ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЗЕРНОВЫЕ, БОБОВЫЕ И ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

Определение количества бактерий, дрожжевых и плесневых грибов

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом зерна и продуктов его переработки (ВНИИЗ)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 2 «Зерно, продукты его переработки и маслосемена»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 13 мая 1999 г. № 163

3 Настоящий стандарт, кроме раздела 2, представляет собой аутентичный текст ИСО 7698 : 1990 «Зерновые, бобовые и продукты их переработки. Подсчет бактерий, дрожжевых и плесневых грибов»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июль 2002 г.

© ИПК Издательство стандартов, 1999
© ИПК Издательство стандартов, 2002

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

Содержание

Введение 1
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения 2
4 Сущность метода 2
5 Разбавитель, питательные среды и другие продукты 2
6 Лабораторное оборудование и стеклянная посуда 3
7 Отбор проб 4
8 Подготовка анализируемой навески 4
9 Проведение анализа 4
10 Обработка результатов 5
11 Отчет об анализе 6

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЗЕРНОВЫЕ, БОБОВЫЕ И ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

Определение количества бактерий, дрожжевых и плесневых грибов

Cereals, pulses and derived products.
Enumeration of bacteria, yeasts and moulds

Дата введения 2000—01—01

Введение

Определение количества бактерий, дрожжевых и плесневых грибов в зерновых и бобовых культурах, а также в продуктах их переработки дает возможность определить содержание в них микроорганизмов и (или), в зависимости от цели, дает возможность определить природу присутствующей микрофлоры. Цель анализа — определение качества партии продукта с точки зрения гигиенических требований, изучение динамики развития микрофлоры для оценки эффективности одного из типов хранилищ или оценки влияния физической или химической обработки продукта на микрофлору.

При анализе измельченных продуктов кусочки грибницы также принимают во внимание, но подсчитывают главным образом споры грибов, особенно в том случае, если присутствующие виды грибов являются интенсивно спорулирующими. Такой метод является эффективным способом контроля за развитием микроорганизмов (в зерновых и бобовых культурах, а также в полученных из них продуктах) особенно в серии последовательных проб при условии, что будет проведена идентификация тех видов, которые позволяют проследить за эволюцией микрофлоры. При исследованиях результаты, полученные при помощи такого подсчета, соответствуют тем результатам, которые получены по технологическим критериям (например кислотное число жира, всхожесть).

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения количества бактерий, дрожжевых и плесневых грибов в зерновых и бобовых культурах и в продуктах их переработки (мука, крупа, отруби и т. д.).

Стандарт разработан с учетом международных стандартов:

ИСО 7954—84, который дает общее направление таких исследований и ИСО 7218—85, где приводят подробные описания лабораторных методов для микробиологических исследований.

Примечание — Из-за особых свойств дрожжевых и плесневых грибов их подсчет страдает определенными неточностями.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ ИСО 2170—97 Зерновые и бобовые. Отбор проб размолотых продуктов

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26972—86 Зерно, крупа, мука, толокно для продуктов детского питания. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835—1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 50436—92 (ИСО 950—79) Зерновые. Отбор проб зерна

Издание официальное

3 Определения

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 бактерии: Мезофильные микроорганизмы, аэробные или факультативно анаэробные, которые при 30°С развиваются внутри и на поверхности агаризованной среды в условиях, которые описаны в этом стандарте.

3.2 дрожжевые грибы: Мезофильные аэробные микроорганизмы, которые развиваются при 25 °С на грибной агаризованной среде в условиях, описанных в этом стандарте, либо:

а) на поверхности этой среды в виде матовых или блестящих круглых колоний, которые обыкновенно имеют правильный контур и более или менее выпуклую поверхность, либо

б) внутри среды в виде округлых, линзообразных колоний.

3.3. плесневые грибы: Мезофильные аэробные гифальные микроорганизмы, которые на поверхности грибной агаризованной среды и в условиях, описанных в этом стандарте, обычно развиваются в виде плоских или пушистых разрастающихся колоний часто с окрашенными плодоносящими или спорообразующими структурами.

4 Сущность метода

4.1 Готовят в двух повторностях чашки, залитые каждой из двух специфических питательных сред согласно 5.3.1 и 5.3.2, которые содержат определенное количество маточной суспензии.

