ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52711— 2007

ПРОИЗВОДСТВО СОКОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Методы микробиологического анализа с применением специальных микробиологических сред

Издание официальное

БЗ 8—2006/207

Москва
Стандартинформ
2007

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки Российской Федерации (ГОУВПО «МГУПП») и ООО «Делер НФ и БИ»

2 ВНЕСЕН Государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки Российской Федерации (ГОУВПО «МГУПП»)

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 февраля 2007 г. № 16-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

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

© СТАНДАРТИНФОРМ, 2007
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2009
Переиздание (по состоянию на декабрь 2008 г.)

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Методы отбора, подготовки, транспортирования и хранения проб . . . 2
4 Методы анализа . . . 3
4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы . . . 3
4.2 Описание специальных микробиологических сред . . . 4
4.3 Подготовка к проведению анализов . . . 5
4.3.1 Подготовка посуды . . . 5
4.3.2 Приготовление реактивов и растворов . . . 6
4.3.3 Подготовка специальных микробиологических сред к проведению анализа . . . 6
4.3.4 Подготовка мембранных фильтров и фильтровального прибора. Порядок работы с применением метода мембранной фильтрации . . . 7
4.4 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) с использованием агаризованной среды № 1 . . . 7
4.5 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в питьевой исходной, технологической и технологической промывной воде . . . 9
4.6 Определение дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий . . . 10
4.6.1 Проведение анализа с использованием микробиологической среды № 2 . . . 10
4.6.2 Проведение анализа с использованием микробиологических сред № 4 и 5 . . . 11
4.7 Определение соответствия готовых продуктов требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих их порчу (дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий) . . . 12
4.8 Определение соответствия готовых продуктов требованиям к отсутствию индикаторной, патогенной, условно-патогенной лимитируемой микрофлоры, в том числе B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa, S. aureus, мезофильных клостридий (в том числе C. botulinum, C. perfringens), сульфитредуцирующих клостридий, сальмонелл . . . 13
4.9 Метод подтверждения готовности линии розлива по микробиологическим показателям к производству асептически упаковываемых готовых продуктов . . . 13
4.10 Контроль бутылок после бутылкомоечной машины или устройства для ополаскивания бутылок (ринзера) на соответствие требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, индикаторной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры . . . 14
4.11 Контроль укупорочного материала на соответствие требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, индикаторной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры . . . 14
4.12 Контроль воздуха в производственных помещениях по микробиологическим показателям . . . 15
4.13 Контроль состояния поверхностей производственного оборудования и помещений по микробиологическим показателям методом свобирования . . . 15

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОИЗВОДСТВО СОКОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Методы микробиологического анализа с применением специальных микробиологических сред

Manufacturing of juice products.
Microbiological control methods using special microbiological nutrient media

Дата введения — 2008—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на консервы: фруктовые и овощные соки, нектары, морсы и сокосодержащие напитки (далее — готовые продукты); фруктовые и овощные концентрированные соки, а также сырье, питьевую исходную, технологическую, технологическую промывную воду, оборудование и воздух производственных помещений и устанавливает методы их микробиологического анализа с применением специальных микробиологических сред:

- количественный метод определения мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ);
- качественный метод выявления бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в питьевой исходной, технологической и технологической промывной воде;
- количественный и качественный методы определения дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий;
- качественный метод подтверждения отсутствия в готовых продуктах микроорганизмов, вызывающих их порчу (дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий);
- качественный метод подтверждения отсутствия в готовых продуктах индикаторной, патогенной и условно-патогенной лимитируемой микрофлоры, в том числе B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa, S. aureus, мезофильных клостридий (в том числе группы C. botulinum, C. Perfringens), сульфитредуцирующих клостридий, сальмонелл.

Методы предназначены для определения количества или качественного выявления микроорганизмов:

- прямым посевом в специальные микробиологические среды определенного объема (массы) анализируемой пробы или ее разведения;
- с применением мембранной фильтрации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 51446—99 (ИСО 7218—96) Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований

ГОСТ Р 51593—2000 Вода питьевая. Отбор проб

ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 51935—2002 (ЕН 285—96) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 177—88 Водорода перекись. Технические условия

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

Издание официальное

ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. 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 13739—78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 18481—81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Общие технические условия
ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний
ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования
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 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. 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 со временем ожидания 15 с
ГОСТ 29230—91 (ИСО 835-4—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

Примечание — При пользовании настоящим рекомендациями целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Методы отбора, подготовки, транспортирования и хранения проб

3.1 Отбор проб по ГОСТ Р 51593 и ГОСТ 26668 со следующими дополнениями:

перед взятием пробы готового продукта пробку и горловину бутылки, поверхность металлической банки или другой упаковки протирают ватным тампоном, смоченным в водном растворе объемной долей этилового спирта 70 %, приготовленном по 4.3.2.2. Затем стерильным ключом снимают кроненпробку или отвинчивают пробку бутылки. Горловину открытой бутылки обжигают в пламени спиртовки или протирают ватным тампоном, смоченным в водном растворе объемной долей этилового спирта 70 %, и отбирают необходимый для анализа объем готового продукта.

Перед взятием пробы из упаковки, состоящей из комбинированных материалов (типа «Тетра-Пак», «Ело-Пак» и др.), отрывают от корпуса упаковки приклеенный к ней уголок верхней части укупоренного пакета, протирают уголок ватным тампоном, смоченным в водном растворе объемной долей этилового спирта 70 %, фламбируют, в асептических условиях фламбированными ножницами отрезают уголок пакета и отбирают необходимый объем готового продукта. Не допускается проводить отбор проб из упаковок, состоящих из комбинированных материалов, через отвинчивающуюся крышку пакета или фольгированную пробку, предназначенную для введения в упаковку трубочки.

Отбор проб технологической промывной воды проводят после подтверждения отсутствия моющих и дезинфицирующих средств, руководствуясь рекомендациями фирмы-изготовителя по их использованию.

Отбор проб для подтверждения готовности линии розлива по микробиологическим показателям к производству асептически упаковываемых готовых продуктов по 4.9.1.1.

Отбор проб промывной воды при контроле бутылок после бутылкомоечной машины по 4.10.1.

Отбор проб укупорочного материала — по 4.11.1.

Отбор проб воздуха производственных помещений — по 4.12.1.

Отбор проб с поверхностей производственных помещений и оборудования — по 4.13.

3.2 Подготовка проб — по ГОСТ 26669.

3.3 Транспортирование и хранение проб

Доставку проб готовых продуктов, расфасованных в потребительскую тару, допускается осуществлять, соблюдая требования к условиям хранения, установленные документами, в соответствии с которыми изготовлены продукты.

