ГОСТ 30712—2001

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ БЕЗАЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Методы микробиологического анализа

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности (ВНИИ ПБиВП), Техническим комитетом ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность», Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 91 «Пивобезалкогольная и винодельческая продукция»

ВНЕСЕН Госстандартом России

2 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 19 от 24 мая 2001 г.)

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа по стандартизации
Азербайджанская Республика	Азгосстандарт
Республика Армения	Армгосстандарт
Республика Беларусь	Госстандарт Республики Беларусь
Грузия	Грузстандарт
Республика Казахстан	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызская Республика	Кыргызстандарт
Республика Молдова	Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикстандарт
Туркменистан	Главгосслужба «Туркменстандартлары»
Республика Узбекистан	Узгосстандарт
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Государственного комитета Российской Федерации по стандартизации и метрологии от 31 июля 2001 г. № 304-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 30712—2001 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 1 июля 2002 г.

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2010 г.

© ИПК Издательство стандартов, 2001
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Российской Федерации без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ БЕЗАЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Методы микробиологического анализа

Products of non-alcoholic industry.
Methods of microbiological analysis

Дата введения 2002—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты безалкогольной промышленности (безалкогольные и слабоалкогольные напитки, сиропы, концентраты напитков в потребительской таре, напитки на зерновом сырье) и устанавливает методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), дрожжей и плесневых грибов.

Методы предназначены для определения количества микроорганизмов:

- посевом в агаризованные питательные среды жидкого продукта, содержащие в 1 $см^3$ более 15 или в 1 г твердого продукта более 150 колониеобразующих единиц (КОЕ);
- посевом на агаризованные питательные среды жидкого продукта, содержащего в 1 $см^3$ более 150 КОЕ, а с применением мембранной фильтрации в продуктах, содержащих в нормируемом объеме 100 и более КОЕ.

(Поправка).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1341—97 Пергамент растительный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2874—82* Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4159—79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4232 — 74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962—67** Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6672—75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412—93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10444.1—84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

* На территории Российской Федерации действуют СанПиН 2.1.4.1074—2001 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», ГОСТ Р 51232—98

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

Издание официальное

ГОСТ 10444.12—88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10444.15—94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739—78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытания

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206—96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18481—81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 19569—89* Стерилизаторы паровые медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24104—88** Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

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

ГОСТ 25706—83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26668—85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26669—85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670—91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

ГОСТ 28498—91 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29225—91 (ИСО 1775—75) Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные. Общие требования и методы испытаний

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

ГОСТ 29228—91 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 29229—91 (ИСО 835-3—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 3. Пипетки градуированные с временем ожидания 15 с

ГОСТ 29230—91 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 30518—97/ГОСТ Р 50474—93*** Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 30519—97/ГОСТ Р 50480—93*4 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Sallmonella.

3 Отбор и подготовка проб

3.1 Отбор проб по ГОСТ 26668 со следующим дополнением:

Перед взятием пробы готового напитка пробку и горловину бутылки, поверхность металлической банки или другой упаковки протирают ватным тампоном, смоченным в 70 %-м растворе этилового спирта по ГОСТ 5962. Затем стерильным ключом быстро снимают кроненпробку или пробку бутылки отвинчивают. Горловину открытой бутылки обжигают в пламени спиртовки или протирают 70 %-м раствором этилового спирта по ГОСТ 5962 и отбирают необходимый для анализа объем напитка.

Не допускается обжигать над пламенем стеклянную бутылку с газированным напитком, закупоренную кроненпробкой, так как она может взорваться.

3.2 Подготовка проб — по ГОСТ 26669.

---

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

** С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

*** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52816—2007.

*4 На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52814—2007.

4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы

4.1 При проведении испытаний используют:

автоклав или стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569;

весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, 3-го класса точности по ГОСТ 24104;

прибор вакуумного фильтрования;

термостаты любого типа, обеспечивающие поддержание заданной температуры от 24 до 55 °С с допустимой погрешностью ±1 °С;

шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий температуру нагрева 100 – 200 °С;

pH-метр или потенциометр;

микроскоп световой биологический любого типа, обеспечивающий увеличение 900 — 1000×;

ареометр-сахаромер по ГОСТ 18481;

холодильник по ГОСТ 16317;

плитку электрическую с закрытой спиралью по ГОСТ 14919;

баню водяную;

фильтры мембранные для микробиологических целей;

