ГОСТ 9225—84

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2009

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.12.04/.07:576.8:006.354 Группа Н19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методы микробиологического анализа

Milk and milk products.
Methods of microbiological analysis

ГОСТ 9225—84

МКС 07.100.30
67.100.10
ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.86

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочные продукты (кроме детских) и устанавливает методы микробиологического анализа.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

1. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

1.1. Правила приемки и общие правила отбора проб — по ГОСТ 26809, ГОСТ 3622 и ГОСТ 13928.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.2. Пробы пастеризованного молока и молочных продуктов для микробиологических анализов отбирают до отбора проб для физико-химических и органолептических анализов.

1.3. Пробы для микробиологических анализов отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений.

1.4. Отбор проб и перемешивание продукта перед отбором производят отборником, черпаком, ложкой, металлической трубкой, щупом, шпателем или другим соответствующим приспособлением, которые каждый раз перед использованием должны быть простерилизованы фламбированием или в автоклаве.

При отборе проб сырого молока для определения редуктазы допускается обработка металлической трубки или пробника пропариванием, кипячением или хлорированием с последующим ополаскиванием питьевой водой.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

1.5. Отбор проб продуктов для микробиологического анализа

1.5.1 Молоко заготовляемое

Объединенную пробу объемом 500 $см^3$ составляют из точечных проб, отобранных из каждой фляги или цистерны после органолептической оценки молока и рассортировки его по кислотности предельным методом по ГОСТ 3624. Для проведения редуктазной пробы и пробы на наличие ингибирующих веществ из объединенной пробы молока выделяют пробу объемом 50—60 $см^3$.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

1.5.2. Молоко и сливки пастеризованные, сметана в транспортной таре

От продукции, попавшей в выборку после тщательного перемешивания стерильной мутовкой или черпаком, отбирают 50—60 $см^3$ продукта в стерильную посуду и закрывают стерильной пробкой.

1.5.3. Мороженое в транспортной таре

От продукции, попавшей в выборку, стерильной ложкой снимают верхний слой толщиной не менее 2,5 см, после чего стерильным щупом или ложкой отбирают пробу массой 40—50 г в стерильную посуду и закрывают стерильной пробкой.

Издание официальное ★ Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1984
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2009

1.5.4. Творог и творожные изделия

От продукции, попавшей в выборку в потребительской таре, отбирают для анализа 15—20 г (включая и поверхностный слой). Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

В продукции, попавшей в выборку в транспортной таре, перед отбором пробы верхний слой продукта зачищают. Пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3—5 см от края, направляя щуп наклонно к противоположной стороне и опуская на $^3/_4$ его длины. Из столбика продукта на щупе отбирают стерильным шпателем 15—20 г творога или творожных изделий и помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

1.5.5. Масло

От продукции, попавшей в выборку в потребительской таре, отбирают для анализа стерильным шпателем 15—20 г (включая поверхностный слой). Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

От продукции, попавшей в выборку в транспортной таре, пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3—5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская на $^3/_4$ его длины.

Из столбика масла на щупе отбирают стерильным шпателем 15—20 г масла и помещают в стерильную посуду. Оставшийся после отбора пробы столбик масла на щупе возвращают на прежнее место, а поверхность масла аккуратно заделывают.

1.5.6. Сыр

В продукции, попавшей в выборку, в намеченном месте отбора пробы поверхность сыра прижигают нагретым ножом или шпателем. Стерильный щуп вводят наклонно в середину головки на $^3/_4$ его длины. Из столбика сыра на щупе отбирают стерильным шпателем 15—20 г сыра и помещают в стерильную посуду с притертой или ватной пробкой или стерильную чашку Петри с крышкой. Верхнюю часть столбика сыра на щупе возвращают на прежнее место, поверхность сыра заливают подогретым до (110±10) °С парафином или оплавляют нагретой металлической пластиной.

1.5.7. Сыр плавленый

От продукции, попавшей в выборку, из разных мест сыра (включая поверхностный слой) профламбированным ланцетом отбирают на анализ 15—20 г продукта и помещают в стерильную посуду.

1.5.8. Сгущенные молочные консервы в транспортной таре

От продукции, попавшей в выборку, стерильной трубкой или черпаком отбирают на анализ 40—50 г продукта в стерильную посуду.

1.5.9. Сухие молочные продукты в транспортной таре

От продукции, попавшей в выборку, отбирают на анализ 40—50 г продукта в стерильную посуду с плотно закрывающейся крышкой или пробкой.

1.5.10. Молоко сгущенное стерилизованное

В продукции, попавшей в выборку, анализы проводят отдельно в каждой банке.

1.5.11. От молока и сливок пастеризованных, сметаны, мороженого, сгущенных молочных консервов, сухих молочных продуктов, попавших в выборку в потребительской таре, используют в качестве пробы для анализа по одной единице потребительской тары с продукцией.

(Введен дополнительно, Изм. № 1).