Доставку проб анализируемых продуктов, не расфасованных в потребительскую тару, осуществляют в стерильных контейнерах-холодильниках, стерильных пакетах типа «WHIRL-PAK» (или в другой стерильной таре, обеспечивающей сохранность проб) при температуре 4 °С—10 °С. В холодный период года контейнеры или пакеты «WHIRL-PAK» должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При соблюдении указанных условий срок начала анализа от момента отбора проб не должен превышать 6 ч.

Если пробы нельзя охладить, их анализ следует проводить в течение 2 ч после отбора.

Если не могут быть соблюдены условия доставки проб, то отбор и анализ проб не проводят.

4 Методы анализа

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

Автоклав или стерилизатор паровой большой по ГОСТ Р 51935.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 мг.

Прибор вакуумного фильтрования.

Вакуумный насос.

Термостаты любого типа, обеспечивающие поддержание заданной температуры от 26 °С до 45 °С с допустимой погрешностью ± 1 °С.

Шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий температуру нагрева 100 °С — 200 °С с пределом допустимой абсолютной погрешности ± 2 °С.

pH-метр или потенциометр с автоматической термокомпенсацией, пределом допустимой абсолютной погрешности ± 0,1 pH и порогом чувствительности 0,01 pH.

Микроскоп световой биологический любого типа, обеспечивающий увеличение 900×—1000×.

Цилиндры стеклянные по ГОСТ 18481.

Холодильник по ГОСТ 16317.

Плитка электрическая с закрытой спиралью по ГОСТ 14919.

Баня водяная.

Фильтры мембранные для микробиологических целей размером пор 0,2 и 0,45 мкм.

Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241.

Шпатели металлические и стеклянные.

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

Лупа по ГОСТ 25706.

Спиртовка по ГОСТ 25336.

Ключ для вскрытия бутылок.

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

Колба Эрленмейера.

Инверсионные бутылки.

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 предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284.

Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.
Цилиндры мерные вместимостью от 25 до 2000 см^3 включительно по ГОСТ 1770 .
Чашки биологические (Петри) по ГОСТ 25336.
Стерильные цилиндрической формы емкости (тубы) по ГОСТ Р 51446.
Марля медицинская по ГОСТ 9412.
Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.
Крафт-бумага по документу, в соответствии с которым она изготовлена.
Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.
Бумага индикаторная универсальная.
Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья по ГОСТ Р 51652.
Вода питьевая по [1].
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Перекись водорода по ГОСТ 177.
Кислота соляная по ГОСТ 3118.
Стеклянные шарики.
pH-метр по ГОСТ Р 51446.
Секундомер.
Петли микробиологические по ГОСТ Р 51446.

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

4.2 Описание специальных микробиологических сред

4.2.1 Среда № 1 (среда «NÄHRAGAR DEV — Agar»)[1)] представляет собой твердую стерильную микробиологическую среду, разлитую в стеклянные бутылки. Среда № 1 характеризуется следующими основными свойствами:

- предназначена для определения количества: мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, дрожжей, плесневых грибов, мезофильных клостридий (в том числе группы C. botulinum, C. perfringens), сульфитредуцирующих клостридий и сальмонелл, микроорганизмов группы B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa, S. aureus;
- температурный интервал применения (инкубации) 20° С—40° С;
- предназначена для анализа соков, нектаров, морсов, сокосодержащих напитков, фруктовых и овощных концентрированных соков, сырья и технологической воды, оборудования и воздуха производственных помещений;
- значение pH 7,3 ± 0,2;
- компоненты: вода, пептон, мясной экстракт, агар-агар, NaCl;
- простой способ подготовки к использованию.

Среду № 1 используют для культивирования микроорганизмов при непосредственном внесении анализируемой пробы или ее разведения в питательную среду (далее — метод прямого посева) и при выполнении анализа методом мембранной фильтрации. Подготовка среды к использованию приведена в 4.3.3.1.

4.2.2 Среда № 2 (среда «OFS-Agar»)[1)] представляет собой твердую стерильную микробиологическую среду, разлитую в стеклянные бутылки. Среда № 2 характеризуется следующими основными свойствами:

- селективность: дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии;
- температурный интервал применения (инкубации) 26 ° С—30° С;
- предназначена для анализа соков, нектаров, морсов, сокосодержащих напитков, фруктовых и овощных концентрированных соков, сырья и технологической воды, оборудования и воздуха производственных помещений;
- значение pH 5,0 ± 0,1;
- компоненты: вода, сахар, апельсиновый концентрат, агар-агар, дрожжевой экстракт, пептон;
- простой способ подготовки к использованию.

[1)] Питательная среда является рекомендуемой к применению. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанной питательной среды. Допускаются к использованию питательные среды производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендуемые специальные микробиологические среды «NÄHRAGAR DEV — Agar», «OFS-Agar», «LMC — concentrate», «TF-B» и «TF-G» производятся компанией «Doehler GmbH» (Германия), имеют сертификат ИСО 9001:2000.

Среду № 2 используют в качестве питательной среды для количественного и качественного определения микроорганизмов в пробе при выполнении анализа методом прямого посева (в том числе при анализе проб воздуха) и методом мембранной фильтрации. Подготовка среды к использованию приведена в 4.3.3.1.

4.2.3 Среда № 3 (среда «LMC— concentrate»)[1)] представляет собой жидкую стерильную микробиологическую среду, разлитую в стеклянные бутылки. Среда № 3 характеризуется следующими основными свойствами:

- селективность: бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии);
- температурный интервал применения (инкубации) 36,0 °С—44,5 °С;
- предназначена для анализа питьевой исходной, технологической и технологической промывной воды, санитарно-гигиенического состояния производства;
- значение pH 7,2 ± 0,1;
- компоненты: вода, лактоза, пептон, NaCl, бромкрезолпурпур;
- простой способ подготовки к использованию.

Среду № 3 используют в качестве питательной среды для культивирования микроорганизмов при выполнении анализа методом прямого посева, методом мембранной фильтрации, в том числе при анализе проб, взятых стерильной палочкой с ватным наконечником (свобом) с контролируемых поверхностей методом стирания (методом свобирования). Подготовка среды к использованию приведена в 4.3.3.2.

4.2.4 Среда № 4 (среда «TF-B»)[1)] представляет собой стерильную среду, разлитую в стеклянные бутылки. Среда № 4 предназначена для предварительного обогащения проб нефильтрующихся продуктов перед анализом пробы с применением TF-G или среды № 2. Среда № 4 характеризуется следующими основными свойствами:

- селективность: дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии;
- предназначена для анализа соков, нектаров, морсов, сокосодержащих напитков, фруктовых и овощных концентрированных соков, сырья и технологической воды, оборудования и воздуха производственных помещений;
- температурный интервал применения (инкубации) 26 °С—30 °С;
- значение pH 6,2 ± 0,2;
- компоненты: вода, сахар, пептон, дрожжевой экстракт, буфер;
- перед использованием не требует подготовки.

