ГОСТ 26972—86

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЗЕРНО, КРУПА, МУКА, ТОЛОКНО ДЛЯ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Издание официальное

ИПК ИЗДАТЕЛЬСТВО СТАНДАРТОВ
Москва

gost.e-ecolog.ru

УДК 664.742.543.9:006.354 Группа Н39

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЗЕРНО, КРУПА, МУКА, ТОЛОКНО ДЛЯ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Методы микробиологического анализа

ГОСТ 26972—86

Corn, groats, flour and oatmeal for children's food.
Methods of microbiological analysis

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9209

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 20.08.86 № 2439 дата введения установлена 01.07.87

Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 4—94)

Настоящий стандарт распространяется на зерно риса, овса, гречихи и вырабатываемые из него крупу, муку и толокно, используемые для производства продуктов детского питания, а также на пищевые концентраты, содержащие эти компоненты, и устанавливает методы определения:

общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;

бактерий группы кишечных палочек;

количества плесневых грибов и дрожжей.

Термины, используемые в стандарте, и пояснения к ним указаны в приложении 4.

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Общие правила отбора проб — по нормативно-технической документации.

1.2. Пробы продуктов для микробиологического анализа отбирают до отбора проб для физико-химических и органолептических анализов.

1.3. Пробы для микробиологических анализов отбирают стерильным инструментом (пробоотборником, ложкой) в стерильную посуду (колбу, банку) или стерильную бумагу (пакет) способом, исключающим вторичное микробное загрязнение продукта.

1.4. Отбор проб для микробиологического анализа

1.4.1. От каждой упаковочной единицы, попавшей в выборку в потребительской таре, массой нетто до 1000 г отбирают для анализа пробу массой, равной массе упаковочной единицы продукции.

1.4.2. От каждой упаковочной единицы, попавшей в выборку в потребительской таре массой нетто более 1000 г, отбирают для анализа объединенную пробу массой (200 ± 10) г путем взятия нескольких точечных проб продукта из разных мест упаковки.

1.4.3. От каждой упаковочной единицы, попавшей в выборку в мешках, отбирают для анализа объединенную пробу массой (200 ± 10) г путем взятия нескольких точечных проб продукта из разных мест тары.

1.4.4. От продукции, транспортируемой в специальных транспортных средствах, отбирают для анализа пять объединенных проб каждая массой (200 ± 10) г путем взятия нескольких точечных проб продукта из разных мест транспортного средства.

1.4.5. Пробу продукта, отобранную для анализа, снабжают этикеткой, в которой указывают:

наименование предприятия-изготовителя;

наименование и сорт продукта (при наличии сортов);

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

Переиздание. Май 2003 г.

© Издательство стандартов, 1986
© ИПК Издательство стандартов, 2003

вид упаковки (тары);
дату выработки;
номер и объем партии;
номер пробы;
результаты органолептического анализа;
обнаруженные дефекты упаковки (тары) и (или) продукта;
обозначение нормативно-технической документации, по которой вырабатывалась контролируемая партия продукта;
фамилию, имя и отчество лица, отбиравшего пробу.

1.5. Пробы продуктов, отобранные для микробиологического анализа, упаковывают в бумагу, фольгу или помещают в тару и транспортируют в лабораторию в условиях, исключающих повреждение упаковки и загрязнение продукта.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

2.1. Для проведения микробиологического анализа применяют:
стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569—89* или аналогичные стерилизаторы, обеспечивающие необходимые режимы и допуски;
баню водяную с терморегулятором, позволяющим поддерживать температуру от 20 до 100 °С с погрешностью ± 2 °С;
весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—88**;
весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г по ГОСТ 24104—88;
дистиллятор электрический марки Д № 9 или дистиллятор с аналогичными техническими характеристиками;
микроскоп биологический, обеспечивающий увеличение от 56 до 1350$^{\times}$ по НТД;
анализатор потенциометрический для контроля pH, диапазон измерения pH 3—8, погрешность измерения pH ± 0,05 по ГОСТ 19881—74;
термостаты, позволяющие поддерживать температуру в пределах от 24 до 37 °С с погрешностью от заданной температуры ± 1 °С;
холодильник бытовой по ГОСТ 16317—87;
шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 190 °С, с терморегулятором;
рефрактометр лабораторный по НТД;
воронки стеклянные по ГОСТ 25336—82;
капельницы вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 25336—82;
кастрюли эмалированные разной вместимостью по ГОСТ 17151—81;
колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости по ГОСТ 25336—82;
кюветы разные для окрашивания препаратов;
лупу складную карманную с увеличением 4 и 7$^{\times}$ по ГОСТ 25706—83;
ножи и скальпели медицинские по ГОСТ 21240—89;
ножницы медицинские по ГОСТ 21239—93;
часы песочные или часы сигнальные по НТД;
пипетки пастеровские;
пипетки исполнения 1; 4; 5; 6; 7; 1 и 2 классов точности, вместимостью 1; 2; 5 и 10 см^3 по ГОСТ 29169—91, ГОСТ 29227-91 — ГОСТ 29229-91;
пинцеты по ГОСТ 21241—89;
поплавки (трубки стеклянные);
пробки разные;
пробирки типов П1 и П2 разной вместимости по ГОСТ 25336—82;
пробоотборник;
промывалку;
спиртовку по ГОСТ 25336—82 или газовую горелку;
стекла покровные по ГОСТ 6672—75;

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51935—2002.
** С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001 (здесь и далее).