В тех же условиях осуществляют посев в другие чашки последовательных десятичных разведений маточной суспензии.

4.2 Аэробную инкубацию чашек, содержащих агаризованную среду для подсчета бактерий (5.3.1), проводят при 30 °С в течение 3 дней.

Аэробную инкубацию чашек, содержащих агаризованную среду для подсчета дрожжевых и плесневых грибов (5.3.2), проводят при 25 °С в течение 3, 4 или 5 дней.

4.3 Расчет количества бактерий по количеству колоний в отобранных чашках с агаризованной средой (5.3.1).

Расчет количества дрожжевых и (или) плесневых грибов по количеству колоний в отобранных чашках с агаризованной средой (5.3.2).

5 Разбавитель, питательные среды и другие продукты

5.1 Основные компоненты

Чтобы обеспечить воспроизводимость результатов, рекомендуется использовать для приготовления разбавителя и питательных сред основные обезвоженные компоненты или полностью обезвоженные среды. Также могут быть использованы коммерческие готовые реактивы. При этом необходимо строго соблюдать инструкцию изготовителя.

Используемые химикаты должны иметь такую степень чистоты, которая пригодна для анализа.

Используемая вода должна быть дистиллированной или деионизированной. Эта вода должна быть свободна от таких веществ, которые могли бы сдерживать рост микроорганизмов (бактерий, дрожжевых и плесневых грибов) в условиях проведения этого анализа.

Если разбавитель и питательные среды не используют тотчас же после изготовления, то их должны, если нет особых указаний, хранить в темном месте при температуре от 0 до 5 °С не более одного месяца, в условиях, не оказывающих влияния на изменение их состава.

5.2 Разбавитель

Раствор пептона в растворе хлорида натрия должен соответствовать ГОСТ 26972.

Примечание — Для того, чтобы повысить гомогенность споровых суспензий, можно добавить такое поверхностно-активное средство, как сорбитовый эфир олеиновой кислоты (фирменное название Твин 80) в пропорции 0,033 г на один литр разбавителя.

5.3 Питательные среды

5.3.1 *Агаризованная среда для подсчета количества бактерий*

Состав: триптон* — 5,0 г; обезвоженный дрожжевой экстракт — 2,5 г; безводная глюкоза — 1,0 г; агар — от 9 до 18 г**; вода — 1000 см^3.

Примечание — Если требуется предотвратить развитие дрожжевых грибов, к питательной среде могут быть добавлены ингибиторные средства, такие как актидион (циклогексимид) или натамицин (пимарицин) в количестве 0,1 г/дм^3.

---

* Это название в настоящее время применяется только некоторыми изготовителями сред. Может использоваться любой другой продукт расщепления, который дает такие же результаты.

** В соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

Приготовление

Растворяют компоненты или полностью обезвоженную среду в воде при кипячении. В случае необходимости регулируют показатель pH таким образом, чтобы после стерилизации он составил 7,0 при 25 °С.

Разливают эту среду в пробирки согласно 6.9 по 15 см^3 на одну пробирку, или в колбы, или сосуды (6.9) подходящей емкости таким образом, чтобы среда занимала приблизительно половину объема такой колбы или сосуда.

Стерилизуют эту среду в автоклаве согласно 6.1 при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.

Если приготовленную среду используют сразу, то ее охлаждают перед использованием в водяной бане согласно 6.7 при температуре (45 ± 0,5) °С.

Если приготовленную среду не используют сразу после ее приготовления, то перед началом микробиологических анализов, чтобы избежать задержек при разливе агаризованной среды, ее следует расплавить в кипящей водяной бане, а затем охладить перед использованием в водяной бане согласно 6.7 при температуре (45 ± 0,5) °С.

5.3.2 *Агаризованная среда для подсчета количества дрожжевых и плесневых грибов (агаризованная среда с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом)*

Состав: дрожжевой экстракт — 5,0 г; глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) — 20 г; хлорамфеникол ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) — 0,1 г; агар — от 9 до 18 г*; вода — 1000 см^3.

Приготовление агаризованной среды

Растворяют компоненты в кипящей воде. Если необходимо, регулируют pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 6,6 при 25 °С.