4.2.5 Среда № 5 (среда «TF-G»)[1)] состоит из двух компонентов: компонента 1 — «TF-G 1»[1)] (порошкообразной смеси) и компонента 2 — «TF-G 2»[1)] (корректора pH). Среда № 5 характеризуется следующими основными свойствами:

- селективность: дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии;
- предназначена для анализа соков, нектаров, морсов, сокосодержащих напитков, фруктовых и овощных концентрированных соков, сырья и технологической воды, оборудования и воздуха производственных помещений;
- температурный интервал применения (инкубации) 26 °С—30 °С;
- компоненты: сахар, пептон, дрожжевой экстракт, буфер, минеральные добавки, стабилизатор, молочная кислота;
- простой способ подготовки к использованию.

Подготовка среды к использованию приведена в 4.3.3.3.

4.3 Подготовка к проведению анализов

4.3.1 Подготовка посуды

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

4.3.1.2 Пробирки, колбы, бутылки закрывают ватно-марлевыми пробками, покрывают колпачком так, чтобы исключить загрязнение после стерилизации в процессе работы и хранения. В случае исполь-

---

[1)] Питательная среда является рекомендуемой к применению. Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение указанной питательной среды. Допускаются к использованию питательные среды производства других изготовителей, предназначенные для целей описываемых методов. Рекомендуемые специальные микробиологические среды «NÄHRAGAR DEV — Agar», «OFS-Agar», LMC — concentrate», «TF-B» и «TF-G» производятся компанией «Doehler GmbH» (Германия), имеют сертификат ИСО 9001:2000.

зования стерильной одноразовой посуды ее стерилизацию не проводят. Перед стерилизацией пипетки со вставленными тампонами из ваты и чашки Петри в закрытом виде укладывают в металлические пеналы или обертывают крафт-бумагой, после чего стерилизуют. Бумага, используемая для обертывания лабораторной посуды, не должна разрушаться при стерилизации. Режим стерилизации посуды по ГОСТ 26668 (1.2).

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

4.3.1.4 Посуду с микробиологическими средами после проведения анализа обеззараживают перед мойкой путем стерилизации в автоклаве при температуре (121 ± 2) °С в течение 30 мин или кипячением в течение 1 ч.

4.3.2 Приготовление реактивов и растворов

4.3.2.1 Приготовление водного раствора объемной долей перекиси водорода 3 %

Для приготовления водного раствора объемной долей перекиси водорода 3 % к 10 см^3 раствора перекиси водорода объемной долей 30 % добавляют 90 см^3 дистиллированной воды. В случае, если используют раствор перекиси водорода с другой объемной долей, проводят пересчет.

4.3.2.2 Приготовление водного раствора объемной долей этилового спирта 70 %

Для приготовления водного раствора объемной долей этилового спирта 70 % к 70 см^3 96 %-ного этилового спирта по ГОСТ Р 51652 добавляют 26 см^3 дистиллированной воды. Применяют для асептической обработки тары при отборе проб для анализа.

4.3.2.3 Приготовление стерильной воды

Стерильную воду получают путем фильтрации дехлорированной питьевой воды через стерильный мембранный фильтр диаметром пор 0,2 мкм или стерилизацией в течение 30 мин при температуре (121 ± 2) °С.

4.3.2.4 Сроки хранения реактивов и растворов не должны превышать одного месяца. Водный раствор перекиси водорода объемной долей 3 % необходимо хранить при температуре 0 °С—8 °С в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

4.3.3 Подготовка специальных микробиологических сред к проведению анализа

4.3.3.1 Среды № 1 и № 2

Нераспечатанную бутылку с твердыми средами № 1 и № 2 нагревают на водяной бане до перехода микробиологической среды из твердого состояния в жидкое. Температура воды в водяной бане не должна превышать 95 °С. После того как среда расплавилась, ее медленно охлаждают до температуры 45 °С—48 °С. При охлаждении среды следует избегать перепада температур более 20 °С.

Расплавленную среду можно хранить в жидком состоянии в водяной бане при температуре 45 °С—48 °С не более 2 ч.

4.3.3.2 Среда № 3

Для проведения анализа путем внесения пробы воды непосредственно в бутылку с концентратом подготовка не требуется.

Для проведения анализа пробы методом мембранной фильтрации или анализа пробы, взятой методом свобирования, в бутылку с концентратом доливают стерильную воду до горловины бутылки и содержимое перемешивают, после чего среда готова к использованию.

4.3.3.3 Среда № 5

Приготовление 1 дм^3 готовой среды № 5:

В термостойкую емкость (колбу Эрленмейера) объемом 1,5 дм^3 вносят 60 г компонента 1 и постепенно, перемешивая, добавляют 1 дм^3 деминерализованной воды.

Полученный раствор нагревают на магнитной мешалке с подогревом до температуры 48°С—52 °С при непрерывном перемешивании.

При достижении температуры раствора (50 ± 2) °С, добавляя компонент 2, корректируют уровень pH раствора до 4,3—4,4. При выполнении коррекции необходимо использовать pH-метр с автоматической термокомпенсацией.

После проведения коррекции pH раствор нагревают до температуры 85 °С—87 °С и выдерживают при этой температуре в течение 60 с. ВНИМАНИЕ! Температура раствора не должна превышать 87 °С!

Соблюдая правила асептики, разливают готовую среду № 5 в чистые емкости (термостойкие бутылки с термостойкими крышками) и укупоривают. Применяют емкости и завинчивающиеся крышки, способные выдерживать температуру не ниже 120 °С.

Наполненные емкости переворачивают вверх дном или придают им горизонтальное положение с целью обеспечения пастеризации крышки и внутренней поверхности емкости над жидкостью.

Готовая микробиологическая среда № 5 имеет бледно-опаловый цвет и может иметь уплотнения коллоидной структуры, что не влияет на результаты анализа.

4.3.3.4 Хранение готовых микробиологических сред

Готовые микробиологические среды, разлитые в тару, хранят следующим образом:

Среды № 1, 2, 3 и раствор питательной среды № 3 хранят при температуре (4 ± 2) °С не более одного месяца.

Среду № 4 хранят в соответствии с инструкцией на упаковке.

Среду № 5 хранят в течение четырех недель со дня приготовления при температуре 0 °С—8 °С.

По истечении срока хранения микробиологические среды использованию не подлежат.