1.6. Посуду с пробой или пробу в потребительской таре снабжают этикеткой, на которой указывают:

номер пробы;

наименование и сорт продукта (при наличии);

номер и объем партии;

день и час отбора пробы;

должность и подпись лица, отобравшего пробу;

обозначение нормативного документа, по которому вырабатывался продукт.

1.7. Пробу, отправляемую в лабораторию вне данного предприятия, пломбируют или опечатывают и снабжают этикеткой, на которой указывают:

номер пробы;

наименование предприятия-изготовителя;

наименование и сорт продукта (при наличии);

номер и объем партии;

дату и час выработки продукта с момента окончания технологического процесса;

дату и час отбора проб;

должность и подпись лица, отобравшего пробу;

объем необходимых анализов;

обозначение нормативного документа, по которому вырабатывался продукт.

1.8. Микробиологические анализы продукта проводят не более чем через 4 ч с момента отбора проб.

1.9. Пробы должны храниться и транспортироваться до начала исследования в условиях, обеспечивающих температуру продуктов не выше 6 °С, не допуская подмораживания, а для мороженого – не выше минус 2 °С.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Весы лабораторные 2-го класса точности поверочная цена деления не более 0,001 г для взвешивания реактивов по ГОСТ 24104.

Весы лабораторные 4-го класса точности поверочная цена деления не более 0,05 г для приготовления навесок исследуемых образцов по ГОСТ 24104*.

Термометры стеклянные жидкостные (нертутные), диапазон измерения 0—100 °С, цена деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Термостат, позволяющий поддерживать температуру 15—55 °С с отклонением от заданной температуры ±1 °С.

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569** или автоклав горизонтальный.

Шкаф сушильный, позволяющий поддерживать температуру (160±5) °С.

Анализатор потенциометрический для контроля pH, диапазон измерения pH 3—8, погрешность измерения pH ±0,05 по ГОСТ 19881.

Редуктазник, позволяющий поддерживать температуру 25—55 °С.

Баня водяная.

Прибор для счета колоний бактерий.

Микроскоп световой биологический по нормативному документу или других аналогичных марок.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Спиртовка по ГОСТ 23932.

Петля бактериологическая.

Лупа складная карманная по ГОСТ 25706.

Пробки резиновые конусные по нормативному документу.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Пергамент по ГОСТ 1341.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Кастрюли разные по ГОСТ 17151.

Пробойник.

Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Бюретки исполнения 1, 2, 3-го классов точности, вместимостью 5, 10, 50 $см^3$, цена деления 0,1 $см^3$.

Пипетка исполнения 1, 4, 5, 6, 7; 1 и 2-го классов точности, вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$.

Стаканчики для взвешивания (бюксы) типов СВ и СН по ГОСТ 25336.

Колбы исполнения 2, вместимостью 50, 100, 200, 500, 1000 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

Цилиндры исполнения 1 и 2, вместимостью 50, 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Поплавки стеклянные.

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

Ступки лабораторные фарфоровые по ГОСТ 9147.

Ланцет.

---

* С 1 июля 2002 г. действует ГОСТ 24104—2001.

** На территории Российской Федерации действует Р 51935—2002 (ЕН 285—96).

Натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363, раствор с массовой концентрацией 10 г/дм^3.

Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156, раствор с массовой концентрацией 100 г/дм^3.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962* и спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300, 96%-ный раствор.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198.

Кислота соляная по ГОСТ 3118.

Магний сернокислый по ГОСТ 4523.

Кристаллический фиолетовый по нормативному документу, раствор с массовой концентрацией 10 г/дм^3.

Метиленовый голубой, индикатор по нормативному документу или аналогичный производства Индии.

Резазурино-натриевая соль по нормативному документу или резазурин в таблетках производства ГДР.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода питьевая по ГОСТ 2874**.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Желчь бычья и других сельскохозяйственных животных (нативная) по нормативному документу.

Среда сухая Кесслер по нормативному документу.

Среда агаровая модифицированная для определения общего количества бактерий в молоке и молочных продуктах по нормативному документу.

Лактоза по нормативному документу.

Порошок сычужный по нормативному документу.

Бумажки индикаторные по нормативному документу или зарубежного производства.

Индикатор универсальный.

(Измененная редакция, Изм. № 1, 2, 3, 4).

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Подготовка посуды и материалов

3.1.1. Всю новую посуду, предназначенную для бактериологических работ, кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты с объемной долей 1—2%) в течение 15 мин и затем ополаскивают дистиллированной водой.

Вымытую посуду стерилизуют в сушильном шкафу при (160±5) °С в течение 2 ч или в автоклаве при (121±2) °С в течение (30±1) 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 автоклаве завернутыми в бумагу. При отсутствии аппаратуры для стерилизации (для определения редуктазы, бродильной и сычужно-бродильной проб) посуду, пипетки и пробы непосредственно перед испытанием кипятят в дистиллированной воде или конденсате не менее 30 мин. Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками.