пинцеты медицинские по ГОСТ 21241;

шпатели металлические и стеклянные;

термометры жидкостные стеклянные (нертутные) диапазоном измерений от 0 до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;

лупу по ГОСТ 25706;

спиртовку по ГОСТ 25336;

сетку асбестовую;

петли бактериологические;

чашки фарфоровые по ГОСТ 29225;

ключ для вскрытия бутылок;

колбы К, П, Кн вместимостью 50, 100, 250, 500 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336;

пробирки П1, П2, П2Т по ГОСТ 25336;

пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10, 25 $см^3$ по ГОСТ 29227, ГОСТ 29228, ГОСТ 29229, ГОСТ 29230;

стаканы типов В и Н вместимостью 100, 150, 250, 400, 600, 800, 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336;

стаканчики для взвешивания (бюксы) типов СВ или СН по ГОСТ 25336;

стекла часовые;

кюветы для окрашивания препаратов;

стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;

стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;

цилиндры мерные вместимостью от 25 до 2000 $см^3$ по ГОСТ 1770;

шарики стеклянные, используемые для обеспечения равномерности кипения;

чашки биологические (Петри) по ГОСТ 25336;

марлю медицинскую по ГОСТ 9412;

вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;

пергамент по ГОСТ 1341;

бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;

агар микробиологический по ГОСТ 17206;

агар сухой питательный;

среду сухую Кесслер;

среду сухую Эндо;

среду сухую Сабуро;

сусло пивное неохмеленное;

масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739;

бумагу индикаторную универсальную;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;

воду питьевую по ГОСТ 2874;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

калий йодистый по ГОСТ 4232;

йод по ГОСТ 4159;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
кислоту соляную по ГОСТ 3118;
кристаллический фиолетовый;
фуксин основной.

Допускается использование других средств измерений, вспомогательных устройств, реактивов, материалов, по техническим характеристикам не уступающих указанным выше.

5 Подготовка к проведению анализов

5.1 Подготовка посуды

5.1.1. Новую посуду, предназначенную для микробиологических работ, кипятят в подкисленной воде (раствор соляной кислоты объемной долей 1–2 %) в течение 15 мин, затем ополаскивают дистиллированной водой до полного удаления следов моющего раствора и высушивают в сушильном шкафу.

5.1.2 Пробирки, колбы, бутылки закрывают ватно-марлевыми пробками, покрывают колпачком так, чтобы исключить загрязнение после стерилизации в процессе работы и хранения. Пипетки со вставленными тампонами из ваты упаковывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бактериологические чашки в закрытом виде укладывают в металлические пеналы или заворачивают в бумагу. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации. Режимы стерилизации посуды — по ГОСТ 26668.

5.1.3 Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками.

5.1.4 Посуду с питательными средами после подсчета на них колоний микроорганизмов обеззараживают перед мойкой путем стерилизации в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 30 мин или кипячением в течение 1 ч.

5.2 Приготовление реактивов и растворов

5.2.1 Реактивы для окраски по Грамму (модификация Г.П. Калины) — по ГОСТ 10444.1.

Приготовление реактива 1

В 100 см^3 96 %-го ректификованного спирта по ГОСТ 5962 растворяют 0,5 г кристаллического фиолетового.

Приготовление реактива 2

К 96 см^3 спиртового раствора йодистого калия массовой концентрации 5 г/дм^3 добавляют 2 см^3 спиртового раствора основного фуксина массовой концентрации 50 г/дм^3 и 2 см^3 спиртового раствора йода массовой концентрации 50 г/дм^3.

Йодистый калий растворяют в спирте на водяной бане при температуре (45 ± 5) °С при постоянном помешивании.

5.2.2 Раствор гидроокиси натрия концентрации 100 г/дм^3 по ГОСТ 10444.1 (4.17). Готовый раствор стерилизуют при (120 ± 1) °С в течение 20 мин.

Раствор применяется для подщелачивания питательных сред.

5.2.3 Спиртовой раствор основного фуксина массовой концентрации 5 г/дм^3 по ГОСТ 10444.1 (4.25).

Применяют для повышения дифференцирующих свойств среды Эндо.

5.2.4 Приготовление 70 %-го раствора этилового спирта.

Для приготовления 70 %-го раствора этилового спирта необходимо к 70 см^3 96 %-го ректификованного этилового спирта добавить 26 см^3 дистиллированной воды.

Применяют для асептической обработки тары при отборе проб для анализа.