4.3.4 Подготовка мембранных фильтров и фильтровального прибора. Порядок работы с применением метода мембранной фильтрации

4.3.4.1 Для фильтрации используют стерильные и нестерильные мембранные фильтры размером пор 0,45 мкм.

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.

4.3.4.2 Перед фильтрацией пробы воронку и столик обтирают ватным тампоном, смоченным водным раствором объемной долей этилового спирта 70 % и стерилизуют фламбированием. После охлаждения на столик фильтровального прибора кладут фламбированным пинцетом мембранный фильтр, устанавливают воронку и закрепляют держателем.

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

4.3.4.3 Анализируемый объем пробы выливают в воронку и включают вакуум-насос. При отсутствии мерных уровней в воронке для внесения необходимого объема пробы используют стерильные цилиндры или стерильные пипетки. При фильтровании 1 $см^3$ анализируемой пробы в воронку предварительно заливают не менее 10 $см^3$ стерильной воды, после чего вносят анализируемую пробу.

4.3.4.4 По окончании фильтрации пробы фильтр промывают 10—20 $см^3$ стерильной воды. После прохождения жидкости через фильтр воронку держат под вакуумом в течение 3—5 с (до полного удаления следов жидкости), после чего насос отключают.

С помощью клапана (или посредством снятия шланга с вакуум-насоса) выравнивают давление под мембраной до атмосферного, снимают воронку и с помощью фламбированного пинцета осторожно снимают фильтр с установки.

4.3.4.5 Открывают чашку Петри с предварительно разлитой и охлажденной (застывшей) микробиологической средой и накладывают фильтр на микробиологическую среду так, чтобы между ним и поверхностью питательной среды не оставались 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 разрешается поместить в зависимости от диаметра фильтра и чашки Петри от одного до четырех фильтров так, чтобы фильтры не соприкасались.

4.3.4.6 Перед фильтрацией следующей пробы столик и воронку прибора вакуумного фильтрования тщательно фламбируют.

4.4 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) с использованием агаризованной среды № 1

4.4.1 Метод прямого посева в чашки Петри

Метод основан на непосредственном внесении анализируемого объема пробы воды; анализируемой массы (объема) концентрированного сока, сахарного сиропа, купажного сиропа, готового продукта или их разведения в агаризованную среду, инкубировании посевов и подсчете всех выросших колоний и позволяет определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ).

Анализ проводят в двух повторностях.

4.4.1.1 Проведение анализа

Отобранную пробу или ее разведение по ГОСТ 26669 тщательно перемешивают, после чего стерильной пипеткой вносят в стерильную чашку Петри (при анализе пробы большой массы (объема) используют несколько чашек Петри). Затем в асептических условиях заливают расплавленной и охлаж-

денной до температуры 45 °С—48 °С средой № 1, предварительно обработав фламбированием края посуды, в которой она содержится.

Соотношение между массой (объемом) анализируемой пробы или ее разведением и объемом питательной среды 1:5.

Содержимое чашки Петри аккуратно перемешивают круговыми движениями, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки.

После застывания агара чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют:

- при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч — при анализе проб воды;
- при температуре (30 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч — при анализе проб концентрированных соков, сахарных сиропов, купажных сиропов и готовых продуктов.

4.4.1.2 Обработка результатов

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке Петри, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой увеличением 4 — 10^x. Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами.

Для подсчета колоний в чашках, засеянных разведениями пробы, отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 100 колоний.

При большом количестве колоний и равномерном их распределении дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов. Подсчитывают количество колоний на двух — трех секторах (но не менее чем на 1/3 поверхности чашки), находят среднеарифметическое значение количества колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки. Таким образом находят общее количество колоний, выросших на одной чашке.

Подсчитывают колонии микроорганизмов в каждом из параллельных посевов и по результатам подсчета вычисляют среднеарифметическое значение количества колоний в анализируемой пробе.

Если в чашках, засеянных разведениями анализируемой пробы, имеются колонии, выросшие в последующих разведениях, то количеством микроорганизмов в анализируемой пробе будет среднеарифметическое значение количества колоний, предварительно подсчитанное по каждому разведению раздельно.

Полученное среднеарифметическое значение количества колоний округляют до целого значения.

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

$$M = N/m\ C, \qquad (1)$$

где N — степень разведения навески;

m — масса (объем) анализируемой пробы, внесенная в чашку Петри, г (см^3);

C — округленное среднеарифметическое значение количества колоний.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) выражают КОЕ/см^3 или КОЕ/г, где КОЕ — колониеобразующая единица.

Результат вычисления выражают числом от 1,0 до $9{,}9 \times 10^n$.

4.4.2 Метод мембранной фильтрации

Метод основан на посеве анализируемой пробы с использованием мембранных фильтров на агаризованную среду № 1, инкубировании посевов и подсчете всех видимых колоний, выросших на фильтре.

Метод позволяет определить количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в питьевой исходной, технологической и технологической промывной воде, прозрачных и замутненных напитках, легко фильтруемых через мембрану и подготовленных к анализу пробах концентрированных соков, купажных сиропов, сахарных сиропов и труднофильтруемых напитков.

Анализ проводят в двух повторностях.

4.4.2.1 Проведение анализа

При проведении анализа концентрированных соков, купажных сиропов, сахарных сиропов, труднофильтруемых напитков отобранную пробу подготавливают методом разведения. Для этого массу (объем) анализируемой пробы разбавляют в соотношении 1:100 стерильной водой.

Массу (объем) легкофильтруемой анализируемой пробы или ее разведение фильтруют в соответствии с 4.3.4.

Мембранный фильтр переносят на поверхность агаризованной среды в чашку Петри.

Чашку Петри с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют:

Температура инкубирования:

- при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч — при анализе проб воды;
- при температуре (30 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч — при анализе проб концентрированных соков, купажных сиропов, сахарных сиропов и готовых продуктов.

4.4.2.2 Обработка результатов

Количество выросших колоний подсчитывают на каждом фильтре отдельно, пользуясь лупой увеличением 4—10^x.

Для подсчета колоний, полученных после фильтрации разведений анализируемой пробы, отбирают чашки с фильтрами, на которых выросло от 15 до 100 колоний.

При большом количестве колоний и равномерном их распределении фильтр делят на четыре и более одинаковых секторов. Подсчитывают количество колоний на 2—3 секторах фильтра (но не менее чем на 1/3 поверхности фильтра), находят среднеарифметическое значение количества колоний и умножают на общее количество секторов всего фильтра. Таким образом находят общее количество колоний, выросших на одном фильтре.

Подсчитывают колонии микроорганизмов в каждом из параллельных посевов и по результатам подсчета вычисляют среднеарифметическое значение числа колоний в анализируемой пробе.