стекла предметные по ГОСТ 9284—75;
ступки фарфоровые с пестиками по ГОСТ 9147—80;
термометры стеклянные жидкостные (нертутные), с диапазоном измерения от 0 до 100 °С с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498—90;
флаконы вместимостью 100, 200, 500 $см^3$;
чашки Петри бактериологические по ГОСТ 25336—82;
шпатели металлические;
шпатели стеклянные;
штативы для пробирок;
палочки стеклянные по ГОССТ 25336—82;
пеналы металлические;
бумагу оберточную по ГОСТ 8273—75;
бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026—76;
фильтры бумажные;
бумагу универсальную индикаторную;
вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556—81;
марлю медицинскую по ГОСТ 9412—93;
масло иммерсионное по ГОСТ 13739—78;
мыло;
пергамент по ГОСТ 1341—97;
петлю бактериологическую;
порошки стиральные, кроме «Лотоса»;
агар микробиологический по ГОСТ 17206—96;
агар сухой питательный;
бриллиантовый зеленый;
метиленовый синий;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;
воду питьевую по ГОСТ 2874—82*;
генциан виолет;
гидролизат панкреатический (энзиматический) казеиновый;
глюкозу по ГОСТ 6038—79;
дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171—81 или дрожжевой экстракт сухой;
желчь крупного рогатого скота сухая или жидкая, или ее соли;
йод кристаллический по ГОСТ 4159—79;
калия гидроокись по ГОСТ 24363—80, раствор массовой концентрацией 0,01 $г/см^3$;
калий йодистый по ГОСТ 4232—74;
кристалл виолет;
кислоту лимонную пищевую по ГОСТ 908—79;
кислоту соляную по ГОСТ 3118—77;
лактозу ч.д.а.;
левомицетин (хлорамфеникол), пенициллин, стрептомицин;
натрия гидроокись, раствор массовой концентрацией 0,1 $г/см^3$;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
натрий сернистокислый по ТУ 6—09—5313—86, раствор массовой концентрацией 0,1 $г/см^3$;
нейтральный красный;
пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805—76;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67**;
спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300—87;
среда сухая Кесслер;
среда сухая КОДА;
среда сухая Эндо;
солод ячменный;
фуксин основной;
фенол по ТУ 6—09—5303—86;
хлороформ по ГОСТ 20015—88.

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51232—98.
** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000.

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Подготовка посуды и материалов

3.1.1. Посуду, предназначенную для микробиологического анализа, моют, а новую — дополнительно кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты объемной долей 1—2 %) в течение 15 мин, затем ополаскивают дистиллированной водой и стерилизуют.

Посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 160—165 °С в течение 2 ч или в стерилизаторе при температуре (121 ± 2) С в течение 30 мин с последующим подсушиванием.

Чашки Петри, пипетки стерилизуют завернутыми в бумагу или в металлических пеналах. В конец пипетки предварительно вкладывают кусочек ваты. Резиновые пробки стерилизуют в стерилизаторе, завернутыми в бумагу.

Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах.

3.1.2. Посуду, инструменты и материалы, соприкасающиеся с продуктом во время отбора проб, стерилизуют одним из способов:

насыщенным паром в стерилизаторе при температуре (121 ± 2) °С 30 мин;

горячим воздухом в сушильном шкафу при температуре 180—185 °С 15 мин или температуре 160—165 °С 120 мин;

обработкой путем погружения в этиловый спирт с последующим фламбированием.

3.2. Приготовление растворов и питательных сред

3.2.1. Для приготовления растворов и питательных сред применяют дистиллированную воду по ГОСТ 6709—72, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч» и «ч.д.а».

3.2.2. Необходимое значение pH растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия массовой концентрации 0,1 г/см^3 или раствора соляной кислоты объемной долей 10 %.

pH растворов и питательных сред определяют с помощью потенциометрического анализатора по прилагаемой к нему инструкции.

Ориентировочное определение pH растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

3.2.3. Приготовление пептонно-солевого раствора (см. приложение 1 п. 1)

0,85 г хлористого натрия и 0,1 пептона растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды при медленном нагревании, при необходимости фильтруют через бумажной фильтр, устанавливают pH (7,0 ± 0,1); разливают в колбы, пробирки и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение 30 мин. Хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 7 сут.

Применяют для приготовления разведений.

3.2.4. Приготовление карболового раствора генциана виолета (см. приложение 1 п. 2)

1 г генциан виолета, 10 см^3 спирта этилового ректификованного, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 см^3 дистиллированной воды.

Применяют для окраски препаратов по Граму.

3.2.5. Приготовление раствора Люголя (см. приложение 1 п. 3)

1 г кристаллического йода, 2 г йодистого калия растворяют в 300 см^3 дистиллированной воды. Хранят во флаконах из темного стекла.

Применяют для окраски препаратов по Граму.

3.2.6. Приготовление фуксина Циля (см. приложение 1 п. 4)

1 г основного фуксина, 10 г этилового ректификованного спирта, 5 г фенола растирают в ступке, добавляя 100 см^3 дистиллированной воды.

Применяют для окраски препаратов по Граму.

3.2.7. Приготовление раствора фуксина по Пфейфферу (см. приложение 1 п. 5)

К 1 см^3 карболового фуксина Циля приливают 9 см^3 дистиллированной воды. Раствор очень нестойкий. Готовят в небольших количествах непосредственно перед использованием.

Применяют для окраски дрожжей.

3.2.8. Приготовление раствора метиленового синего до Леффлеру (см. приложение 1 п. 6)

30 см^3 насыщенного спиртового раствора метиленового синего (8—9 г метиленового синего в 100 см^3 этилового спирта), профильтрованного через бумажный фильтр, и 1 см^3 раствора гидроокиси калия массовой концентрации 0,01 г/см^3 прибавляют к 100 см^3 дистиллированной воды. Растворяют и хранят в темной посуде при температуре (6 ± 2) °С не более 30 сут.