5.2.5 Приготовление стерильной воды

Питьевую воду разливают в колбы или пробирки и стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 30 мин.

5.2.6 Сроки хранения реактивов и растворов не более месяца.

5.3 Приготовление питательных сред

5.3.1 Среда из сухого питательного агара

Среду готовят по прописи на этикетке или используют мясо-пептонный агар, приготовленный по ГОСТ 10444.1 (5.12).

Применяют для определения мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.3.2 Среда Кесслер с лактозой

Среду готовят по прописи на этикетке. При приготовлении среды в пробирки или колбы помещают поплавки. Для приготовления среды двойной концентрации навеску среды увеличивают в 2 раза.

Допускается приготовление среды из отдельных ингредиентов по ГОСТ 30518 (4.2.4).

Селективную среду применяют для накопления бактерий группы кишечных палочек.

5.3.3 Среда Эндо

Среду готовят по прописи на этикетке.

Для повышения дифференцирующих свойств в готовую и охлажденную до 60 — 70 °С среду перед розливом в чашки допускается прибавлять на 100 $см^3$ среды 0,2 $см^3$ 5 %-го спиртового раствора основного фуксина.

Применяют селективную среду для определения бактерий группы кишечных палочек.

5.3.4 Солодовое сусло

Приготовление солодового сусла массовой долей сухих веществ 11 — 12 % и 7 — 8 % — по ГОСТ 10444.1 (5.44).

Можно использовать готовое неохмеленное пивное сусло после предварительной обработки. Готовое сусло массовой долей сухих веществ 11 — 12 % стерилизуют при (112 ± 1) °С в течение 15 мин. Затем сусло фильтруют, разливают в стерильную посуду и стерилизуют при (116 ± 1) °С в течение 20 мин.

Применяют солодовое сусло: массовой долей сухих веществ 11 — 12 % для выявления дрожжей и плесневых грибов в концентратах напитков и соковых напитках с мякотью плодов, массовой долей сухих веществ 7 — 8 % — для приготовления солодового агаризованного сусла.

Солодовое сусло можно заменить виноградным суслом с аналогичным содержанием сухих веществ.

5.3.5 Солодовое агаризованное сусло

К 1 $дм^3$ отфильтрованного сусла массовой долей сухих веществ 7 — 8 % добавляют 20 г агара. Среду расплавляют на водяной бане, разливают по стерильным пробиркам или колбам и стерилизуют при температуре (116 ± 1)°С в течение 20 мин.

Применяют для определения дрожжей и плесневых грибов.

5.3.6 Среда Сабуро

Среду готовят по прописи на этикетке. Из отдельных ингредиентов готовят следующим образом: 40,0 г глюкозы, 10,0 г пептона, 18,0 г агара добавляют к 1 $дм^3$ дистиллированной воды. Смесь подогревают, периодически помешивая до растворения составных частей, охлаждают до 45 — 55 °С, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации она составляла при (25 ± 2) °С 6,5 ±0,1, разливают в мерные колбы и стерилизуют 15 мин при температуре (121 ± 1) °С.

Применяют для определения дрожжей и плесневых грибов.

5.3.7 Готовые питательные среды хранят при температуре (4 ± 2) °С не более одного месяца.

5.3.8 Допускаются к использованию питательные среды, диагностические препараты и системы идентификации производства зарубежных фирм, предназначенные для целей описываемых методов. Питательные среды и биологические препараты зарубежного производства должны иметь международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29000.

При использовании следует руководствоваться рекомендациями фирмы-производителя.

Все питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать требованиям нормативного документа и иметь инструкцию по применению.

5.4 Подготовка мембранных фильтров и фильтровального прибора

5.4.1 Для фильтрации используют мембранные фильтры диаметром от 50 до 35 мм размерами пор 0,65 — 0,45 мкм в стерильной и нестерильной упаковках.

Нестерильные фильтры стерилизуют непосредственно перед их использованием: кипячением или другим способом, рекомендованным фирмой-изготовителем.

Для кипячения фильтры помещают в стеклянный стакан или медицинский стерилизатор с дистиллированной водой, нагретой до 30 °С, медленно доводят до кипения на слабом огне, после чего воду меняют и кипятят 10 мин. Во избежание деформации фильтров во время кипячения в стакан или медицинский стерилизатор помещают стеклянные шарики или сетку.