3.2. Приготовление питательных сред и реактивов

3.2.1. Приготовление раствора хлористого натрия

Состав:

хлористый натрий — 8,5 г;

питьевая вода — 1000 см^3.

В 1000 см^3 питьевой воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, разливают раствор в чистые пробирки диаметром 21 мм по 10 см^3, а в колбы — по 93 см^3 и стерилизуют при (121±2) °С в течение (20±1) мин. После стерилизации в пробирках должно остаться 9 см^3 раствора хлористого

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

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

натрия, а в колбах 90 см³ (количество, которое необходимо для приготовления разведений из посевного материала).

3.2.2. Приготовление концентрированного раствора фосфатного буфера

Состав:

однозамещенный фосфорнокислый калий — 34 г;
дистиллированная вода — 1000 см³.

В 500 см³ дистиллированной воды растворяют 34 г однозамещенного фосфорнокислого калия. Устанавливают pH 7,2 раствором гидроокиси натрия и добавляют дистиллированной воды в мерную колбу до 1000 см³.

3.2.3. Приготовление разбавленного раствора фосфатного буфера

1,25 см³ концентрированного раствора фосфатного буфера вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой, разливают в пробирки по 10 см³ и колбы по 93 см³ и стерилизуют при (121±2) °С в течение (15±1) мин и используют для приготовления разведений.

3.2.4. Приготовление раствора лимоннокислого натрия для приготовления разведений сыра

Состав:

лимоннокислый натрий — 20 г;
дистиллированная вода — 1000 см³.

В 1000 см³ дистиллированной воды растворяют 20 г лимоннокислого натрия, разливают в пробирки по 10 см³ и колбы по 93 см³ и стерилизуют при (121±2) °С в течение (15±1) мин.

3.2.5. Приготовление раствора двууглекислого натрия для нейтрализации проб кисломолочных продуктов и закваски

В 100 см³ дистиллированной воды растворяют 10 г двууглекислого натрия, разливают по 10—20 см³ в пробирки и стерилизуют при (121±2) °С в течение 15 мин.

3.2.6. Приготовление питательной среды для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Состав:

гидролизованное молоко — 25 г;
агар — 15 г;
питьевая вода — до 1000 см³.

40 г сухой питательной среды помещают в колбу и доливают питьевой водой до 1000 см³. Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара (при наличии осадка профильтровывают), устанавливают pH 6,8—7,0. Разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при (121±2) °С в течение (15±1) мин.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

3.2.7. Приготовление среды Кесслер (модифицированной)

Состав:

пептон	— 10 г;
стерильная желчь	— 50 см³;
лактоза	— 2,5 г;
раствор кристаллического фиолетового с массовой концентрацией 10 г/дм³	— 2 см³;
дистиллированная вода	— до 1000 см³.

16 г сухой среды Кесслер помещают в колбу и доливают питьевой водой до 1000 см³. Смесь размешивают и кипятят при помешивании (25±5) мин. Объем доводят питьевой водой до 1000 см³ и фильтруют через вату. Разливают в пробирки с поплавками по 5 см³ или колбочки с поплавками по 40—50 см³ и стерилизуют при (121±2) °С в течение (10±1) мин.

Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет.

Допускается приготовление среды Кесслер из отдельных ингредиентов.

Для этого к 1000 см³ питьевой воды прибавляют 10 г пептона и 50 см³ стерильной желчи (желчь бычья или других сельскохозяйственных животных), кипятят смесь при помешивании (25±5) мин и

фильтруют ее через вату. В полученном фильтрате растворяют 2,5 г лактозы и доводят объем питьевой водой до 1000 см³, устанавливают реакцию среды (pH 7,4—7,6), после чего добавляют 2 см³ раствора кристаллического фиолетового с массовой концентрацией 10 г/дм³, разливают в пробирки с поплавками по 5 см³ или колбочки с поплавками по 40—50 см³ и стерилизуют при (121±2) °С в течение (10±1) мин. Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет.

3.2.8—3.2.12. **(Исключены, Изм. № 3).**

3.2.13. Приготовление раствора сычужного фермента

0,5 г сычужного порошка растворяют в 100 см³ воды, нагретой до (30±2) °С.

3.2.14. Приготовление реактивов из метиленового голубого

3.2.14.1. *Приготовление спиртового раствора метиленового голубого для окраски препаратов*

10 г метиленового голубого смешивают со 100 см³ 96%-ного раствора этилового спирта. Раствор ставят в термостат при температуре (37±1) °С на 24 ч, а затем фильтруют в термостате при той же температуре.

Срок хранения раствора метиленового голубого в термостате при температуре (37±1) °С не более 3 мес.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

3.2.14.2. **(Исключен. Изм. № 2).**

3.2.14.3. *Приготовление краски для препаратов*

К 30 см³ спиртового раствора метиленового голубого прибавляют 100 см³ дистиллированной воды и 1 см³ раствора гидроокиси калия с массовой концентрацией 10 г/дм³.