Если в чашках на фильтрах имеются колонии, полученные после фильтрации последующих разведений, то количеством микроорганизмов в анализируемой пробе будет среднеарифметическое значение количества колоний, предварительно подсчитанное по каждому разведению отдельно.

Полученное среднеарифметическое значение количества колоний округляют до целого значения.

Количество микроорганизмов в пересчете на 1,0 г (см^3) анализируемого продукта вычисляют по 4.4.1.2 (1).

4.5 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в питьевой исходной, технологической и технологической промывной воде

4.5.1 Метод прямого посева

Метод основан на выявлении бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) путем непосредственного внесения анализируемого объема пробы в среду № 3, инкубировании посева и получении результата.

Метод позволяет получить качественный результат о наличии в анализируемой пробе питьевой исходной, технологической и технологической промывной воды бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

4.5.1.1 Проведение анализа

Соблюдая правила асептики, укупоренную бутылку со средой № 3 вскрывают и вносят в нее пробу анализируемой воды до нижнего уровня горлышка бутылки.

Бутылку со средой № 3 укупоривают той же крышкой и содержимое аккуратно перемешивают.

Бутылку с внесенной пробой помещают в термостат для инкубирования при температуре:

(37 ± 1) °С — для определения общих колиформных бактерий;

(44,0 ± 0,5) °С — для определения термотолерантных колиформных бактерий.

При определении общих колиформных бактерий предварительный анализ результатов проводят через 24 ч. Окончательное подтверждение получают через 48 ч с начала инкубирования.

При определении термотолерантных колиформных бактерий окончательный результат анализа получают через 24 ч.

4.5.1.2 Обработка результатов

При наличии в анализируемой пробе воды бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) происходит изменение цвета засеянной среды с фиолетового на желтый или его оттенки с выделением газа, хорошо видимого при встряхивании бутылки с засеянной средой.

4.5.2 Метод мембранной фильтрации

Метод основан на выявлении бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) путем фильтрации анализируемого объема пробы через мембранные фильтры, переносе мембранного фильтра в микробиологическую среду, инкубировании пробы и получении результата анализа.

Метод позволяет получить качественный результат о наличии в анализируемой пробе питьевой исходной, технологической и технологической промывной воды бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).

4.5.2.1 Проведение анализа

Соблюдая правила асептики, укупоренную бутылку со средой № 3 вскрывают и вносят в нее стерильную воду до нижнего уровня горлышка бутылки. В результате разведения получают рабочий раствор микробиологической среды № 3.

Анализируемый объем пробы питьевой исходной, технологической воды и 100 см^3 анализируемой пробы технологической промывной воды фильтруют в соответствии с 4.3.4.

После окончания фильтрации мембранный фильтр переносят в стерильную пробирку и заливают подготовленной микробиологической средой № 3 таким образом, чтобы фильтр был полностью погружен в среду.

После чего пробирку помещают в термостат для инкубирования при температуре (37 ± 1) °С. Предварительный анализ результатов проводят через 24 ч. Окончательное подтверждение получают через 48 ч с момента начала инкубирования засеянной среды.

4.5.3 Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.5.1.2.

4.6 Определение дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий

4.6.1 Проведение анализа с использованием микробиологической среды № 2

4.6.1.1 Метод прямого посева в чашки Петри

Метод основан на непосредственном внесении массы (объема) анализируемой пробы в чашки Петри, инкубировании посевов и подсчете всех выросших колоний.

Метод позволяет проводить определение дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий в анализируемой пробе концентрированного сока, сахарного сиропа, купажного сиропа с осветленным соком или с соком с мякотью и в пробах нефильтруемых готовых продуктов.

Анализ проводят в двух повторностях.

Проведение анализа

Отобранную пробу или ее разведения, приготовленные по ГОСТ 26669, тщательно перемешивают, после чего стерильной пипеткой вносят в стерильную чашку Петри (при анализе пробы большого объема используют несколько чашек Петри). Затем в асептических условиях заливают расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С—48 °С средой № 2, предварительно обработав фламбированием края посуды, в которой она содержится.

Соотношение между массой (объемом) анализируемой пробы или ее разведениями и объемом питательной среды 1:5.

Содержимое чашки Петри аккуратно перемешивают круговыми движениями, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки.

После застывания агара чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (28 ± 2) °С в течение 48 ч.

Обработка результатов

Через 48 ч инкубирования проводят учет типичных колоний визуально. При необходимости для первичной идентификации колоний микроорганизмов проводят микроскопирование. Для этого из отдельной колонии готовят препараты методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной воды. Затем в эту каплю стерильной микробиологической петлей вносят часть колонии, размешивают и покрывают покровным стеклом. Капля с анализируемым материалом должна быть такой, чтобы после прижимания ее покровным стеклом суспензия не выступала из-под стекла. В противном случае, избыток суспензии удаляют кусочком фильтровальной бумаги. Микроскопирование препаратов проводят с объективами увеличением 20^x, 40^x или 100^x.

Дрожжевые клетки — круглой, овальной или продолговатой формы, часто пачкующиеся, длиной 2,5—10 мкм.

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

Характеристика колоний отдельных видов микроорганизмов:

дрожжи — матовые, желто-белесые или красные колонии. Частично наблюдается звездообразный рост или образование белой пленки.

Плесневые грибы — образуют большой круглый мицелий с белым краем (обычно диаметром более 0,5 см) с зеленой, коричневой или черной серединой.

Молочнокислые бактерии образуют мелкие блестящие, эллиптические колонии на поверхности и внутри питательной среды. Запах слегка кислый, напоминает прогорклое масло. Каталазоотрицательные.

Уксуснокислые бактерии — блестящие колонии со специфическим запахом уксусной кислоты. Каталазоположительные.

При определении количества дрожжей и плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий все колонии (при необходимости подтвержденные микроскопированием) подсчитывают отдельно, пользуясь лупой увеличением $4—10^x$.

Для подсчета колоний в чашках, засеянных разведениями анализируемой пробы, отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 100 колоний.

Колонии каждого вида микроорганизмов подсчитывают в каждом из параллельных посевов и находят среднеарифметическое значение количества колоний каждого вида в соответствии с 4.4.1.2.

Дифференцирование уксуснокислых и молочнокислых бактерий

При необходимости проводят дифференцирование уксуснокислых и молочнокислых бактерий с помощью каталазного теста. Для проведения анализа капают в одиночную колонию одну каплю водного

раствора объемной долей перекиси водорода 3 %. При этом каталазоположительные уксуснокислые бактерии дают сильную реакцию с выделением пузырьков газа, в то время как каталазоотрицательные молочнокислые бактерии не дают никакой реакции.