5.4.2 Для определения дрожжей и плесневых грибов используют фильтры размерами пор 0,65 — 0,45 мкм; для бактерий — 0,45 мкм.

5.4.3 Перед фильтрацией пробы воронку и столик обтирают ватным тампоном, смоченным 96 %-м ректификованным этиловым спиртом, и стерилизуют фламбированием в пламени горящего тампона. После охлаждения на столик кладут фламбированным пинцетом мембранный фильтр, устанавливают воронку и закрепляют ее держателем.

Использование одноразовых стерильных комплектов, состоящих из воронки и мембраны, позволяет исключить стадию стерилизации фильтровального прибора.

5.4.4 Исследуемый объем пробы выливают в воронку и нажатием кнопки включают насос. При отсутствии мерных уровней в воронке пробы объемом 100 $см^3$ и более отбирают стерильными цилиндрами, а объемом 10 $см^3$ – стерильными пипетками.

5.4.5 По окончании фильтрации пробы фильтр промывают 2—3 $см^3$ стерильной питьевой воды для удаления остаточных следов кислоты и консерванта. После прохождения жидкости через фильтр колбу держат под вакуумом в течение 5–7 с (для полного удаления следов жидкости) и насос отключают.

Снимают воронку и с помощью фламбированного пинцета осторожно снимают фильтр вдоль его кромки.

Открывают чашку Петри с питательной средой и опускают, не переворачивая, на нее фильтр. Накладывать фильтр следует так, чтобы между ним и поверхностью питательной среды не образовывались пузырьки воздуха. Для этого противоположный край фильтра (напротив пинцета) должен лечь на поверхность среды, а затем постепенно накладывают весь фильтр «накатом» на среду.

Поверхность фильтра с осевшими на нее микроорганизмами должна быть обращена вверх. Чашку закрывают и на дне чашки под каждым фильтром делают надписи с указанием номера профильтрованной пробы. На одну чашку можно поместить в зависимости от диаметра фильтра и чашки Петри от 1 до 4 фильтров так, чтобы фильтры не соприкасались.

5.4.6 Перед фильтрацией следующей пробы столик и воронку прибора тщательно фламбируют.

Кроме фламбирования прибора можно перед следующей пробой проводить кипячение его в кастрюле с питьевой водой, которая устанавливается недалеко от рабочего места. Вода должна быть заранее доведена до кипения и полностью покрывать фильтровальный прибор. Кипячение проводят в течение 1–2 мин, вынимают стерильный прибор фламбированными щипцами. Фильтровальный прибор в собранном виде можно стерилизовать в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 20 – 30 мин.

6 Методы анализа

6.1 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Метод основан на высеве продукта или разведения навески продукта в агаризованную питательную среду, инкубировании посевов, подсчете всех выросших видимых колоний.

6.1.1 Проведение испытаний

6.1.1.1 Из навески продукта, отобранной по ГОСТ 26668, готовят исходный и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669 так, чтобы можно было определить в продукте предполагаемое количество микроорганизмов или количество, указанное в нормативном документе на продукт.

6.1.1.2 При определении количества микроорганизмов посевом в агаризованные питательные среды из продукта и (или) из каждого соответствующего разведения по 1 $см^3$ высевают в две параллельные чашки Петри. Посевы заливают расплавленной и охлажденной до 45 – 48 °С одной из агаризованных сред по 5.3.1. Посевы проводят по ГОСТ 26670 (4.1).

6.1.1.3 Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч. Чашки Петри с посевами распределяют в термостате таким образом, чтобы расстояние между стопками чашек и стенками термостата было не менее 3 см.

6.1.2 Обработка результатов

6.1.2.1 Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке Петри, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4–10×. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами. Для подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 300 колоний.

6.1.2.2 При большом количестве колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на 4 и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний на 2 – 3 секторах (но не менее чем на $^1/_3$ поверхности чашки), находят среднеарифметическое значение числа колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом находят общее число колоний, выросших на одной чашке.

Подсчитывают колонии микроорганизмов в каждом из параллельных посевов одного разведения. По результатам подсчета вычисляют среднеарифметическое значение числа колоний в посевах одного разведения.

Если имеются колонии, выросшие в последующих разведениях, то подсчитывают количество микроорганизмов в продукте по результатам подсчета колоний в каждом из этих разведений раздельно и вычисляют среднеарифметическое значение числа колоний.

Полученное среднеарифметическое значение числа колоний округляют по ГОСТ 26670:

до числа, кратного 5, — если среднеарифметическое значение числа колоний менее 100 (например 71 до 75; 83 до 85);

до числа, кратного 20, – если среднеарифметическое значение числа колоний более 100 и оканчивается цифрой 5 (например 115 до 120; 125 до 140);

до числа, кратного 10, – если среднеарифметическое значение числа колоний более 100 и не оканчивается цифрой 5 (например 116 до 110; 111 до 110; 121 до 120).

6.1.2.3 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в пересчете на 1,0 г ($см^3$) продукта проводят по ГОСТ 26670.

Количество микроорганизмов в 1,0 г ($см^3$) продукта M вычисляют по формуле

$$M = \frac{N}{m} \cdot C, \qquad (1)$$

где N – степень разведения навески;

m – количество инокулята, внесенное в чашку Петри, $см^3$;

C – округленное среднеарифметическое значение числа колоний.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМА-ФАнМ) выражается КОЕ/$см^3$ или КОЕ/г, где КОЕ – колониеобразующая единица.

Результат вычисления выражают числом от 1,0 до $9{,}9\times10^n$.

Пример: 85 – $0{,}85 \times 10^2$; 2220 – $2{,}22 \times 10^3$.

6.2 Определение количества мезофильных аэробных микроорганизмов

Метол основан на высеве нормируемого объема напитка с использованием мембранных фильтров на плотный питательный агар, инкубировании посева и подсчете всех видимых колоний, выросших на фильтре.

Метол предназначен для определения микроорганизмов в напитках с использованием подсластителей и заменителей сахара.

6.2.1 Проведение испытаний

6.2.1.1 Нормируемый объем исследуемой пробы напитка (100 $см^3$), отобранной по 3.1, фильтруют через мембрану по 5.4.

6.2.1.2 По окончании фильтрации фильтр переносят в чашку Петри на поверхность питательной среды, приготовленной по 5.3.1. Чашки закрывают и на дне чашки против каждого фильтра ставят номер колбы. Из каждой пробы делают посев в двух повторностях.

6.2.1.3 Чашки с посевами помещают в термостат при температуре (30 ± 1) °С на (72 ± 3) ч.

6.2.2 Обработка результатов

6.2.2.1 Количество выросших колоний подсчитывают на каждом фильтре, пользуясь лупой с увеличением в 4 – 10^x. При большом числе колоний фильтр делят на сектора и находят общее число колоний, выросших на всей поверхности фильтра.

6.2.2.2 После подсчета колоний на фильтре с параллельной пробой находят среднеарифметическое значение числа колоний, округляют до числа, кратного 5, по 6.1.2.2. Полученный результат является количеством аэробных микроорганизмов (КМАэМ), выраженным КОЕ/100 $см^3$.

6.3 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

Метод основан на выявлении бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) по сбраживанию лактозы с образованием кислоты и газа при (36 ± 1) °С в течение 24 ч. К бактериям группы кишечных палочек (колиформных бактерий) относятся грамотрицательные, бесспоровые палочки, принадлежащие к родам Echerichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia (т. е. как цитрат-отрицательные, так и цитратположительные представители энергобактерий).

Определение БГКП (колиформных бактерий) проводят методом мембранной фильтрации или прямым посевом в питательную среду.

Метод мембранной фильтрации основан на фильтровании нормируемого объема продукта через мембранный фильтр, инкубировании посевов на агаризованной селективной среде с лактозой и последующей идентификации колоний по культуральным и биохимическим признакам.

Метод прямого посева основан на накоплении бактерий посевом нормируемого объема или его разведения в жидкую селективную среду с лактозой, инкубировании, пересеве, при необходимости, на агаризованную селективную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим признакам.

6.3.1 Проведение испытаний

Метод мембранной фильтрации используют для посева прозрачных и замутненных напитков, легко фильтруемых через мембрану.

Метод прямого посева — для соковых напитков с мякотью плода и загустителями, концентратов для напитков в потребительской таре, квасе брожения.

Анализ проводят в двух повторностях.

6.3.1.1 Метод мембранной фильтрации

Нормируемый объем пробы напитка (100 $см^3$), отобранной по 3.1, фильтруют по 5.4. Фильтр укладывают на агаризованную селективную среду Эндо, приготовленную по 5.3.3, разлитую в чашки Петри по ГОСТ 26670.

При посеве методом мембранной фильтрации освобождение от двуокиси углерода и нейтрализацию напитка не проводят.

6.3.1.2 Метод прямого посева

Посев продукта проводят в жидкую селективную среду Кесслер с лактозой, приготовленную по 5.3.2. Соотношение между количеством высеваемого продукта и питательной средой 1:9, а для среды двойной концентрации 1:1.

Перед посевом напитка в среду Кесслер его освобождают от двуокиси углерода по ГОСТ 26669 (2.6.8) и нейтрализуют стерильным раствором гидроокиси натрия для предотвращения резкого снижения pH среды Кесслер (на 0,5 и более).

Значение pH среды Кесслер при посеве в нее продукта доводят до допустимых значений стерильным раствором гидроокиси натрия или при приготовлении среды pH устанавливают выше заданного с учетом его последующего значения при внесении продукта. Количество добавляемого раствора гидроокиси натрия или величину, на которую необходимо увеличить pH при приготовлении питательной среды, устанавливают опытным путем.

6.3.1.2.1 Нормируемый объем пробы напитка (100 $см^3$) засевают в среду Кесслер с лактозой двойной концентрации, разлитую по 100 $см^3$ во флаконы с поплавком.

6.3.1.2.2 Нормируемый объем пробы концентрата для напитка в потребительской таре (1 $г/см^3$) помешают в пробирку с 9 $см^3$ стерильной питьевой воды, перемешивают и засевают в пробирку с 10 $см^3$ среды Кесслер двойной концентрации с поплавком.

6.3.1.2.3 Квас брожения, приготовленный на чистых культурах, в количестве 1,0 $см^3$ (нормируемый объем) засевают в пробирку с 9 $см^3$ среды Кесслер с поплавком.

6.3.1.2.4 Для посева кваса брожения, приготовленного на хлебопекарных дрожжах, делают разведение по ГОСТ 26669: 1 $см^3$ кваса разводят в 9 $см^3$ стерильной питьевой воды (разведение 1:10). Из разведения берут 1 $см^3$ (что соответствует нормируемому объему кваса — 0,1 $см^3$), засевают в пробирку с 9 $см^3$ среды Кесслер с поплавком.

6.3.1.3 Посевы на средах Эндо и Кесслер инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 — 48 ч. Чашки Петри с посевами инкубируют дном вверх. Посевы просматривают через (24 ± 3) ч, отмечают положительные результаты посевов в среду Кесслер, а окончательный учет проводят через (48 ± 3) ч.

Положительными результатами посева в среду Кесслер считают посевы, в которых имеет место интенсивный рост микроорганизмов, проявляющийся в помутнении среды, образовании газа.

6.3.1.4 Для подтверждения принадлежности микроорганизмов, выросших на среде Кесслер, к колиформным бактериям делают пересевы по ГОСТ 26670 на поверхность среды Эндо, приготовленную по 5.3.3. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение (24±3) ч.

6.3.1.5 Посевы на среде Эндо по 6.3.1.1 и 6.3.1.4 после инкубирования просматривают и отмечают рост типичных колоний для бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) — красных с металлическим блеском или без него, розовых и бледно-розовых. Типичные колонии для колиформных бактерий имеют отпечаток на обратной стороне фильтра или на среде Эндо после снятия петлей колонии. Для повышения дифференцирующих свойств среды Эндо (проявления отпечатков) в нее добавляют 5 %-й спиртовый раствор основного фуксина по 5.2.3.

6.3.1.6 При обнаружении на чашках со средой Эндо мелких бесцветных колоний, подозрительных на возбудителей кишечных инфекций, микробиолог лаборатории должен указанные чашки передать в лабораторию санитарно-эпидемиологической станции для дальнейшего изучения по ГОСТ 30519.

6.3.1.7 При необходимости подтверждения принадлежности выросших колоний микроорганизмов на среде Эндо к колиформным бактериям из колоний приготовляют препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Для приготовления препарата на чистое и охлажденное после фламбирования предметное стекло наносят петлей минимальное количество культуры из исследуемой колонии, не размешивая в воде. Затем вносят петлей каплю реактива 1, приготовленного по 5.2.1. Смесь распределяют на участке площадью примерно 1 $см^2$, просушивают при 20 °С и фиксируют, медленно пронеся предметное

стекло над пламенем горелки. На одном стекле можно готовить по шесть — восемь мазков, отделяя их один от другого линиями, проведенными с лицевой стороны стекла.