(Измененная редакция, Изм. № 2).

3.2.14.3а. Для проведения редуктазной пробы с метиленовым голубым готовят водный раствор с массовой концентрацией метиленового голубого 0,005 г/см³. Для этого 0,5 г метиленового голубого переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки прокипяченной и охлажденной до (25±2) °С дистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают до полного растворения. Срок хранения приготовленного раствора не более 12 мес в банках, защищенных от света.

Для приготовления раствора метиленового голубого с массовой концентрацией метиленового голубого 0,00015 г/см³ берут 6 см³ раствора с массовой концентрацией 0,005 г/см³ и смешивают со 194 см³ дистиллированной воды. Срок хранения приготовленного раствора не более 30 сут в холодильнике.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

3.2.15. Приготовление раствора резазурина

Основной раствор резазурина-натриевой соли для редуктазной пробы готовят следующим образом: 100 мг резазурина-натриевой соли переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³ и доводят до метки прокипяченной и охлажденной до (25±2) °С дистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают.

Срок хранения основного раствора резазурина-натриевой соли не более 30 сут при температуре 8—10 °С.

Рабочий раствор резазурина-натриевой соли готовят разбавлением основного раствора прокипяченной и охлажденной до (25±2) °С дистиллированной водой в соотношении 1:2,5 (например, к 10 см³ основного раствора прибавляют 25 см³ воды). Массовая доля резазурина в рабочем растворе 0,014 %.

При использовании резазурина в таблетках (производства ГДР) для приготовления рабочего раствора 1 таблетку растворяют в 50 см³ прокипяченной и охлажденной до (25±2) °С дистиллированной воды. Массовая доля резазурина в этом растворе 0,01 %.

Срок хранения рабочего раствора резазурина не более 3 сут при температуре 0—5 °С.

Основной и рабочий раствор хранят в банках, защищенных от света.

3.2.16. Определение pH среды

Определение pH питательной среды проводят с помощью pH-метра по прилагаемым к ним инструкциям.

Ориентировочное определение pH питательных сред может проводиться с помощью индикаторных бумажек или готового универсального индикатора.

3.3. Подготовка проб к анализу

3.3.1. Молоко, сливки, сметана

Отобранные пробы перед исследованием тщательно перемешивают.

3.3.2. Кисломолочные напитки и продукты, закваски

Отобранные пробы перед исследованием перемешивают и нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 $см^3$ исследуемого продукта или закваски в стерильную пробирку или колбочку и добавляют 1 $см^3$ стерильного раствора двууглекислого натрия с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$, содержимое перемешивают.

3.3.3. Мороженое

Отобранные пробы фасованного мороженого развертывают и помещают в стерильную посуду с притертой или ватной пробкой.

Перед исследованием посуду с пробой нагревают в водяной бане при температуре 40—45 °С до расплавления пробы.

3.3.4. Сыр, творог, творожные изделия

10 г сыра, творога или творожных изделий взвешивают на стерильном часовом стекле, чашке Петри, в бюксе, переносят в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую крышкой от чашки Петри, и тщательно растирают.

3.3.5. Масло

Перед исследованием пробу расплавляют на водяной бане при температуре 40—45 °С и перемешивают до получения однородной эмульсии.

3.3.6. Сгущенные молочные консервы

Банки с продуктом тщательно промывают щеткой в чистой теплой воде и вытирают.

Перед вскрытием крышку банки, пробку бочки и часть днища вокруг пробки фламбируют.

Открывают банки стерильным консервным ножом, а пробку бочки пробойником. После вскрытия отверстия банки и бочки немедленно закрывают стерильным пергаментом, профламбированной жестяной крышкой или крышкой чашки Петри. Содержимое банки тщательно перемешивают стерильной ложкой. Затем взвешивают стерильную сухую колбу и в нее помещают 10 г продукта.

3.3.7. Сухие молочные продукты

Отобранную пробу тщательно перемешивают стерильной ложкой, взвешивают 10 г продукта на кусочке стерильного пергамента, на чашке Петри, в бюксе, затем взвешенную пробу помещают в стерильную колбу или другую посуду.

3.4. Приготовление разведения продуктов для посева

3.4.1. Перед посевом готовят десятикратные разведения продукта в стерильных растворах хлористого натрия, лимоннокислого натрия (для сыров) или фосфатного буфера. Для приготовления разведений готовят все необходимые стерильные материалы и посуду в соответствии со спецификой анализа исследуемого продукта: пробирки с 9 $см^3$ или колбы с 90 $см^3$ растворов хлористого натрия или фосфатного буфера.

3.4.2. Из проб молока, сливок, сметаны, кисло-молочных напитков и продуктов, мороженого, масла отбирают стерильной пипеткой 10 $см^3$ и вносят в 90 $см^3$ стерильных растворов хлористого натрия или фосфатного буфера. Получают разведение 1:10.

Масло и мороженое вносят в растворы хлористого натрия или фосфатного буфера, подогретые до 40—45 °С.

3.4.3. К приготовленным навескам по 10 г творога, творожных изделий; сгущенных молочных консервов и сухих молочных продуктов добавляют 90 $см^3$ стерильных растворов хлористого натрия или фосфатного буфера, подогретых до 40—45 °С, и взбалтывают в течение 3—5 мин до возможно более полного эмульгирования. Получают разведение 1:10.

К навеске сыра 10 г постепенно добавляют 90 $см^3$ стерильных растворов хлористого натрия или лимоннокислого натрия или фосфатного буфера, подогретых до 40—45 °С, и тщательно перемешивают до полного эмульгирования. Получают разведение 1:10.

Из первого разведения 1:10 готовят последующие 1:100 и т. д.

Для приготовления каждого разведения берут новую стерильную пипетку. При посеве на чашки Петри посевной материал вносят от большего разведения к меньшему. В этом случае пользуются одной пипеткой.

4. МЕТОДЫ АНАЛИЗА

4.1. Метод определения редуктазы с метиленовым голубым

4.1.1. Сущность метода

Метод основан на восстановлении метиленового голубого окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности обесцвечивания метиленового голубого оценивают бактериальную обсемененность сырого молока.

4.1.2. Проведение анализа

В пробирки наливают по 1 см^3 рабочего раствора метиленового голубого и по 20 см^3 исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирок.

Пробирки помещают в редуктазник с температурой воды (37±1) °С.

При отсутствии редуктазника можно пользоваться водяной баней, помещаемой в термостат с температурой (37±1) °С.

Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Температуру воды поддерживают в течение всего времени определения (37±1) °С. Для предотвращения влияния на реакцию света редуктазник должен быть плотно закрыт крышкой. Момент погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Наблюдение за изменением окраски ведут через 40 мин, 2,5 и 3,5 ч с начала проведения анализа. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока. При этом остающийся небольшой кольцеобразный окрашенный слой вверху (шириной не более 1 см) или небольшая окрашенная часть внизу пробирки (шириной не более 1 см) в расчет не принимаются. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают.

4.1.3. Обработка результатов

В зависимости от продолжительности обесцвечивания молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 1.

Таблица 1

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания, ч	Ориентировочное количество бактерий в 1 см^3 молока, КОЕ
Высший	Более 3,5	До 300 тыс.
I	3,5	От 300 тыс. до 500 тыс.
II	2,5	От 500 тыс. до 4 млн.
III	40 мин	От 4 млн. до 20 млн.

4.1.2, 4.1.3. **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

4.2. Метод определения редуктазы с резазурином

4.2.1. Сущность метода

Метод основан на восстановлении резазурина окислительно-восстановительными ферментами, выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности изменения окраски резазурина оценивают бактериальную обсемененность сырого молока.

4.2.2. Проведение анализа

Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения.

В пробирки наливают по 1 см^3 рабочего раствора резазурина и по 10 см^3 исследуемого молока, закрывают резиновыми пробками и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирок. Пробирки помещают в редуктазник с температурой воды (37±1) °С.

При отсутствии редуктазника можно использовать водяную баню, помещенную в термостат с температурой (37±1) °С.

Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше, ее поддерживают в течение всего времени определения (37±1) °С.

Пробирки с молоком и резазурином на протяжении анализа должны быть защищены от света прямых солнечных лучей (редуктазник должен быть плотно закрыт крышкой).

Время погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа.

Показания снимают через 1 и 1,5 ч.

Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают.

По истечении 1 ч пробирки вынимают из редуктазника. Пробирки с молоком, имеющие серо-сиреневую окраску до сиреневой со слабым серым оттенком, оставляют в редуктазнике еще на 30 мин.

4.2.3. Обработка результатов

В зависимости от продолжительности обесцвечивания или изменения цвета молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 2 и приложении.

Таблица 2

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания или изменения цвета, ч	Окраска молока	Ориентировочное количество бактерий в 1 см³ молока, КОЕ
Высший	1,5	Серо-сиреневая до сиреневой со слабым серым оттенком	До 300 тыс.
I	1	Серо-сиреневая до сиреневой со слабым серым оттенком	От 300 тыс. до 500 тыс.
II	1	Сиреневая с розовым оттенком или ярко-розовая	От 500 тыс. до 4 млн.
III	1	Бледно-розовая или белая	От 4 млн. до 20 млн.

Молоко, имеющее через 1,5 ч окраску, соответствующую 1-му классу (согласно приложению), относят к высшему классу.

4.2.2, 4.2.3. **(Измененная редакция, Изм. № 2).**

4.3. Проба на брожение

4.3.1. Сущность метода

Метод основан на способности некоторых микроорганизмов, присутствующих в молоке, свертывать его. В зависимости от времени свертывания и характера образовавшегося сгустка оценивают состав микрофлоры молока и пригодности его для производства сыра.

Проба применяется при определении пригодности молока для производства сыра.

4.3.2. Проведение анализа

В чисто вымытые широкие пробирки, хорошо просушенные и ополоснутые два-три раза тем же молоком, из которого отбирают пробу, наливают около 20 см³ молока. Пробирки закрывают ватными пробками и ставят в термостат при температуре (38±1) °С на 24 ч.

4.3.3. Обработка результатов

Через 12 ч после помещения пробирок в термостат или водяную баню производят первичный осмотр проб.

Если молоко не свернулось или лишь начинает свертываться, оно считается хорошим. Если свернулось и сгусток вспученный — плохое.

Вторично пробы просматривают спустя еще 12 ч и на основании этого просмотра относят молоко к одному из четырех классов, указанных в табл. 3.

Таблица 3

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Начало свертывания без выделения сыворотки и пузырьков газа; незначительные полоски на сгустке
II	Удовлетворительное	Сгусток с полосками и пустотами, заполненными сывороткой; сгусток стягивается со слабым выделением сыворотки, структура сгустка мелкозернистая
III	Плохое	Сгусток с обильным выделением зеленоватой или беловатой сыворотки; сгусток крупнозернистый; наблюдают пузырьки газа в сгустке или сливочном слое
IV	Очень плохое	Сгусток разорван и пронизан пузырьками газа; вспучен, как губка

4.4. **Сычужно-бродильная проба**

4.4.1. Сущность метода

Метод основан на способности некоторых микроорганизмов и сычужного фермента свертывать молоко. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество молока на его пригодность для производства сыра.

Для постановки сычужно-бродильной пробы используют сычужный порошок из сычугов телят и ягнят-молочников, соответствующий по показателям качества:

Общая молокосвертывающая активность 1 г сычужного порошка, усл. ед.	100000±20000
Активность за счет доли говяжьего пепсина от общей молокосвертывающей активности сычужного порошка, %	30,0
Массовая доля влаги, %, не более	2,0
Массовая доля поваренной соли, %, не менее	90,0
Массовая доля нерастворимого остатка, %, не более	2,5
Общее количество бактерий в 1 г сычужного порошка, колоний образующих единиц (к. о. е.), не более	6000
Бактерии группы кишечных палочек в 1 г сычужного порошка	Не допускаются
Патогенные микроорганизмы:	
сальмонеллы в 25 г сычужного порошка	Не допускаются
клостридии перфрингенс в 1 г сычужного порошка	Не допускаются

(Измененная редакция, Изм. № 4).

4.4.2. Проведение анализа

В чисто вымытые широкие пробирки, хорошо просушенные и ополоснутые два-три раза тем молоком, из которого отбирают пробу, наливают около 30 см^3 молока, затем вносят в каждую пробирку по 1 см^3 раствора сычужного фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в водяную баню или термостат при (38±1) °С, после чего вынимают из бани и осматривают.

4.4.3. Обработка результатов

По истечении 12 ч пробы осматривают и относят молоко к одному из трех классов, указанных в табл. 4.

Таблица 4

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и не горькая на вкус
II	Удовлетворительное	Сгусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1—10), разорван, но не вспучен
III	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл кверху или вместо сгустка образуется хлопьевидная масса

4.5. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

(Измененная редакция, Изм. № 3)

4.5.1. Сущность метода

Метод основан на способности мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при (30±1) °С в течение 72 ч.

4.5.2. Проведение анализа

4.5.2.1. *Выбор разведений для посева*

Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения в соответствии с табл. 5.

4.5.2.2. *Посев*

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов выбирают те разведения, при посевах которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний. Из каждой пробы делают посев на две-три чашки из разведений, указанных в табл. 5. Каждое из разведений должно быть засеяно в количестве 1 см^3 в одну чашку Петри с заранее маркированной крышкой и залито 10—15 см^3 расплавленной и охлажденной до температуры 40—45 °С питательной средой для определения количества мезофильных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Допускается посев исследуемого продукта на чашки Петри из одного и того же разведения в количестве 1 и 0,1 см^3. Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого вращательного покачивания для равномерного распределения посевного материала.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

4.5.2.3. *Выращивание*

После застывания агара чашки Петри перевертывают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой (30±1) °С на 72 ч.

Таблица 5

Наименование продукта	Засеваемые объем или масса, см^3 или г		
Молоко и сливки сырые	0,0001	0,00001	0,000001
Масло сладкосливочное, вологодское, крестьянское, любительское, бутербродное	0,01	0,001	0,0001
Молоко и сливки пастеризованные	0,1	0,01	0,001
Молоко или сливки сгущенные с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром	0,1	0,01	0,001
Молоко сухое, сливки сухие, ЗЦМ, молочно-картофельное пюре	0,01	0,001	
Мороженое, молочные коктейли	0,1	0,01	
Плавленый сыр	0,1	0,01	0,001
Лактоза	0,1	0,01	

(Измененная редакция, Изм. № 2).