Применяют для окраски дрожжей.

3.2.9. Приготовление раствора кристалл виолета массовой концентрацией 0,01 г/см^3 (см. приложение 1 п. 7)

В 80 см^3 подогретой до 60 °С дистиллированной воды растворяют 1 г кристалл виолета при постоянном встряхивании в мерном сосуде с притертой пробкой. После охлаждения раствора до температуры (45 ± 5) °С объем доводят до 100 см^3. Из этого основного раствора готовят рабочий раствор путем разведения дистиллированной водой в соотношении 1 : 9. Раствор хранят в темном закрытом флаконе при комнатной температуре не более 3 мес. Добавляют в питательные среды для выявления бактерий группы кишечных палочек.

3.2.10. Приготовление спиртового раствора нейтрального красного массовой концентрацией 0,01 г/см^3 (см. приложение 1 п. 8).

В 100 см^3 этилового ректификованного спирта растворяют 1 г кристаллического нейтрального красного при постоянном встряхивании. Раствор хранят в закрытом сосуде при постоянной температуре (комнатной) не более 3 мес.

Добавляют в питательные среды для выявления бактерий группы кишечных палочек.

3.2.11. Приготовление водного раствора бриллиантового зеленого массовой концентрацией 0,005 г/см^3 (см. приложение 1 п. 9)

0,5 г бриллиантового зеленого растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре не более 3 мес. Добавляют в питательные среды для выявления бактерий группы кишечных палочек.

3.2.12. Приготовление раствора лимонной кислоты (см. приложение 1 п. 10)

20 г лимонной кислоты переносят в мерную колбу, доводя дистиллированной водой объем до 100 см^3, растворяют, разливают в пробирки (колбы) и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение 20 мин.

Применяют для подкисления питательных сред.

3.2.13. Приготовление дрожжевого экстракта

100 г пекарских прессованных дрожжей нарезают небольшими кусочками и заливают 500 см^3 воды, подобрав посуду для приготовления экстракта с учетом того, чтобы смесь занимала $^1/_5$ вместимости.

Смесь ставят в термостат (сушильный шкаф) при температуре от 58 до 60 °С на 2 сут и встряхивают 1—2 раза в сутки. Конец автолиза устанавливают по полному разжижению дрожжей. Экстракт должен иметь коричневый оттенок и приятный запах.

5 см^3 жидкого дрожжевого экстракта равноценны 1 г дрожжевого экстракта в порошке. Хранят в стеклянной посуде из темного стекла с добавлением 8—10 см^3 хлороформа.

Добавляют в качестве компонента для питательных сред как источник веществ, способствующих регенерации поврежденных микроорганизмов.

Хранят не более 14 сут.

3.2.14. Приготовление среды из сухого питательного агара с дрожжевым экстрактом и глюкозой (см. приложение 1 п. 11)

30—35 г СПА, 2,5 сухого или 12,5 см^3 жидкого дрожжевого экстракта, 1 г глюкозы растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды путем нагревания до полного растворения всех компонентов, фильтруют через вату, охлаждают до (50 ± 5) °С и устанавливают pH (6,9 ± 0,1), разливают в колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение 15 мин.

Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

3.2.15. Приготовление глюкозного агара с гидролизатом казеина и с дрожжевым экстрактом (см. приложение 1 п. 12)

В 1000 см^3 дистиллированной воды растворяют 5 г панкреатического (энзиматического) казеинового гидролизата, 2,5 сухого или 12,5 см^3 жидкого дрожжевого экстракта, 1 г глюкозы и 15 г агара, смесь периодически помешивая, нагревают до кипения и кипятят до полного растворения всех компонентов, охлаждают до (50 ± 5) °С и устанавливают pH (7,3 ± 0,1). Среду разливают в колбы или флаконы, стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение15 мин. Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

3.2.16. Приготовление среды Кесслер-Свенартон (см. приложение 1 п. 13)

10 г пептона, 50 см^3 жидкой или 5 г сухой желчи, 1000 см^3 дистиллированной воды кипятят 20—30 мин, фильтруют через вату, добавляют 10 г лактозы и доводят объем до 1000 см^3, устанавливают pH 7,4—7,6, добавляют 4 см^3 раствора кристалл виолета. Среду разливают в пробирки с поплавками по 9 см^3 и стерилизуют при температуре (115 ± 2) °С в течение 20 мин. Среда имеет фиолетовый цвет. Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

Допускается использовать сухую среду Кесслер промышленного изготовления с добавлением 7,5 г лактозы.

3.2.17. Приготовление среды КОДА (из сухой)

43 г сухой среды КОДА тщательно размешивают в колбе с 1000 $см^3$ дистиллированной холодной воды, нагревают на слабом огне до кипения и кипятят 2—3 мин, устанавливают pH 7,5—8,0; разливают в стерильные пробирки с поплавками по 9 $см^3$. Дополнительный стерилизации не требуется. Готовая среда имеет сине-фиолетовый цвет. Среда КОДА должна быть свежеприготовленной.