4.6.1.2 Метод мембранной фильтрации

Метод основан на высеве пробы с использованием мембранных фильтров на агаризованную среду № 2, инкубировании посевов и подсчете всех видимых колоний, выросших на фильтре.

Метод позволяет проводить определение дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий в технологической промывной воде, легкофильтруемых напитках, подготовленных к анализу концентрированных соках, сахарных сиропах и купажных сиропах с осветленным соком.

Анализ проводят в двух повторностях.

Проведение испытаний

При проведении анализа концентрированных соков, сахарных сиропов и купажных сиропов отобранную пробу подготавливают методом разведения. Для этого массу (объем) анализируемой пробы разбавляют в соотношении 1:100 стерильной водой.

Массу (объем) легкофильтруемой анализируемой пробы или разведение массы (объема) анализируемой пробы, или 100 см^3 анализируемой технологической промывной воды фильтруют в соответствии с 4.3.4.

Мембранный фильтр переносят на поверхность агаризованной среды в чашку Петри.

Чашки Петри с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 48 ч.

Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.6.1.1.

4.6.2 Проведение анализа с использованием микробиологических сред № 4 и 5

Метод используют для качественного выявления дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий, вызывающих порчу продукции, в соках, нектарах, сокосодержащих напитках с pH ≤ 4,2 и pH ≥ 4,2 и труднофильтруемых продуктах, в которых наличие данных микроорганизмов не допускается, а также для подтверждения правильности санитарной обработки предприятия.

Инкубирование упаковок с готовыми продуктами перед проведением анализа не проводят.

4.6.2.1 Проведение анализа

Анализ технологической промывной воды

Пробу воды объемом 100 см^3 фильтруют в соответствии с 4.3.4.

После проведения фильтрации мембранный фильтр переносят в стерильную цилиндрической формы емкость (далее — туба) и заливают раствором среды № 5 таким образом, чтобы фильтр был полностью погружен в раствор среды.

Тубу помещают в термостат на 24—48 ч при температуре (28 ± 1) °С.

Анализ пастеризованного сахарного сиропа, купажного сиропа

В асептических условиях в стерильную тубу вносят массу (объем) анализируемой пробы сиропа и раствор среды № 5 в соотношении 1:5 (например: к 10 г (см^3) пробы приливают 50 см^3 среды № 5).

Содержимое тубы аккуратно перемешивают путем легкого встряхивания.

Тубу помещают в термостат на 24—48 ч при температуре (28 ± 1) °С.

Анализ концентрированных пастеризованных соков

В асептических условиях откупоривают бутылку со средой № 4 и вносят в нее массу (объем) анализируемой пробы, но не более 80 г (см^3). При анализе проб большей массы (объема) используют несколько бутылок со средой № 4.

Содержимое бутылки укупоривают той же крышкой и аккуратно перемешивают.

Бутылку помещают в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24 ч.

По истечении 24 ч, предварительно перемешав содержимое легким встряхиванием бутылки, проводят пересев обогащенной пробы по одному из вариантов:

Вариант 1

Обогащенную анализируемую пробу объемом 1—5 см^3 в асептических условиях переносят в тубу, содержащую 30—50 см^3 среды № 5.

Тубу помещают в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24 ч.

Вариант 2

Обогащенную анализируемую пробу объемом 1—5 см^3 переносят в стерильную чашку Петри, затем в асептических условиях заливают расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С—48 °С средой № 2. Содержимое чашки Петри аккуратно перемешивают круговыми движениями, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки.

После застывания агара чашки Петри помещают вверх дном в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24 ч.

Обработка результатов при посеве анализируемой пробы в тубу

Любое визуально видимое изменение внешнего вида засеянной среды (образование уплотнений структуры геля, звездочек, нитей или другое) говорит о наличии в анализируемой пробе микроорганизмов, вызывающих порчу продукта.

В случае загрязнения анализируемой пробы только одним типом микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов, наблюдается изменение засеянной среды № 5 по зонам.

Например:

помутнение пробы через 24 ч инкубирования и видимое невооруженным глазом помутнение раствора в донной части пробы через 48 ч инкубирования свидетельствует о наличии в пробе молочнокислых бактерий.

Помутнение пробы через 24 ч инкубирования и видимый невооруженным глазом рост в толще и с признаками брожения на поверхности через 48 ч инкубирования свидетельствует о наличии в пробе дрожжей.

Легкое помутнение пробы в верхней части через 24 ч инкубирования и хорошо видимое невооруженным глазом помутнение пробы в верхней части через 48 ч инкубирования свидетельствует о наличии в пробе уксуснокислых бактерий.

Рост на поверхности пробы в виде тонкой пленки через 24 ч и образование мицелия, видимого невооруженным глазом, через 48 ч свидетельствует о наличии в пробе плесневых грибов.

При необходимости первичной идентификации микроорганизмов проводят микросколирование пробы методом раздавленной капли. Для этого на предметное стекло наносят каплю стерильной воды. Затем в эту каплю стерильной микробиологической петлей вносят часть анализируемой пробы, размешивают и покрывают покровным стеклом. Избыток суспензии удаляют кусочком фильтровальной бумаги.

Микроскопирование препаратов проводят с объективами увеличением $20^{\times}$, $40^{\times}$ или $100^{\times}$. Наличие в анализируемой пробе микроорганизмов говорит о ее несоответствии требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов.

Обработка результатов при посеве анализируемой пробы в чашку Петри

Обработку результатов проводят по 4.6.1.1.

Заключение об отсутствии в анализируемой пробе микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов, делают, если не отмечен рост дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий.

4.7 Определение соответствия готовых продуктов требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих их порчу (дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий)

Данный метод позволяет подтвердить отсутствие или наличие микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов в течение 48 ч без предварительного инкубирования готового продукта.

Анализ готовых продуктов, имеющих pH < 4,2, выполненный этим методом, позволяет подтвердить отсутствие микроорганизмов, вызывающих их порчу.

Анализ готовых продуктов, имеющих pH 4,2 и выше, выполненный этим методом, позволяет подтвердить отсутствие микроорганизмов, вызывающих их порчу, только при условии полного отсутствия микробиологического роста, определенного в соответствии с 4.7.1 и 4.9.

4.7.1 Проведение анализа

Анализируемый готовый продукт в невскрытой упаковке перемешивают.

Упаковку с анализируемым готовым продуктом подготавливают для асептического вскрытия, после чего ее вскрывают.

В асептических условиях откупоривают бутылку со средой № 4, вносят в нее анализируемый готовый продукт до нижнего уровня горлышка бутылки и укупоривают той же крышкой.