Разливают среду по сосудам (6.9) соответствующей емкости.

Стерилизуют среду в автоклаве (6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Если среду используют сразу после ее приготовления, ее охлаждают в водяной бане (6.7) при температуре (45 ± 0,5) °С.

Если же приготовленная среда не будет использована сразу после приготовления, то перед началом микробиологических анализов, чтобы избежать задержки при разливе агаризованной среды, ее полностью расплавляют в кипящей водяной бане, затем охлаждают перед использованием в водяной бане (6.7) при температуре (45 ± 0,5) °С.

Примечание — Хлорамфеникол может быть заменен окситетрациклином ($C_{22}H_{30}N_2O_{11}$). В этом случае готовят основную среду так, как это описано выше, но не добавляют хлорамфеникол. Разливают среду по 100 см^3 и стерилизуют. Готовят 0,1 %-ный раствор окситетрациклина гидрохлорида в воде и стерилизуют его после фильтрования. Непосредственно перед использованием добавляют асептически 10 см^3 раствора к 100 см^3 основной среды, которая была расплавлена, и сохраняют при температуре (45 ± 0,5) °С.

6 Лабораторное оборудование и стеклянная посуда

Примечание — Оборудование одноразового использования является приемлемой заменой стеклянной посуде многоразового использования, если такое оборудование имеет соответствующую спецификацию.

Пользуются обычным микробиологическим лабораторным оборудованием, которое перечислено ниже.

6.1 Оборудование для сухой стерилизации (термостат) или для паровой стерилизации (автоклав), причем автоклав может либо работать отдельно, либо являться частью общего оборудования для приготовления и распределения питательной среды.

Оборудование, которое вступает в соприкосновение с растворителем, питательной средой или пробой, особенно если это оборудование пластмассовое**, должно быть простерилизовано, за исключением тех случаев, когда оборудование поставляется стерильным. Стерилизация должна производиться одним из следующих методов:

а) стерилизация в термостате (6.1) при температуре от 170 до 175 °С не менее 1 ч;

б) стерилизация в автоклаве (6.1) при температуре (121 ± 1) °С не менее 20 мин.

6.2 Оборудование для смешивания

Для смешивания желательно использовать один из следующих видов оборудования:

а) ротационный смеситель, желательно с верхним приводом, имеющий частоту вращения от 8000 до 45000 мин$^{-1}$, со стеклянными или металлическими сосудами, желательно оснащенными крышками, устойчивыми к условиям, при которых проводится стерилизация;

* В соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

** Используется оборудование из термостойких пластмасс.

б) смеситель перистальтического типа (фирменное название «стамэйкер») со стерильными пластмассовыми мешками.

Примечание — Сосуды или пластмассовые мешки должны иметь достаточную емкость для того, чтобы дать возможность хорошо перемешать навеску с достаточным количеством разбавителя. Вместимость сосуда должна быть приблизительно вдвое больше, чем емкость пробы вместе с разбавителем.

6.3 Мешалка вихревого типа, предназначенная для перемешивания содержимого в пробирках, колбах и сосудах (разбавленного раствора первоначальной суспензии).

6.4 Термостаты, способные поддерживать температуру на уровне (30 ± 1) °С и (25 ± 1) °С.

6.5 Чашки Петри диаметром от 90 до 100 мм.

6.6 Градуированные пипетки, откалиброванные только для бактериологического использования, вместимостью 10 и 1 см^3, с делениями, градуированными на 0,5 и 0,1 см^3 соответственно, и имеют вытекающее отверстие от 2 до 3 мм по ГОСТ 29227.

6.7 Водяная баня или подобное устройство, температуру которого можно контролировать на уровне (45 ± 0,5) °С.

6.8 Потенциометр точностью до ± 0,1 pH при температуре 25 °С.

6.9 Пробирки размером 20 × 200 мм, или колбы, или сосуды емкостью 0,5 и 1 дм^3 по ГОСТ 25336.

7 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 50436 или ГОСТ ИСО 2170.

Масса лабораторной пробы должна быть больше, чем масса навески для анализа, приведенной в таблице 1, чтобы иметь возможность повторить этот анализ, если возникнет такая необходимость.