3.2.18. Приготовление лактозного бульона с бриллиантовым зеленым и желчью (БЛБЗЖ), (см. приложение 1 п. 14)

В 1000 $см^3$ дистиллированной воды вносят 10 г пептона, 10 г лактозы, 20 г сухой или 200 $см^3$ жидкой желчи, 2,66 $см^3$ водного раствора бриллиантового зеленого, нагревают до полного растворения компонентов, охлаждают до (50 ± 5) °С и устанавливают pH (7,2 ± 0,1). Среду разливают по 9 $см^3$ в пробирки с поплавками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение 15 мин. Если после стерилизации в поплавках остался воздух, среду не используют. Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

3.2.19. Изготовление среды Эндо (из сухой)

50 г сухой среды Эндо помещают в колбу с 1000 $см^3$ дистиллированной воды и размешивают. Кипятят на слабом огне до полного расплавления агара, не допуская пригорания. Фильтруют и вновь доводят до кипения. Охлаждают, разливают в стерильные чашки Петри, после застывания подсушивают.

Среда Эндо должна быть свежеприготовленной.

Допускается приготовление среды Эндо из отдельных компонентов. Для этого к 100 $см^3$ готового питательного агара pH (7,7 ± 0,1), соблюдая правила асептики, добавляют 1 г лактозы, растворенной в 5 $см^3$ стерильной воды, и подогревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин.

В отдельную пробирку наливают 1,0 $см^3$ насыщенного спиртового раствора основного фуксина, к которому добавляют свежеприготовленный раствор сернистокислого натрия.

Полученную смесь добавляют в расплавленный лактозный агар, избегая вспенивания, и разливают в чашки Петри.

3.2.20. Приготовление лактозного агара с кристалл виолетом, нейтральным красным и желчью (АЛКЖ, см. приложение 1 п. 15)

В 1000 $см^3$ дистиллированной воды вносят 7 г пептона, 3 г дрожжевого экстракта сухого или 15 $см^3$ жидкого, 5 г хлористого натрия, 1,8 г сухой или 18 $см^3$ жидкой желчи, 10 г лактозы, 15 г агара. Смесь кипятят до расплавления, охлаждают до температуры (50 ± 5) °С и устанавливают pH (7,0 ± 0,1). Смесь стерилизуют при температуре (115 ± 2) °С в течение 20 мин. Охлаждают до (50 ± 5) °С и прибавляют 3 $см^3$ спиртового раствора нейтрального красного и 2 $см^3$ водного раствора кристалл виолета, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри, колбы или флаконы. Готовая среда прозрачная, красновато-коричневой окраски. Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 3 сут.

3.2.21 Приготовление солодового сусла

Солодовое неохмеленное сусло готовят следующим образом. В 1000 $см^3$ питьевой воды, подогретой до температуры (50 ± 2) °С, прибавляют 200 г молотового ячменного солода. Смесь тщательно перемешивают в течение 30 мин, медленно подогревают на водяной бане до температуры (55 ± 2) °С и выдерживают 15 мин, затем вновь подогревают до температуры (64 ± 2) °С и выдерживают на этом уровне 1 ч. Затем подогревают до температуры (72 ± 2) °С и выдерживают при этой температуре до полного осахаривания сусла. Степень осахаривания сусла проверяют раствором Люголя. Для этого каплю сусла переносят в фарфоровую чашку и осторожно прибавляют к нему каплю раствора Люголя. Окончательно осахаренное сусло не должно менять окраску в присутствии индикатора. Полученное сусло фильтруют через ватно-марлевый фильтр или фильтровальную бумагу, доливают до 1000 $см^3$ и стерилизуют 30 мин в стерилизаторе при температуре 107—110 °С. Затем сусло декантируют. Прозрачное сусло разбавляют водой до массовой доли сухих веществ 7—8 %, разливают в стерильную посуду, стерилизуют 20 мин при температуре (116 ± 2) °С. Массовую долю сухих веществ измеряют рефрактометром.

Солодовое сусло можно заменить виноградным суслом, доведя массовую долю сухих веществ этого раствора до 7—8 %.

3.2.22 Приготовление суслового агара

К 1000 $см^3$ солодового неохмеленного сусла массовой долей сухих веществ 7—8 % прибавляют 20—30 г агара и фильтруют через гигроскопическую вату или фильтровальную бумагу. Охлаждают

до (50 ± 5) °С и устанавливают pH (3,6 ± 0,1). Фильтруют, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют 15—20 мин при (116 ± 2) °С. Готовую среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

Допускается использование суслового агара с добавлением 100 г хлористого натрия на 1000 см^3 среды в доведением pH до (4,6 ± 0,1).

Среду хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут.

3.2.23. Приготовление среды с антибиотиком (см. приложение 1 п.16)

К 975 см^3 дистиллированной воды прибавляют 20 г агара, 5 г сухого или 25 см^3 жидкого дрожжевого экстракта, 20 г глюкозы, нагревают, периодически помешивая, до расплавления компонентов, охлаждают до (50 ± 5) °С, устанавливают pH (6,5 ± 0,1), стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение 15 мин. Охлаждают до температуры (50 ± 5) °С и добавляют 25 см^3 раствора левомицетина, который готовят следующим образом. 400 мг левомицетина вносят в стерильную мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 10—20 см^3 стерильной водопроводной воды при температуре 35—40 °С, перемешивают до растворения, затем доливают стерильной дистиллированной водой до метки. Левомицетин допускается стерилизовать вместе со средой при температуре (121 ± 2) °С в течение 15 мин. Среду без антибиотика хранят при температуре (6 ± 2) °С не более 14 сут. Среда с антибиотиком хранению не подлежит. Допускается вместо левомицетина использовать растворы пенициллина и стрептомицина массовой концентрации 0,004 г/см^3 на 980 см^3 среды.