Содержимое бутылки аккуратно перемешивают.

Бутылку с засеянной средой помещают в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24 ч.

По истечении 24 ч, предварительно перемешав засеянную среду легким встряхиванием бутылки, обогащенную пробу объемом 1—5 $см^3$ переносят в тубу со средой № 5, которую помещают в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24 ч.

4.7.2 Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.6.2.1 (обработка результатов при посеве анализируемой пробы в тубу).

Заключение об отсутствии микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, делают только в случае, если визуально не отмечено изменение внешнего вида засеянной среды № 5 после культивирования в термостате.

4.8 Определение соответствия готовых продуктов требованиям к отсутствию индикаторной, патогенной, условно-патогенной лимитируемой микрофлоры, в том числе B. subtilis, B. cereus, B. polymyxa, S. aureus, мезофильных клостридий (в том числе группы C. botulinum, C. Perfringens), сульфитредуцирующих клостридий, сальмонелл

4.8.1 Метод прямого посева

Данный анализ проводят с целью подтверждения отсутствия патогенных, условно-патогенных микроорганизмов индикаторов и микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, имеющих pH 4,2 и выше.

Инкубирование упаковки готового продукта перед проведением анализа не проводят.

4.8.1.1 Проведение анализа

В стерильную чашку Петри вносят массу (объем) анализируемой пробы готового продукта и заливают ее расплавленной и охлажденной до температуры 45 °С—48 °С средой № 1 в соотношении 1 : 5.

Внесение среды № 1 в чашку Петри осуществляют после фламбирования края бутылки, в которой содержится среда.

Содержимое чашки Петри аккуратно перемешивают круговыми движениями, избегая образования пузырьков воздуха, попадания агара на края и крышку чашки.

После застывания агара чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 2) ч.

Анализ проводят в двух повторностях.

4.8.1.2 Обработка результатов

Заключение об отсутствии индикаторной, патогенной, условно-патогенной лимитируемой микрофлоры, сульфитредуцирующих клостридий, сальмонелл в готовых продуктах делают только при условии отсутствия микробиологического роста, определяемого в соответствии с 4.7.1, 4.8.1.1 и 4.9.

4.9 Метод подтверждения готовности линии розлива по микробиологическим показателям к производству асептически упаковываемых готовых продуктов

Внутризаводской контроль линии для подтверждения возможности розлива асептически упаковываемых коммерческих продуктов проводят для подтверждения готовности новой линии при вводе ее в эксплуатацию и затем в процессе эксплуатации линии после проведения пятиступенчатой обработки линии розлива, но не чаще одного раза в день.

4.9.1 Проведение анализа

4.9.1.1 Отбор проб

После проведения пятиступенчатой санитарной обработки оборудования по замкнутому циклу (безразборная мойка) снимают стаканы с наливных кранов блока розлива.

Переводят блок розлива в ручной режим управления.

Создают противодавление 0,6—1,0 бар в круговой камере блока розлива, подав на блок розлива газ противодавления (при условии, что блок розлива работает по изобарическому принципу). В случае использования блока горячего розлива вакуумного типа — на кольцевую камеру подают вакуум.

В случае использования блока розлива атмосферного типа создавать противодавление и обеспечивать подачу вакуума не требуется.

Включают подачу технологической стерильной воды на блок розлива.

Подают бутылки по транспортеру к блоку розлива в обычном рабочем режиме, при этом отсекатель бутылок на входе в моноблок закрывают, останавливая их таким образом перед блоком розлива. При отсутствии отсекателя бутылок на входе в моноблок подачу бутылок на розлив останавливают вручную. Пронумеровывают бутылки в соответствии с количеством отбираемых проб. Количество отбираемых проб при розливе готового продукта в бутылки составляет 25 % от общего количества наливных кранов.

Включают подачу пробок на блок розлива.

Включают подачу бутылок на блок розлива на минимальной скорости, пропускают бутылки через ополаскиватель (ринзер), далее пропускают бутылки на розлив (происходит налив технологической стерильной воды в бутылки в режиме, как это обычно происходит во время розлива готового продукта). Бутылки, заполненные технологической стерильной водой, поступают на укупорочный автомат, затем укупоренные бутылки поступают на разгрузочный конвейер блока розлива. При поступлении бутылок на ринзер, а затем на розлив отмечают номер форсунки-жета и номер наливного крана, на которые поступила первая бутылка.

Укупоренные пронумерованные бутылки снимают с конвейера и направляют на анализ.

При контроле оборудования типа «Тетра-Пак», «Ело-Пак» и подобных технологической стерильной водой, оставшейся в системе после проведения пятиступенчатой обработки линии розлива, заполняют десять упаковок и направляют их на анализ.

4.9.1.2 Проведение анализа

Анализ проб выполняют методом мембранной фильтрации.

При этом из каждой отобранной упаковки фильтруют 100 см^3 воды в соответствии с 4.3.4 и инкубируют в соответствии с 4.5.2.

Оставшийся объем воды из каждой упаковки фильтруют в соответствии с 4.3.4 и инкубируют в соответствии с 4.6.1.2.

4.9.1.3 Обработка результатов

Оборудование розлива признают годным для первичного ввода в коммерческую эксплуатацию для производства асептически упаковываемых готовых продуктов, если две независимых серии анализов технологической промывной воды, отобранной после проведения пятиступенчатой обработки линии розлива с промежутком времени между отбором проб не менее чем 24 ч, показали отсутствие колиформных бактерий, определяемых по 4.5.2, и отсутствие роста любых видов микрофлоры, определяемых по 4.6.1.2.

Образцы разлитого в упаковки готового продукта после проведения сертификации линии должны отвечать требованиям, определяемым по 4.7.1 и (если необходимо) по 4.8.1.1.

Если в процессе коммерческой эксплуатации хотя бы одна анализируемая проба обнаружила рост микрофлоры, все партии готового продукта, произведенные после пятиступенчатой обработки линии розлива, ставят на карантин. Затем производят повторный отбор проб готового продукта по ГОСТ 26668 и анализ их на определение соответствия требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу готового продукта по 4.7.1 и (при необходимости) по 4.8.1.1.

Если повторный анализ проб выявил отсутствие микроорганизмов, вызывающих порчу готового продукта, партии готового продукта отпускают с карантина для реализации в торговой сети.

Если в результате повторного расширенного анализа выявлено несоответствие готового продукта требованиям 4.7.1 и 4.8.1.1, проводят дополнительный анализ готового продукта с отбором проб от каждого поддона.