Препарат ополаскивают водой и тщательно просушивают фильтровальной бумагой.

После просушивания на препарат наносят с избытком реактив 2, приготовленный по 5.2.1, так, чтобы жидкость покрывала всю поверхность стекла. Продолжительность окрашивания 0,5 — 1 мин. После окрашивания препарат быстро ополаскивают проточной водой, направляя струю под углом на стекло. Препарат просушивают фильтровальной бумагой и просматривают под микроскопом с иммерсионной системой (объектив 90°). При таком способе окраски по Граму грамположительные бактерии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные бактерии — в буровато-розовый цвет.

6.3.2 Обработка результатов

6.3.2.1 При отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) или отсутствии признаков роста на среде Кесслер с лактозой (отсутствие газа в поплавке или помутнения среды) дают заключение об отсутствии БГКП (колиформных бактерий) и о соответствии исследуемого продукта микробиологической норме.

6.3.2.2 При образовании помутнения и газа в среде Кесслер и роста на среде Эндо типичных для колиформных бактерий колоний и последующей идентификации — обнаружение грамотрицательных, не содержащих спор палочек, указывает на наличие БГКП (колиформных бактерий) в анализируемом объеме продукта и несоответствие его микробиологической норме.

6.3.2.3 При обнаружении БГКП только в одной из повторностей — анализ следует повторить. Если БГКП будут вновь обнаружены в одной из повторностей, то это свидетельствует о несоответствии продукта микробиологической норме.

6.4 Определение дрожжей и плесневых грибов

Метод основан на посеве определенных количеств продукта на/в селективные среды, культивировании посевов, подсчете всех видимых колоний дрожжей и плесневых грибов, типичных по макро- и (или) микроскопической морфологии.

6.4.1 Проведение испытаний

Определение количества дрожжей и плесневых грибов в продуктах проводят глубинным или поверхностным методами, а также с применением мембранной фильтрации.

Выявление дрожжей и плесневых грибов в продуктах с мякотью плода или загустителями проводят накопительным методом.

6.4.1.1 Посевы для определения количества дрожжей и плесневых грибов

6.4.1.1.1 Продукты в количестве 1 $см^3$ высевают параллельно в две чашки Петри. Посевы заливают расплавленной и охлажденной до 45 — 48 °С средой, приготовленной по 5.3.5 или 5.3.6. Посев глубинным методом проводят по ГОСТ 26670 (4.1).

6.4.1.1.2 Пробы продукта в количестве 0,1 или 0,2 $см^3$ наносят на поверхность одной из агаризованных сред, приготовленных по 5.3.5 или 5.3.6, разлитых в две чашки Петри, и шпателем равномерно распределяют по поверхности среды. Подготовку чашек Петри со средой к посеву и посев поверхностным методом проводят по ГОСТ 26670 (4.2).

6.4.1.1.3 При использовании метода мембранной фильтрации в воронку фильтрованного аппарата вносят нормируемый объем исследуемой пробы (напитка, сиропа, концентрата напитка). Для лучшей фильтрации проб сиропа концентратов напитков в воронку сначала вносят 5—10 $см^3$ стерильной воды, а затем исследуемую пробу. Концентраты напитков (нормируемый объем 10 г/$см^3$) перед фильтрацией растворяют в 30 — 40 $дм^3$ стерильной воды.

Фильтрацию проводят по 5.4. Затем фильтр переносят в чашки Петри на поверхность агаризованной среды, приготовленной по 5.3.5 или 5.3.6. Чашки закрывают и на дне против фильтра ставят номер пробы. Из каждой пробы делают посев в двух повторностях.

6.4.1.1.4 Чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (24 ± 1) °С в течение 5 сут с предварительным учетом выросших колоний через 2 сут. Если имеется один термостат и одновременно необходимо выращивать посевы для определения КМАФАнМ или КМАэМ при (30 ± 1) °С, а также дрожжей и плесневых грибов при (24 ± 1) °С, то допускается выращивание последних при (30 ± 1) °С. Рекомендуется иметь на каждую заданную температуру отдельный термостат.

Через 2 сут термостатирования проводят учет типичных колоний, а через 5 сут — окончательный, наблюдая за ростом дрожжей и плесневых грибов визуально, а при необходимости просматривают микроскопический препарат.

6.4.1.1.5 Рост дрожжей на питательной среде сопровождается образованием крупных, выпуклых, матово-блестящих, плотных с ровными краями серовато-белых колоний.

Развитие плесневых грибов на среде сопровождается образованием пушистого мицелия различной окраски (белой, черной, зеленоватой).

При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов проводят микроскопические исследования. Для этого из отдельной колонии готовят препараты методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной питьевой воды. Затем в эту каплю прокаленной иглой вносят часть колонии, размешивают и покрывают покровным стеклом. Капля с исследуемым материалом должна быть такой, чтобы после прижимания ее покровным стеклом суспензия не выступала из-под стекла. Избыток суспензии удаляют кусочком фильтровальной бумаги. Микроскопирование препаратов проводят с объективами 20^{x}, 40^{x}.

Дрожжевые клетки — круглой, овальной или продолговатой формы, часто почкующиеся, длиной от 2,5 до 30 мкм, шириной 2,5 до 10 мкм.

Плесневые грибы состоят из нитей — гифов, без перегородок или септированных на клетки. Гифы образуют боковые выросты и разветвления.

6.4.1.2 Посевы для выявления дрожжей и плесневых грибов (накопительный метод)

Метод используют для выявления жизнеспособных дрожжей и плесневых грибов в объемах соковых напитков с мякотью плода, загустителями и концентратов напитка с мякотью плода, в которых согласно нормативному документу наличие микроорганизмов не допускается.

Объем или массу продукта вносят в пробирки или колбы с жидкой питательной средой, приготовленной по 5.3.4. Соотношение питательной среды и напитка — 1:5, среды и концентрата — 5:1. Порошкообразные концентраты напитков (нормируемый объем 10 г) предварительно растворяют в 30 — 40 см^3 стерильной воды. Посевы проводят в двух повторностях.

6.4.1.2.1 Колбы с посевами инкубируют при температуре (24 ± 1) °С в течение 36 — 48 ч.

6.4.1.2.2 Через 36—48 ч инкубации из колбы стерильной пипеткой берут 2—3 см^3 среды с посевным материалом и делают посев в стерильную чашку Петри. Чашки должны быть заранее промаркированы. Не позднее чем через 15 мин в чашки вносят питательную среду в количестве (14 ± 1) см^3, приготовленную по 5.3.5, 5.3.6, и посев проводят по ГОСТ 26670 (4.1). После застывания чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре (24 ± 1) °С на 48 ч.

6.4.2 Обработка результатов

6.4.2.1 В посевах при определении количества дрожжей и плесневых грибов колонии (при необходимости подтвержденные микроскопированием) подсчитывают отдельно, пользуясь лупой с увеличением в 4—10^{x}. Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 50 колоний дрожжей. Колонии подсчитывают в каждом из параллельных посевов и находят среднеарифметическое значение числа колоний.

6.4.2.2 Количество дрожжей и плесневых грибов в посевах на/в агаризованную среду по 6.4.1.1.1 и 6.4.1.1.2 в 1,0 г (см^3) определяют по 6.1.2.2; 6.1.2.3.

6.4.2.3 При посевах нормируемого объема напитка методом мембранных фильтров подсчитывают число колоний дрожжей и плесневых грибов, выросших на мембранных фильтрах с параллельной пробой, находят среднеарифметическое значение числа колоний, округляют до кратного числа по 6.1.2.2. Полученный результат является количеством дрожжей и плесневых грибов в нормируемом объеме пробы. Результаты записывают в следующем виде: дрожжи КОЕ/см^3 (г) нормируемого объема; плесневые грибы КОЕ/см^3 (г) нормируемого объема.

6.4.2.4 В посевах при выявлении дрожжей и плесневых грибов накопительным методом отсутствие в агаризованной среде типичных для дрожжей и плесневых грибов колоний свидетельствует о соответствии засеянного объема (массы) продукта микробиологической норме.

Рост дрожжей и (или) плесневых грибов свидетельствует о несоответствии продукта микробиологической норме.

УДК 663.865.543.6:006.354 МКС 67.160.20 07.100.30 Н79 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: продукция безалкогольной промышленности, методы микробиологического анализа, питательные среды, мезофильные аэробные, факультативно-анаэробные микроорганизмы, бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии), дрожжи и плесневые грибы

к ГОСТ 30712—2001 Продукты безалкогольной промышленности. Методы микробиологического анализа

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 1. Первый абзац	безалкогольные	безалкогольные и слабоалкогольные

(ИУС № 7 2007 г.)

gost.e-ecolog.ru