4.5.3. Обработка результатов

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4—10 раз. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. При подсчете колоний рекомендуется пользоваться счетчиками.

При большом числе колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на двух-трех секторах (но не менее чем на $^1/_3$ поверхности чашки), находят среднеарифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см^3 или 1 г продукта (X) в единицах вычисляют по формуле

$$X = n \cdot 10^m,$$

где n — количество колоний, подсчитанных на чашке Петри;

m — число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое, полученное по всем чашкам.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

4.6. Определение бактерий группы кишечных палочек (БГКП)

4.6.1. *Сущность метода.* Метод основан на способности БГКП (бесспоровые грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, в основном, являющиеся представителями родов эшерихий, цитробактер, энтеробактер, клебсиелла, серация) сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при (37±1) °С в течение 24 ч.

4.6, 4.6.1. **(Измененная редакция, Изм. № 3).**

4.6.2. Проведение анализа

4.6.2.1. *Посев в среду Кесслер*

В среду Кесслер производят посев в количествах, указанных в табл. 6.

Таблица 6

Наименование продукта	Засеваемый объем или масса продукта, $см^3$ или г	Количество пробирок или колбочек со средой засеваемых из каждого разведения
Молоко и сливки сырые	От 0,1 до 0,00001	1
Молоко и сливки, отобранные после пастеризации	10	1
Молоко и сливки пастеризованные, молоко с наполнителями, кисломолочные продукты и напитки с наполнителями и без наполнителей, ЗЦМ жидкий	1; 0,1; 0,01	1
Мороженое	0,1	1
Масло	1; 0,1; 0,01	1
Сыр после прессования	От 0,001 до 0,00001	1
Сыр зрелый (или в конце созревания)	От 0,1 до 0,001	1
Творог, сыр домашний, творожные изделия	От 0,1 до 0,00001	1
Сметана, паста ацидофильная	От 0,1 до 0,0001	1
Закваска кефирная	3	1
Закваска на чистых культурах	10	1
Молоко и сливки сгущенные с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром:		
в потребительской таре	1	1
в транспортной таре	0,1	1
Молоко сухое, сливки сухие, лактоза, молочно-картофельное пюре, ЗЦМ и другие сухие продукты	0,1	1

По 1 $см^3$ соответствующих разведений продукта засевают в пробирки с 5 $см^3$ среды Кесслер. Посев 10 $см^3$ пастеризованного молока, отобранного после пастеризатора, 10 $см^3$ закваски на чистых культурах, 3 $см^3$ кефирной закваски или 10 $см^3$ разведения 1:10 сгущенного молока и сливок с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром в потребительской таре производится в колбочки с 40—50 $см^3$ среды Кесслер.

(Измененная редакция, Изм. № 2, 3).

4.6.2.2 *Выращивание и обработка результатов*

Пробирки или колбы с посевами помещают в термостат при (37±1) °С на 18—24 ч.

При исследовании мороженого пробирки с посевом выдерживают в термостате при (37±1) °С в течение 48 ч.

Просматривают пробирки или колбы с посевами. При отсутствии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии в нем БГКП.

При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в нем.

(Измененная редакция, Изм. № 3).

4.6.2.3—4.6.3.2. **(Исключены, Изм. № 3).**

4.7. Метод микроскопирования

4.7.1. Сущность метода

Метод основан на просмотре препаратов, окрашенных метиленовым голубым, под микроскопом для ориентировочной характеристики микрофлоры кисломолочных продуктов.

4.7.2. Проведение анализа

Для приготовления препарата на чистое предметное стекло наносят петлей небольшую каплю исследуемого материала и распределяют на площади около 1 $см^2$. При исследовании творога и творожных изделий на стекло наносят каплю воды, вводят в нее петлей продукт, тщательно перемешивают и растирают на площади 1 $см^2$. Препарат высушивают при комнатной температуре, фиксируют на пламени горелки и красят метиленовым голубым.

4.7.3. Ориентировочный состав микрофлоры исследуемых продуктов определяют по табл. 9.

Таблица 9*

Наименование продуктов	Ориентировочный состав микрофлоры
Творог, сметана, сыр домашний, простокваша обыкновенная, напитки:	Молочнокислые стрептококки
«Новинка», «Любительский», «Русский», «Юбилейный», «Славянский»	Молочнокислые стрептококки
Ацидофильное молоко, ацидофильная паста, напиток «Московский»	Молочнокислые палочки
Ацидофильно-дрожжевое молоко, ацидофильно-дрожжевой напиток, кумыс, напиток «Прохлада»	Молочнокислые палочки, дрожжи
Простокваша мечниковская, южная, слоеная, йогурт, «Молодость», напитки: «Южный», «Снежок», «Российский», «Коломенский», ряженка, варенец, пахта «Идеал», пахта диетическая, сметана ацидофильная	Молочнокислые стрептококки и палочки
Ацидофилин	Молочнокислые стрептококки и палочки, возможно наличие дрожжей
Кефир, напиток «Здоровье»	Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи

* Табл. 7 и 8. (Исключены, Изм. № 3).