4.10 Контроль бутылок после бутылкомоечной машины или устройства для ополаскивания бутылок (ринзера) на соответствие требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, индикаторной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры

Контроль бутылок проводят методом мембранной фильтрации после выхода бутылок из бутылкомоечной машины или после проведения стадии ополаскивания бутылок на ополаскивателе (ринзере).

4.10.1 Проведение анализа

Для анализа асептически отбирают пять — десять бутылок после бутылкомоечной машины или ринзера. В первую бутылку наливают 350 см^3 стерильной воды и вращательными движениями омывают всю внутреннюю поверхность бутылки. В следующую бутылку переносят воду из предыдущей бутылки и таким же образом омывают всю внутреннюю поверхность бутылки.

Последовательно омывают внутренние поверхности оставшихся бутылок описанным выше способом.

Если объем бутылок менее 350 см^3, то в первую бутылку наливают стерильную воду до нижнего уровня горлышка бутылки и омывают последовательно все бутылки описанным выше способом. Затем промывную воду из последней бутылки переливают в стерильную емкость объемом 350 см^3, стерильной водой доводят объем промывной воды до 350 см^3 и перемешивают.

Полученную промывную воду анализируют методом мембранной фильтрации. Для этого фильтруют в соответствии с 4.3.4:

- 100 см^3 для определения КМАФАнМ по 4.4.2.1;
- 100 см^3 для определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) по 4.5.2.1;
- 100 см^3 для определения дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий по 4.6.1.2.

4.10.2 Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.4.2.2, 4.5.1.2 и 4.6.1.1.

4.11 Контроль укупорочного материала на соответствие требованиям к отсутствию микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, индикаторной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры

Анализ укупорочного материала проводят методом мембранной фильтрации с предварительным ополаскиванием укупорочного материала.

4.11.1 Проведение анализа

Для анализа отбирают в стерильный стакан или пакет типа «WHIRL-PAK» стерильным пинцетом десять пробок. Заливают пробки 350 см^3 стерильной воды, перемешивают таким образом, чтобы омыть всю внутреннюю и внешнюю поверхность пробок.

Полученную промывную воду анализируют методом мембранной фильтрации. Для этого фильтруют в соответствии с 4.3.4:

- 100 см^3 для определения КМАФАнМ по 4.4.2.1;
- 100 см^3 для определения бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) по 4.5.2.1;
- 100 см^3 для определения дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий по 4.6.1.2.

4.11.2 Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.4.2.2, 4.5.1.2 и 4.6.1.1.

4.12 Контроль воздуха в производственных помещениях по микробиологическим показателям

Определение количества микроорганизмов, вызывающих порчу готовых продуктов, в воздухе производственных помещений проводят в пробах, полученных методом осаждения (седиментационным методом).

Анализ проводят в двух повторностях.

4.12.1 Проведение анализа

Чашки Петри со средой № 2 переносят в помещение, где анализируют воздух. Затем сдвигают крышки чашек так, чтобы вся поверхность агаризованной среды была открыта полностью. Отбор проб воздуха проводят в течение 5, 10 или 15 мин. Затем чашки закрывают крышками и помещают в термостат при температуре (28 ± 1) °С на 48 ч.

4.12.2 Обработка результатов

Количество выросших колоний подсчитывают в каждой чашке Петри. При большом количестве колоний поверхность чашки Петри делят на сектора и находят общее количество колоний, выросших на всей поверхности чашки Петри.

После подсчета колоний в параллельной пробе находят среднеарифметическое значение количества колоний, которое округляют до целого числа.

Если количество колоний не поддается подсчету, то результат данного анализа означает сплошное заражение пробы. Анализ воздуха должен быть повторен с сокращением времени отбора проб.

Определение количества микроорганизмов в 1 м^3 воздуха x вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 5}{ST} 100, \qquad (2)$$

где a — среднеарифметическое значение количества выросших колоний;

100 — пересчет площади чашки на 100 см^2;

5 — время экспозиции чашки, мин (за 5 мин на поверхность плотной микробиологической среды в чашке Петри площадью 100 см^2 оседает столько микроорганизмов, сколько их содержится в 10 дм^3 воздуха);

S — площадь чашки Петри, см^2;

T — время отбора проб воздуха, мин;

100 — пересчет на 1 м^3 воздуха.

4.13 Контроль состояния поверхностей производственного оборудования и помещений по микробиологическим показателям методом свобирования

Определение микроорганизмов, вызывающих порчу продукции (дрожжей, плесневых грибов, молочнокислых и уксуснокислых бактерий), на поверхностях производственного оборудования и помещений проводят как с применением количественного, так и качественного анализа.

4.13.1 Проведение количественного анализа

Для проведения количественного анализа отбирают пробы с указанных поверхностей методом стирания (методом свобирования) стерильными свобами. После отбора пробы своб быстро, максимально избегая дополнительного загрязнения воздухом, помещают в стерильную пробирку, заполненную 10—30 см^3 стерильной воды, укупоривают стерильной пробкой и аккуратно перемешивают для обеспечения смыва микроорганизмов в воду.

Затем анализируемую пробу фильтруют в соответствии с 4.3.4.

Мембранный фильтр переносят на поверхность агаризованной среды № 2 в чашку Петри.

Чашку Петри с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 48 ч.

Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.6.1.1.

4.13.2 Проведение качественного анализа

Для проведения качественного анализа отбирают пробы с указанных поверхностей методом стирания (методом свобирования) стерильными свобами.

После отбора пробы своб быстро, максимально избегая дополнительного загрязнения воздухом, помещают в тубу с 30—50 $см^3$ среды № 5.

Тубу с засеянной средой помещают в термостат и инкубируют при температуре (28 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.6.2.1.

4.13.3 Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) на поверхностях производственного оборудования и помещений проводят с применением качественного анализа.

4.13.3.1 Проведение анализа

Для проведения качественного анализа отбирают пробы с указанных поверхностей методом стирания (методом свобирования) стерильными свобами.

После отбора пробы своб быстро, максимально избегая дополнительного загрязнения воздухом, помещают в пробирку с 10—15 $см^3$ рабочего раствора среды № 3, приготовленного по 4.3.3.2.

Пробирку с засеянной средой помещают в термостат и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

Обработка результатов

Обработку результатов проводят в соответствии с 4.5.1.2.

УДК 664.8/.9.001.4:006.354 ОКС 07.100.30 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: консервы, соки, нектары, сокосодержащие напитки, концентрированные фруктовые соки, методы микробиологического анализа, микробиологические среды, мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии), дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые и уксуснокислые бактерии, линия розлива асептически упаковываемых готовых продуктов, укупорочный материал, воздух производственных помещений

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Подписано в печать 20.01.2009. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,30. Тираж 503 экз. Зак. 15.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru »@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru