, устанавливают pH (7,1±0,1) и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

2.2.2.4. *Приготовление питательной среды для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий*

К 1 дм³ дистиллированной воды добавляют (40,0±0,5) г модифицированной агаровой среды для определения споровых анаэробных бактерий. Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара (при наличии осадка фильтруют через ватно-марлевый фильтр), устанавливают pH (7,1±0,1). Разливают в пробирки по (10±2) см³, закрывают ватными или ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

Допускается приготовление среды для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий из отдельных ингредиентов. Для этого в 1 дм³ гидролизованного молока, приготовленного по п. 2.2.2.3, вносят 15 г микробиологического агара, 0,5 г солянокислого цистеина или 1,0 г аскорбиновой кислоты, 1,0 г растворимого крахмала и 5,0 г уксуснокислого натрия. Растворяют добавленные компоненты, нагревая смесь в текучем пару. Добавляют 5,0 г глюкозы и 20 см³ дрожжевого автолизата, приготовленного по п. 2.2.2.2, или 4,0 г сухого дрожжевого автолизата. Устанавливают pH (7,1±0,1), разливают среду в пробирки по (10±2) см³, закрывают ватными или ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при температуре (115±2) °С в течение (20±5) мин.

При длительном хранении среды (более 20 сут) после охлаждения пробирок со средой ватные пробки в стерильных условиях заменяют на стерильные резиновые.

Приготовленную среду хранят в темном месте при температуре (8±2) °С не более 3 мес.

2.2.2.5. *Приготовление водного агара*

В 1 дм³ питьевой воды вносят 15 г мелко измельченного агара и нагревают до кипения. После расплавления агара раствор в горячем состоянии фильтруют через ватный фильтр, разливают в пробирки по 15 см³ или в колбы по 50—100 см³, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

2.2.3. *Подготовка образцов молока и сыра к анализу*

2.2.3.1. Образцы молока по 15 см³ переносят пипеткой в стерильные пробирки, которые закрывают ватными пробками. При этом необходимо следить, чтобы капельки молока не оставались на стенках пробирок.

Подготовленные пробирки с исследуемыми образцами молока вместе с контрольной пробиркой, в которой находятся 10 см³ молока и термометр, помещают в водяную баню (уровень воды в водяной бане должен быть выше уровня молока на 10—15 мм) и выдерживают при температуре (75±1) °С в течение (30±3) мин, затем быстро охлаждают до комнатной температуры, погружая их в холодную воду.

В зависимости от обсемененности исследуемого молока спорами мезофильных анаэробных бактерий из прогретых проб готовят десятикратные разведения в растворе хлористого натрия, приготовленном по п. 2.2.2.1, по ГОСТ 9225.

2.2.3.2. Подготовка проб сыра к анализу и приготовление разведений продукта для посева — по ГОСТ 9225.

Подготовленные пробирки с разведениями проб сыра вместе с контрольной пробиркой, в которой находятся термометр и 10 см³ раствора хлористого натрия, приготовленного по п. 2.2.2.1, помещают в водяную баню и выдерживают по режимам, указанным в п. 2.2.3.1.

2.3. Проведение анализа

Для определения количества спор мезофильных анаэробных бактерий в молоке и сырах проводят посев 1 см³ исследуемого образца (для молока — нулевое, первое и второе, а для сыра — первое и второе разведения) в пробирку с (10±2) см³ питьевой среды, приготовленной по п. 2.2.2.4, выдержанной перед анализом в кипящей водяной бане в течение 30 мин и охлажденной до температуры (40±1) °С.

Каждый образец исследуемых молока и сыра выбранных разведений засевают в две пробирки с питательной средой, внося посевной материал на дно пробирки, не допуская взбалтывания среды и не выдувая посевной материал.

Сверху посевы заливают слоем предварительно расплавленного и охлажденного до температуры (45±1) °С водного агара, приготовленного по п. 2.2.2.5. Высота слоя водного агара должна быть не менее (20±5) мм.

Пробирки с посевом помещают в термостат при температуре (37±1) °С на 72 ч.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Наличие спор мезофильных анаэробных бактерий в засеянных объемах исследуемого образца молока или сыра определяют по появлению разрывов агарового столбика, образуемых при росте этих бактерий газами.

2.4.2. Наиболее вероятное число спор мезофильных анаэробных бактерий при анализе молока определяют по числу пробирок, в которых они дали рост (см. таблицу).

Наиболее вероятное число спор мезофильных анаэробных бактерий при анализе сыра определяют по числу пробирок, в которых они дали рост с посевом 0,1 и 0,01 $см^3$ (см. таблицу).

Количество пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 $см^3$, шт.	Количество пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 $см^3$, шт.
1 $см^3$	0,1 $см^3$	0,01 $см^3$		1 $см^3$	0,1 $см^3$	0,01 $см^3$	
0	0	0	0,0	1	1	2	—
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	—	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	—
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	—	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	—
0	2	1	—	2	1	0	6,0
0	2	2	—	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	—	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0
1	1	1	2,0				и более

Результаты, в которых количество пробирок с видимыми признаками роста мезофильных анаэробных бактерий при посевах 1; 0,1 и 0,01 $см^3$ молока или сыра соответственно равно 002, 012, 021, 022, 102, 112, 122, 202, не могут быть использованы для расчета, так как в 95 % случаев они вызваны несовершенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. В данных случаях исследования повторяют.

3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СПОР МЕЗОФИЛЬНЫХ ЛАКТАТСБРАЖИВАЮЩИХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Метод основан на способности мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий, содержащихся в образцах молока и сыра, размножаться и давать характерные видимые признаки роста в селективных питательных средах.

3.1. Аппаратура, материалы, реактивы — по п. 2.1 с дополнениями, указанными ниже.

Мясорубка по ГОСТ 4025.

Мясо говяжье.

Гидролизат казеина.

Железо треххлористое 6-водное по ГОСТ 4147, ч. д. а.

Индикатор нейтральный красный (нейтральрот) по ТУ 6—09—4120.

Кальций молочнокислый по ТУ 6—09—3839.

Кислота молочная пищевая по ГОСТ 490.

Натрий тетраборнокислый 10-водный по ГОСТ 4199, ч. д. а.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, ч. д. а.

Пептон бактериологический по ГОСТ 13805.

Среда сухая лактатно-ацетатная для селективного учета анаэробов (ЛАССА-Углич) по ТУ 49 1039.

3.2. Подготовка к анализу

3.2.1. Подготовка аппаратуры и материалов — по ГОСТ 9225.

3.2.2. *Приготовление сред*

3.2.2.1. Раствор хлористого натрия, дрожжевой автолизат и водный агар готовят по пп. 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.2.5.

3.2.2.2. Приготовление мясопептонного бульона

Говяжье мясо, освобожденное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, взвешивают, складывают в кастрюлю; заливают двойным количеством питьевой воды, отмечают первоначальный объем и оставляют на 18—24 ч при температуре (5±1) °С. После этого для ускорения процесса экстракции питательных веществ из мяса содержимое кастрюли подогревают до температуры (50±5) °С и выдерживают в течение 60 мин и затем кипятят 30—40 мин. После кипячения бульон в горячем состоянии фильтруют через двойной бумажный фильтр. Фильтрат доводят питьевой водой до первоначального объема, добавляют к нему (1,0±0,1) % массовой доли бактериологического пептона и (0,5±0,1) % массовой доли хлористого натрия и устанавливают с помощью раствора с массовой долей гидроокиси натрия 20% pH (7,3±0,1). Подготовленный бульон стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

3.2.2.3. *Приготовление питательной среды для определения количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий*

К 1 дм^3 питьевой воды добавляют (50,0±0,5) г сухой лактатноацетатной среды для селективного учета анаэробов. Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара и кипятят (4±1) мин, не допуская пригорания. Полученную среду в горячем состоянии фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по (10±2) см^3, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

Допускается приготовление питательной среды ЛАССА-Углич из отдельных ингредиентов. Для этого к 900 см^3 мясопептонного бульона, приготовленного по п. 3.2.2.2, добавляют 5 г молочнокислого кальция, 5 г уксуснокислого натрия, 0,8 г солянокислого цистеина или 1,0 г аскорбиновой кислоты, 40 см^3 дрожжевого автолизата, приготовленного по п. 2.2.2.2, или 4 г сухого дрожжевого автолизата и 20 г агара. Смесь нагревают до температуры (95±2) °С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агара и добавляют по 10 см^3 водных растворов с массовой долей треххлористого железа и тетраборнокислого натрия 0,01 %, 10 см^3 водного раствора с массовой долей кислого углекислого натрия 1 % и 1 см^3 водного раствора с массовой долей индикатора нейтрального красного 0,4 %. С помощью водного раствора с массовой долей молочной кислоты 20 % доводят pH (5,70±0,05). Приготовленную среду разливают в пробирки по (10±2) см^3, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (115±2) °С в течение (20±5) мин. Затем ватные пробки в стерильных условиях заменяют на стерильные резиновые.

Готовая среда должна иметь интенсивно розовый или красный цвет.

Допускается замена мясопептонного бульона гидролизатом казеина и пептоном. Для этого к 1 дм^3 гидролизата казеина добавляют 10 г пептона, устанавливают pH (7,0±0,1), нагревают до кипения, фильтруют через бумажный фильтр в чистые колбы и стерилизуют при температуре (121±2) °С в течение (20±5) мин.

3.3. Проведение анализа

3.3.1. Подготовку образцов проводят по п. 2.2.3.

3.3.2. Посев образцов проводят по п. 2.2.3, используя лактатноацетатную питательную среду для селективного учета анаэробов.

Культивирование посевов проводят в термостате при температуре (37±1) °С в течение 72 ч.

3.4. Обработка результатов

3.4.1. Рост мезофильных лактатсбраживающих анаэробных спорообразующих бактерий в посевах определяют по образованию разрывов столбика агара и изменению цвета питательной среды с красного до соломенно-желтого.

3.4.2. Определение наиболее вероятного числа спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий проводят по п. 2.4.2.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Научно-производственным объединением маслодельной и сыродельной промышленности «Углич»

РАЗРАБОТЧИКИ

Ю. Я. Свириденко, канд. биол. наук; **Н. И. Кречман,** канд. техн. наук; **Г. Д. Перфильев,** канд. биол. наук; **Л. С. Матевосян**

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 12.06.90 № 1510

3. ВЗАМЕН ГОСТ 25102—82

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 171—81	2.1	ГОСТ 14919—83	2.1
ГОСТ 199—78	2.1	ГОСТ 17151—81	2.1
ГОСТ 490—79	3.1	ГОСТ 17206—96	2.1
ГОСТ 975—88	2.1	ГОСТ 19569—89	2.1
ГОСТ 1770—74	2.1	ГОСТ 19881—74	2.1
ГОСТ 2874—82	2.1	ГОСТ 20015—88	2.1
ГОСТ 4025—95	3.1	ГОСТ 21240—89	2.1
ГОСТ 4147—74	3.1	ГОСТ 22649—83	2.1
ГОСТ 4199—76	3.1	ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 4201—79	3.1	ГОСТ 25336—82	2.1
ГОСТ 4233—77	2.1	ГОСТ 26809—86	1.1
ГОСТ 4328—77	2.1	ГОСТ 28498—90	2.1
ГОСТ 5541—2002	2.1	ГОСТ 29169—91	2.1
ГОСТ 5556—81	2.1	ГОСТ 29329—92	2.1
ГОСТ 6709—72	2.1	ТУ 6—09—3251—73	2.1
ГОСТ 9225—84	1.1, 2.2.1, 2.2.3.1, 2.2.3.2, 3.2.1	ТУ 6—09—3839—74	3.1
		ТУ 6—09—3979—75	2.1
ГОСТ 9412—93	2.1	ТУ 6—09—4120—75	3.1
ГОСТ 10163—76	2.1	ТУ 38 1051835—88	2.1
ГОСТ 10970—87	2.1	ТУ 49 513—83	2.1
ГОСТ 12026—76	2.1	ТУ 49.619—79	2.1
ГОСТ 13805—76	3.1	ТУ 49 1039—84	3.1
ГОСТ 13928—84	1.1	ГФ СССР X ст. 6	2.1

5. Ограничение срока действия снято по протоколу № 5—94 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12—94)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Февраль 2003 г.

Редактор *Т.П. Шашина*
Технический редактор *О.Н. Власова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *С.В. Рябовой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Подписано в печать 03.04.2003. Усл.печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 0,80.
Тираж 136 экз. С 10316. Зак. 344.

ИПК Издательство стандартов, 107076 Москва, Колодезный пер., 14.
http://www.standards.ru e-mail: info@standards.ru
Набрано в Калужской типографии стандартов на ПЭВМ.
Филиал ИПК Издательство стандартов – тип. "Московский печатник", 105062 Москва, Лялин пер., 6.
Плр № 080102

gost.e-ecolog.ru