(Измененная редакция, Изм. № 2).

4.8. Метод определения промышленной стерильности

4.8.1. Сущность метода

Метод основан на способности микроорганизмов, выдержавших стерилизацию, размножаться в стерилизованном молоке при оптимальных режимах термостатирования и вызывать в нем органолептические и физико-химические изменения.

4.8.2. Проведение анализа

Отобранные банки со сгущенным стерилизованным молоком выдерживают в термостате при (37±1) °С в течение 6 сут. По истечении срока термостатной выдержки банки с продуктом охлаждают до (20±5) °С и подвергают внешнему осмотру. При наличии вздутия крышки или донышка, не опадающего при нажатии пальцами, банку с продуктом считают бомбажной и отмечают в книге анализов.

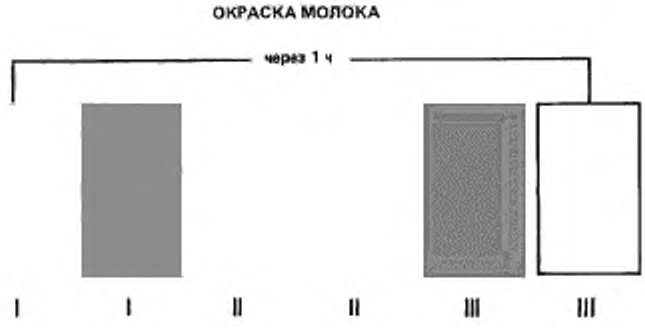
4.8.3. Банки без внешних дефектов вскрывают, сгущенное стерилизованное молоко анализируют органолептически и по показателям титруемой кислотности приготовляют микроскопический препарат.

4.8.4. Обработка результатов

В сгущенном стерилизованном молоке после термостатирования не должно происходить органолептических и физико-химических изменений, а в микроскопическом препарате не должно отмечаться бактериальных клеток.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Обязательное

ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАССА МОЛОКА ПО РЕДУКТАЗНОЙ ПРОБЕ С РЕЗАЗУРИНОМ



(Измененная редакция, Изм. № 2).

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством мясной и молочной промышленности СССР

РАЗРАБОТЧИКИ

В. Ф. Семенихина, канд. биол. наук; **И. В. Рожкова**, канд. техн. наук; **В. М. Карташова,** д-р вет. наук; **А. С. Гусева**; канд. вет. наук

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 24.09.84 № 3280

Изменение № 4 принято Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 11 от 25.04.97)

Зарегистрировано Техническим секретариатом МГС № 2462

За принятие изменения проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Республики Беларусь
Кыргызская Республика	Кыргызстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Главная государственная инспекция Туркменистана
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины

3. ВЗАМЕН ГОСТ 9225—68 кроме части примечания к п.1.5

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 1341—97	2	ГОСТ 13739—78	2
ГОСТ 1770—74	2	ГОСТ 13805—76	2
ГОСТ 2156—76	2	ГОСТ 13928—84	1.1
ГОСТ 2874—82	2	ГОСТ 14919—83	2
ГОСТ 3118—77	2	ГОСТ 17151—81	2
ГОСТ 3622—68	1.1	ГОСТ 17206—96	2
ГОСТ 3624—92	1.5.1	ГОСТ 18300—87	2
ГОСТ 4198—75	2	ГОСТ 19569—89	2
ГОСТ 4233—77	2	ГОСТ 19881—74	2
ГОСТ 4328—77	2	ГОСТ 22280—76	2
ГОСТ 4523—77	2	ГОСТ 23932—90	2
ГОСТ 5556—81	2	ГОСТ 24363—80	2
ГОСТ 5962—67	2	ГОСТ 24104—88	2
ГОСТ 6709—72	2	ГОСТ 25336—82	2
ГОСТ 9147—80	2	ГОСТ 25706—83	2
ГОСТ 9284—75	2	ГОСТ 26809—86	1.1
ГОСТ 12026—76	2	ГОСТ 28498—90	2

5. Ограничение срока действия снято Постановлением Госстандарта СССР от 29.12.91 № 2330

6. ИЗДАНИЕ (август 2009 г.) с Изменениями № 1, 2, 3, 4, утвержденными в феврале 1986 г., сентябре 1989 г., декабре 1990 г., августе 1997 г. (ИУС 6—86, 1—90, 4—91, 11—97)

gost.e-ecolog.ru