3.3. Подготовка проб к анализу

3.3.1. Поступившие в лабораторию пробы освобождают от общей упаковки, осматривают, устанавливают соответствие надписей или маркировки и регистрируют в лабораторном журнале. В журнале указывают дату и час поступления проб; обозначение нормативно-технической документации, являющейся основанием для проведения анализов; время начала анализа; количество проб, подлежащих анализу, определяемые показатели, массу навесок, приготовленных для высева непосредственно в питательные среды или для приготовления разведений, кратность, и требуемую степень разведения навески.

3.3.2. Непосредственно перед вскрытием сыпучие продукты в потребительской упаковке, в лабораторной посуде или в пакете тщательно перемешивают 10-кратным переворачиванием или круговым движением.

3.3.3. Пакеты из фольги, полимерных материалов, коробки из картона, бумаги или лабораторную посуду вскрывают стерильными ножницами, скальпелем или другим инструментом в месте, предварительно обработанном тампоном, смоченным раствором этилового спирта объемной долей 70 %.

3.3.4. В боксе в асептических условиях вскрывают упаковку каждой пробы и отбирают навеску продукта для непосредственного высева в питательную среду и (или) для приготовления разведений.

3.3.5. После вскрытия упаковки от каждой пробы продуктов порошкообразных, сыпучих и брикетированных, предварительно раздавленных или разломанных, отбирают навеску стерильный ложкой или шпателем во взвешенную стерильную посуду с крышкой и взвешивают.

3.3.6. Взвешенную навеску массой (10 ± 0,1) г, предназначенную для приготовления исходного разведения, переносят в колбу, вместимостью 200—250 см^3 постепенно добавляют стерильный пептонно-солевой раствор, приготовленный по п. 3.2.3 в соотношении 1 : 9 (10 г продукта + 90 см^3 раствора).

Смесь взбалтывают или перемешивают 1 мин и отстаивают 3—5 мин.

Исходное разведение, приготовленное из зерна и круп, отстаивают 10 мин и перед посевом на выявление плесневых грибов и дрожжей снова энергично встряхивают.

Для приготовления серий последовательных разведений 1 см^3 надосадочной жидкости из 10^{-1} (исходного) разведения переносят в пробирку с 9 см^3 пептонно-солевого раствора так, чтобы пипетка не касалась поверхности раствора. Внесенный материал тщательно перемешивают другой стерильной пипеткой путем наполнения и выталкивания содержимого не менее 10 раз и получают 10^{-2} разведение. Таким же образом готовят 10^{-3} разведение.

Полученные разведения используют для посевов. Время с момента окончания приготовления последнего разведения до начала высева не должно превышать 30 мин.

4. МЕТОДЫ АНАЛИЗА

4.1. Метод определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

4.1.1. Сущность метода

Метод основан на высеве разведений определенного количества продукта в агаризованную питательную среду, культивировании посевов в аэробных условиях при температуре (30 ± 1) °С в течение 72 ч, подсчете всех мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и пересчете их количества на 1 г продукта.

4.1.2. Проведение анализа

По 1 $см^3$ исследуемого материала из разведений 10^{-2} и 10^{-3}, приготовленных по п. 3.3.6, высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. При посеве крышку чашки Петри слегка приоткрывают и посевной материал вносят на дно чашки. Не позже, чем через 15 мин после внесения материала в чашки, его заливают 15—20 $см^3$ предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С питательной среды, приготовленной по пп. 3.2.14 или 3.2.15.

Чашки с посевами, залитыми питательной средой, осторожно вращают, чтобы посевной материал равномерно распределился по всей питательной среде. Затем чашки с посевами оставляют на горизонтальной поверхности до полного застывания питательной среды.

После застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном и термостатируют при температуре (30 ± 1) °С в течение 72 ч.

4.1.3. Обработка результатов

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

На чашках, где выросло от 30 до 300 колоний, подсчитывают все колонии, суммируют и находят среднеарифметическое из них.

Подсчитывать колонии можно с помощью лупы.

Полученное среднеарифметическое число колоний округляют следующим образом:

если число меньше 100, его округляют до ближайшего числа, кратного 5;

если число больше 100 и его последняя цифра 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 20;

если число больше 100 и его последняя цифра не 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 10.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{a \cdot 10^n}{q},$$

где a — округленное среднеарифметическое число колоний;

q — объем посевного материала, внесенного в чашку, $см^3$;

n — степень десятикратного разведения продукта.

Результаты анализа выражают числом от 1,0 до 9,9, умноженным на 10^n, где n — соответствующая степень 10.

Пример подсчета числа клеток микроорганизмов приведен в приложении 3.

4.2. Метод определения бактерий группы кишечных палочек

4.2.1. Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в пробирки с жидкой селективно-диагностической лактозной средой, культивировании посевов в аэробных условиях при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч, учете пробирок, в которых отмечен рост грамотрицательных коротких палочек, ферментирующих лактозу с образованием кислоты и газа.

4.2.2. Проведение анализа

По 1 г продукта и 1 $см^3$ из 10^{-1} и 10^{-2} разведений, приготовленных по п. 3.3.6, высевают в пробирки, содержащие по 9 $см^3$ одной из сред, приготовленных по пп. 3.2.16, 3.2.17 или 3.2.18 с поплавками. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1)°С в течение 48 ч.

Если требуется определить наиболее вероятное число бактерий группы кишечник палочек, то по 1 г продукта и 1 $см^3$ из 10^{-1} и 10^{-2} разведений высевают параллельно в три пробирки, содержащие по 9 $см^3$ одной из жидких селективных сред, по пп. 3.2.16, 3.2.17 или 3.2.18. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

Через 24 ч проводят предварительный, а через 48 ч — окончательный учет посевов.

Просматривают каждую пробирку и регистрируют те из них, в которых имеется рост микроорганизмов (газообразование, изменение цвета среды, помутнение и другие признаки).

Из пробирок с признаками роста микроорганизмов на среде п. 3.2.16 делают пересевы петлей на поверхность плотной среды, приготовленной по п. 3.2.19 или по п. 3.2.20, штрихами так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. После термостатирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек: на среде Эндо — плоские или слегка выпуклые, или с валиком, красные с различной интенсивностью окраски, розовые, бледно-розовые с металлическим и без металлического блеска; на среде АЛКЖ-ярко или светло-розового, розово-фиолетового цвета, часто с более светлым или бесцветным краем, 1—3 мм в диаметре, под которыми иногда образуется преципитат розового цвета в виде пятна.

Из пробирок с ростом микроорганизмов на средах по пп. 3.2.17 и 3.2.18, а также из не менее, чем пяти характерных колоний, выросших на плотной среде, делают препараты и окрашивают их по Граму. Для этого на обезжиренное предметное стекло наносят петлей одну каплю стерильной дистиллированной или водопроводной воды и в ней растирают материал, взятый из посевов на жидких средах или из характерной колонии на плотной среде. Допускается из жидких сред препарат готовить без воды. Мазок на предметном стекле фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки. На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генциан виолета на 0,5—1,0 мин, снимают бумагу, наливают раствор Люголя на 0,5—1,0 мин, сливают раствор Люголя и стекло прополаскивают в этиловом спирте в течение 0,5—1,0 мин, пока не перестанет отходить краситель. Затем мазок тщательно промывают водой и докрашивают 1—2 мин фуксином Циля, разведенным дистиллированной водой в соотношении 1 : 9.

После промывки и просушивания препарата фильтровальной бумагой мазок микроскопируют.

Микроорганизмы, красящиеся по Граму, окрашиваются в сине-фиолетовый цвет основного красителя, не красящиеся по Граму — в розовый цвет дополнительного красящего раствора.

Бактерии группы кишечных палочек являются грамотрицательными короткими палочками.

Если после просмотра окрашенных по Граму препаратов не обнаружены грамотрицательные короткие палочки, то дают заключение об отсутствии бактерий группы кишечных палочек в анализируемом продукте.

Если хотя бы в одном окрашенном по Граму препарате будут обнаружены грамотрицательные короткие палочки, то считают, что в продукте присутствуют бактерии группы кишечных палочек.

При определении наиболее вероятного числа бактерий группы кишечных палочек в 1 г продукта учитывают число пробирок, в которых подтвержден рост бактерий группы кишечных палочек, пользуясь таблицей, приведенной в обязательном приложении 2.

4.2.3. Обработка результатов

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

При определении бактерий группы кишечных палочек в определенной массе продукта результат записывают как «обнаружены» или «не обнаружены» бактерии группы кишечных палочек в анализируемой навеске.

Определение наиболее вероятного числа бактерий группы кишечных палочек в 1 г продукта проводят с помощью таблицы НВЧ микроорганизмов следующим образом.

В каждом ряду из трех пробирок, засеянных соответственно продуктом и его двумя последовательными разведениями, отмечают число положительных пробирок. По количеству учтенных положительных пробирок составляют трехзначное число, по которому, пользуясь таблицей, приведенной в приложении 2, находят НВЧ бактерий группы кишечных палочек в 1 г. Пример определения НВЧ приведен в приложении 3.

4.3. Метод определения количества плесневых грибов и дрожжей

4.3.1. Сущность метода

Метод основан на высеве разведений определенного количества продукта в селективную агаризованную среду, культивировании посевов при (24 ± 1) °С в течение 120 ч, подсчете всех видимых колоний плесневых грибов и дрожжей, типичных по макро- и (или) микроскопической морфологии и пересчете их количества на 1 г продукта.

4.3.2. Проведение анализа

По 1 $см^3$ из 10^{-1} и 10^{-2} разведений, приготовленных по п. 3.3.6, высевают параллельно в две чашки Петри. В каждую чашку Петри, содержащую исследуемый материал, добавляют не позднее,

чем через 15 мин 15—20 см^3 расплавленную и охлажденную до (45 ± 5) °С одну из агаризованных сред, приготовленную по пп. 3.2.22 или 3.2.23.

Среду немедленно тщательно перемешивают с исследуемым материалом и оставляют для застывания. После застывания среды посевы термостатируют крышками вверх при температуре (24 ± 1)°С в течение 120 ч.

Если требуется проводить не количественный учет, а альтернативный, то есть определять наличие или отсутствие плесневых грибов и дрожжей в определенной массе продукта, то продукт и (или) его соответствующие разведения высевают непосредственно в одну из сред по пп. 3.2.22 или 3.2.23 без агара.

Посевы на жидких средах термостатируют при температуре (24 ± 1) °С в течение 72 ч, ежедневно наблюдая за появлением роста микроорганизмов.

На плотных средах проводят предварительный учет типичных колоний через 72 ч термостатирования посевов и окончательный учет через 120 ч.

На поверхности плотной среды развитие плесневых грибов характеризуется появлением пушистого паутинообразного или ватообразного роста.

В жидкой среде рост плесневых грибов имеет вид комочков ваты, тяжей и нитей, со временем оседающих на дно пробирки.

Для подтверждения роста плесневых грибов делают пересевы на плотные среды и подтверждают рост характерных колоний.

Дрожжи на поверхности плотной среды образуют плоские, иногда выпуклые колонии белого или кремового цвета. В глубине агара дрожжи образуют чечевицеобразные колонии.

Развитие дрожжей в жидких средах сопровождается появлением в посевах помутнения, газа, запаха брожения.

Для подтверждения роста дрожжей их изучают. Для этого готовят препараты из жидких сред с признаками роста дрожжей и не менее, чем из пяти характерных колоний на плотных средах.

На середину чистого, обезжиренного предметного стекла наносят каплю стерильной дистиллированной или водопроводной воды, в которую вносят бактериологической петлей небольшое количество исследуемого материала так, чтобы капля жидкости стала слегка мутноватой. Допускается из жидких сред препарат готовить без капли воды. Излишек микробного материала на петле сжигают в пламени горелки. Исследуемый материал равномерно распределяют по стеклу, просушивают на воздухе и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки.

При приготовлении на одном стекле одновременно нескольких мазков лицевую сторону стекла делят восковым карандашом на необходимое количество секторов.

На препарат после его фиксации накладывают полоску фильтровальной бумаги и наливают раствор фуксина Пфейфера или метиленовой сини, приготовленных по пп. 3.2.7 или 3.2.8 на 3—5 мин, промывают водопроводной водой, подсушивают и микроскопируют. Окрашенный фон препарата слабее, чем дрожжевые клетки.

Дрожжевые клетки значительно крупнее бактериальных. Диаметр их достигает 8—10 мкм. Форма дрожжевых клеток разнообразная: яйцевидная, эллиптическая, цилиндрическая, лимоновидная или шаровидная, при почковании на поверхности дрожжевых клеток видны бугорки.

4.3.3 Обработка результатов

Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

Уточняют число плесневых грибов на чашках, где выросло их от 5 до 50 колоний и (или) от 15 до 150 колоний дрожжей и пересчитывают на 1 г продукта. Для этого находят среднее арифметическое число колоний плесневых грибов и (или) дрожжей, округляют его как указано в п. 4.1.3, умножают на степень разведения и делят на количество посевного материала (объема), внесенного в чашку. Количество плесневых грибов и дрожжей записывают в виде числа (от 1,0 до 9,9)$\times 10^n$.

Например, 150 клеток в 1 г записывают как $1{,}5 \times 10^2$ кл/г. При посеве в жидкие среды результат записывают как «обнаружены» или «не обнаружены» плесневые грибы (или) дрожжи в анализируемой навеске продукта.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Справочное

Рецептуры растворов и питательных сред

п. 1. Пептонно-солевой раствор

Натрий хлористый, г	0,85
Пептон, г	0,1
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 2. Карболовый раствор генциан виолета

Генциан виолет, г	1
Спирт этиловый ректификованный, $см^3$	10
Фенол, г	5
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 3. Раствор Люголя

Йод кристаллический, г	1
Калий йодистый, г	2
Вода дистиллированная, $см^3$	300

п. 4. Фуксин Циля

Фуксин основной, г	1
Спирт этиловый ректификованный, $см^3$	10
Фенол, г	5
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 5. Раствор фуксина по Прейферу

Фуксин Циля по п. 3.2.6, $см^3$	1
Вода дистиллированная, $см^3$	9

п. 6. Раствор метиленового синего по Леффлеру

Метиленовый синий насыщенный спиртовой раствор, $см^3$	30
Калия гидроокись, раствор массовой концентрацией 0,01 $г/см^3$, $см^3$	1
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 7. Раствор кристалл виолета массовой концентрацией 0,01 $г/см^3$

Кристалл виолет, г	1
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 8. Спиртовой раствор нейтрального красного массовой концентрацией 0,01 $г/см^3$

Нейтральный красный кристаллический, г	1
Спирт этиловый ректификованный, $см^3$	100

п. 9. Раствор бриллиантового зеленого массовой концентрацией 0,005 $г/см^3$

Бриллиантовый зеленый, г	0,5
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 10 Раствор лимонной кислоты

Лимонная кислота, г	20
Вода дистиллированная, $см^3$	100

п. 11. Среда из сухого питательного агара (СПА) с дрожжевым экстрактом и глюкозой

СПА, г	30—35
Экстракт дрожжевой сухой, г или	2,5
Экстракт дрожжевой жидкий, $см^3$	12,5
Глюкоза, г	1,0
Вода дистиллированная, $см^3$	1000

п. 12. Глюкозный агар с гидролизатом казеина и дрожжевым экстрактом

Гидролизат панкреатический казеиновый (энзиматический)	5
Экстракт дрожжевой сухой, г	2,5
или	
Экстракт дрожжевой жидкий, $см^3$	12,5
Глюкоза, г	1,0
Агар, г	15,0
Вода дистиллированная, $см^3$	1000

п. 13. Среда Кесслер-Свенартон

Пептон, г	10
Желчь стерильная жидкая, $см^3$	50
или	
Желчь стерильная сухая, г	5
Лактоза, г	10
Кристалл виолет, раствор по п. 3.2.9, $см^3$	4
Вода дистиллированная, $см^3$	1000

п. 14. Лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью (БЛБЗЖ)

Пептон, г	10
Лактоза, г	10
Желчь сухая, г	20
или	
Желчь жидкая, $см^3$	200
Бриллиантовый зеленый, раствор по п. 3.2.11, $см^3$	2,66
Вода дистиллированная, $см^3$	1000

п. 15. Лактозный агар с кристалл виолетом, нейтральным красным и желчью (АЛКЖ)

Пептон, г	7,0
Экстракт дрожжевой сухой, г	3
или	
Экстракт дрожжевой жидкий, раствор по п. 3.2.13, $см^3$	15
Натрий хлористый, г	5
Желчь сухая, г	1,8
или	
Желчь жидкая, $см^3$	18
Лактоза, г	10
Нейтральный красный, раствор по п. 3.2.10, $см^3$	3
Кристалл виолета, раствор по п. 3.2.9, $см^3$	2
Агар, г	15
Вода дистиллированная	1000

п. 16. Среда с антибиотиком

Агар, г	20
Экстракт дрожжевой сухой, г	5
или	
Экстракт дрожжевой жидкий, $см^3$	25
Глюкоза, г	20
Левомицетин (хлорамфеникол), $см^3$	25
Вода дистиллированная, $см^3$	975

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Обязательное

Таблица для определения наиболее вероятного числа микроорганизмов (НВЧ)

Количество положительных пробирок для разведений продукта			Наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов в 1 г ($см^3$) продукта	Действительное число микроорганизмов с интервалом доверительной вероятности 0,95	
10^{-1}	10—2	10^{-3}		от	до
1			2	3	
0	0	0	Менее 3	—	—
0	0	0*	3	0,1	9,5
0	1	0	3	0,1	10,0
0	2	0*	6	1,2	17,0
1	0	0	4	0,2	17,0
1	0	1	7	1,2	17,0
1	1	0	7	1,3	20,0
1	1	1	11	3,5	35,0
1	2	0	11	3,6	35,0
2	0	0	9	1,5	35,0
2	0	1	14	3,6	35,0
2	1	0	15	3,7	38,0
2	1	1	20	4,5	38,0
2	2	0	21	4,5	40,0
2	2	1*	28	8,7	94,0
2	3	0*	29	8,7	94,0
3	0	0	23	4,6	94,0
3	0	1	38	8,8	104,0
3	0	2*	60	16,0	181,0
3	1	0	40	9,1	181,0
3	1	1	70	17,0	199,0
3	1	2*	120	35,0	360,0
3	2	0	90	18,0	360,0
3	2	1	150	35,0	380,0
3	2	2	210	35,0	400,0
3	2	3*	290	90,0	990,0
3	3	0	200	36,0	990,0
3	3	1	500	91,0	1980,0
3	3	2	1100	182,0	4050,0
3	3	3	Более 1100	—	—

Примечания:

1. Таблица включает наиболее вероятные комбинации пробирок, которые могут быть получены при анализе пяти проб продукта, в интервале с доверительной вероятностью 0,95.

2. * — наименее вероятные комбинации пробирок, доля которых составляет 4 % при анализе пяти проб продукта.

3. Если при анализе получают комбинации пробирок, не входящие в таблицу, то это указывает либо на ошибки при выполнении анализа, либо на присутствие в продукте бактериостатических веществ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Справочное

Пример подсчета числа клеток микроорганизмов

На двух чашках, засеянных по 1 $см^3$ материала 10^{-2} разведения, выросло соответственно 137 и 113 колоний, среднеарифметическое составляет (137 + 113) : 2 = 125, после округления среднеарифметическое составляет 120 колоний. Количество микроорганизмов в 1 г продукта будет равно

$$X = \frac{120 \cdot 10^2}{1} = 12000 = 1{,}2 \cdot 10^4 \text{ клеток в 1 г.}$$

Если число колоний, выросших в посевах на чашках менее 30, то результат записывают как количество микроорганизмов менее 30, умноженное на степень разведения продукта.

Если число колоний, выросших в посевах на чашках более 300, то посевы повторяют, используя более высокие разведения продукта.

Пример определения наиболее вероятного числа (НВЧ) бактерий группы кишечных палочек

В ряду из трех пробирок, засеянных по 1 г продукта, оказались все три пробирки положительными; в ряду из трех пробирок, засеянных из 10^{-1} разведения, оказались две пробирки положительными, а в ряду из трех пробирок, засеянных из 10^{-2} разведения — одна пробирка положительная. Число положительных пробирок в каждом ряду записывают как 321.

Этому трехзначному числу в таблице (см. приложение 2) в графе 2 соответствует число 150. Наиболее вероятное число бактерий в 1 г продукта в нашем примере будет равно 15 (150, деленное на 10).

Если бы посевы проводили из разведений 10^{-1}, 10^{-2} и 10^{-3}, то НВЧ бактерий в 1 г продукта равнялось бы числу в графе 2. Если бы посевы проводили из 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} разведений, то наиболее вероятное число бактерий в 1 г равнялось бы числу в графе 2, умноженному на 10.

Если посевы таковы, что в каждом засеянном ряду по три пробирки, все пробирки оказались положительными, то трехзначное число записывают как 333. Этому трехзначному числу в графе 2 таблицы НВЧ соответствует число бактерий группы кишечных палочек в 1 г более 1100. Для определения конечного числа этих бактерий в таком случае анализ повторяют, используя более высокие разведения.

Если посевы таковы, что ни в одном засеянном ряду по три пробирки не оказалось положительных пробирок, то трехзначное число равно 000. Этому числу в графе 2 соответствует число менее 3, что свидетельствует об отсутствии бактерий группы кишечных палочек в 1 г продукта.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4
Справочное

Термины, используемые в настоящем стандарте, и пояснения к ним

Термин	Определение
1. Навеска	Часть пробы определенной массы, предназначенная для приготовления исходного разведения или непосредственного высева в питательные среды
2. Исходное разведение	Масса (объем) навески, разведенная пептонно-солевым раствором до требуемой концентрации, которая может составлять двух (2^{-1}), четырех (4^{-1}), шести (6^{-1}), а чаще всего десятикратное (10^{-1}) разбавление исходной массы (объема) продукции

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 09.06.2003. Подписано в печать 08.07.2003. Усл. печ.л. 1,86. Уч.-изд.л. 1,64.
Тираж 131 экз. С 11202. Зак. 554.

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

gost.e-ecolog.ru