Если анализ отобранных проб проводят не сразу, то эти пробы хранят при температуре приблизительно 10 °С не более 48 ч. Этот момент отражается в отчете об анализе. Не допускается, чтобы отобранные пробы при хранении были заморожены.

8 Подготовка анализируемой навески

Перед тем, как произвести отбор анализируемой навески, необходимо тщательно перемешать лабораторную пробу.

Примечание — В исследуемых с помощью настоящего стандарта продуктах микроорганизмы часто имеют неравномерное распределение по всему объему анализируемой пробы. Поэтому желательно использовать не менее 3, а лучше 5 анализируемых навесок.

9 Проведение анализа

9.1 Анализируемая навеска

Анализируемую навеску, масса которой определена в таблице 1, взвешивают с точностью до 0,1 г и помещают:

а) в сосуд ротационного смесителя (6.2а) для продуктов категории 1 или

б) в пластмассовый мешок смесителя с фирменным названием «стамэйкер» (6.2б) для продуктов категории 2, или

в) в плоскодонную стеклянную колбу емкостью 500 или 750 см^3 в соответствии с ГОСТ 26972.

Таблица 1

Категория	Продукт	Масса анализируемой навески, г	Количество разбавителя, см^3
1	Зерно или семена	40	360
2	Зернопродукты (мука, крупа, отруби)	20	180

9.2 Приготовление маточной суспензии (исходного разведения)

К анализируемой навеске добавляют соответствующий объем разбавителя, который приведен в таблице 1, и оставляют на 30 мин, затем либо:

а) используют ротационный смеситель (6.2а), чтобы число его оборотов достигло от 15000 до 20000 в минуту. При использовании смесителя с меньшим числом оборотов время не должно превышать 2,5 мин, либо;

б) используют смеситель «стамэйкер» (6.2.б) в течение 2 мин;

в) при отсутствии указанного оборудования действуют в соответствии с ГОСТ 26972.

9.3 Приготовление разведений

Разведения готовят в соответствии с требованиями ГОСТ 26972.

Перед тем, как проводят отбор аликвотной порции суспензии для посева, содержимое пробирки гомогенизируют с помощью мешалки вихревого типа (6.3) или тщательно перемешивают вручную.

9.4 Посев

9.4.1 Берут четыре стерильных чашки Петри согласно 6.5. С помощью стерильной пипетки переносят в каждую чашку 1 см^3 маточной суспензии (разведение 10^{-1} согласно 9.2).

9.4.2 Берут еще четыре стерильных чашки Петри. Используя другую стерильную пипетку, переносят в каждую чашку 1 см^3 разведения 10^{-2} согласно 9.3.

Повторяют эту процедуру, используя последующие разведения с учетом требований, изложенных в 9.6.1 и 9.6.2.

9.4.3 В каждой группе из четырех чашек в две из них наливают приблизительно 15 см^3 агаризованной среды (5.3.1), а в две другие чашки наливают приблизительно 15 см^3 агаризованной среды (5.3.2).

Тщательно и осторожно перемешивают посевной материал и питательную среду и оставляют для застывания, причем чашки должны стоять на холодной горизонтальной поверхности.

Также готовят две контрольные чашки, одна из которых должна содержать приблизительно 15 см^3 агаризованной среды (5.3.1), а другая — приблизительно 15 см^3 агаризованной среды (5.3.2), для проверки их стерильности.

9.5 Инкубация

9.5.1 *Бактерии*

Переворачивают чашки с агаризованной средой (5.3.1) и помещают их в термостат (6.4), температура в котором поддерживается на уровне (30 ± 1) °С, на 3 дня.

9.5.2 *Дрожжевые и плесневые грибы*

Чашки с агаризованной средой (5.3.2) в прямом или перевернутом положении помещают в термостат (6.4), температура в котором поддерживается на уровне (25 ± 1) °С, на 5 дней.

9.6 Оценка результатов анализа

9.6.1 *Подсчет колоний бактерий*

Исследуют чашки после периода инкубации, установленного согласно 9.5.1.

Подсчитывают число колоний в каждой чашке с агаризованной средой (5.3.1), содержащие не более 300 колоний. Необходимо, чтобы одна их этих чашек содержала, по крайней мере, 15 колоний.

9.6.2 *Подсчет колоний дрожжевых и (или) плесневых грибов*

Подсчитывают число колоний в каждой чашке спустя три, четыре и пять дней инкубации. После 5 дней сохраняют те чашки, в которых содержится менее 150 колоний. Если некоторые части этих чашек слишком заросли плесневыми грибами или трудно сосчитать хорошо изолированные колонии, то используют те результаты, которые получены после 4 или 3 дней инкубации. В этом случае в отчете о результате анализа должен быть указан инкубационный период в 3 или 4 дня.

Различия между колониями дрожжевых и плесневых грибов устанавливают с помощью микроскопа.

В сомнительных случаях необходимо учитывать, что колонии дрожжевых грибов обыкновенно состоят из яйцевидных или сферических клеток, в то время как у плесневых видны волокна грибницы.

10 Обработка результатов

10.1 Вычисления

10.1.1 Подсчитывают количество микроорганизмов, то есть бактерий, дрожжевых и (или) плесневых грибов на один грамм продукта по следующей формуле

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1 n_2)\, d}, \qquad (1)$$

где ΣC — сумма колоний во всех чашках, которая подсчитана в двух последовательных разведениях;

d — разведение, в котором были получены первые подсчеты (например, 10^{-2});

n_1 — количество чашек, в которых проведены подсчеты в первом разведении;

n_2 — количество чашек, в которых проведены подсчеты во втором разведении.

10.1.2 Округляют результат, который получен в 10.1.1 до двух значащих цифр. Если число, которое нужно округлить, равно 5 без дальнейших значащих цифр, его округляют так, чтобы получилось четное число, например: 28500 округляют до 28000, а 11500 — округляют до 12000.

10.1.3 Выражают этот результат в виде числа между 1,0 и 9,9, умноженного на 10^x, где x — соответствующая степень.

Если в чашках из маточной суспензии (9.4.1) колонии отсутствуют, тогда количество микроорганизмов (то есть бактерий) дрожжевых и (или) плесневых грибов на один грамм продукта должно быть внесено в отчет как «менее 10».

10.2 Пример вычисления

Подсчет дрожжевых и (или) плесневых грибов дал следующие результаты (две чашки Петри на разведение были подвергнуты инкубации):

10^{-2} раствор: 105 и 97 колоний;

10^{-3} раствор: 18 и 23 колонии;

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1n_2)\,d} = \frac{105 + 97 + 18 + 23}{[2 + (0{,}1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{243}{0{,}022} = 11045\ . \qquad (2)$$

Округление результата в соответствии с 10.1.2 дает 11000.

Таким образом, определенное количество дрожжевых и плесневых грибов на грамм продукта равно $1{,}1 \times 10^4$.

10.3 Точность (допустимые расхождения)

По статистическим соображениям, в 95 % всех случаев доверительные уровни для этого метода варьируются от ± 16 до ± 52 %. На практике могут наблюдаться даже более значительные вариации, в особенности между результатами, которые получены разными микробиологами.

11 Отчет об анализе

Отчет об анализе должен отражать использованный метод, инкубационный период и полученные результаты, должен ясно показывать использованный метод вычислений. В этом отчете также должны быть упомянуты любые рабочие детали, которые не указаны в этом стандарте или которые рассматриваются как необязательные вместе с любыми случайными деталями, которые могут оказать влияние на результаты.

Отчет об анализе должен включать в себя всю ту информацию, которая необходима для полной идентификации пробы.

УДК 631.53.02 : 633.85 : 001.4 : 006.354 ОКС 07.100.30 Н39 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: бактерии, дрожжевые грибы, плесневые грибы, микроорганизмы, разбавитель, питательная среда, колонии, агаризованная среда, экстракт, стерилизация, маточная суспензия

Редактор *Т.П. Шашина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.С. Черная*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Подписано в печать 27.08.2002. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85.
Тираж 82 экз. С 7128. Зак. 241.

ИПК Издательство стандартов, 107076 Москва, Колодезный пер., 14.
http: //www.standards.ru e-mail: info@standards.ru
Набрано и отпечатано в ИПК Издательство стандартов

gost.e-ecolog.ru