УТВЕРЖДАЮ
Заместитель главного
государственного санитарного
врача СССР
А.И.ЗАЙЧЕНКО
N 4105—86
20 мая 1986 г.

САНИТАРНЫЕ ПРАВИЛА ПО ПРОИЗВОДСТВУ И ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА БУМАГИ И КАРТОНА, ВЫРАБОТАННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКУЛАТУРЫ И ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ УПАКОВКИ СУХИХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

1. Введение

В настоящих методических рекомендациях изложены условия производства, область применения бумаги и картона на основе макулатуры, а также подходы и методы их гигиенической оценки.

Бумага и картон, содержащие макулатуру, могут быть использованы для упаковки пищевых продуктов с влажностью не более 15%.

Для изготовления бумаги и картона может быть использована макулатура ГОСТ 10700—84, марок МС—1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 светлых тонов (белая, светло-серая, светло-желтая), с интенсивностью запаха не более 1 балла в количестве до 85%.

Технология получения бумаги и картона с использованием макулатуры включает рассортировку последней по маркам, очистку и сортирование макулатурной массы в процессе приготовления, тепловую обработку при температуре 90—95°С в термодисперсионной установке (на современных технологических линиях) и контактную двустороннюю сушку бумажного или картонного полотна при температуре 90—130°С в течение 40—240 с.

Обеззараживание бумаги и картона, содержащих макулатуру, проводимое путем химической обработки макулатурной массы растворами антисептика, осуществляется в стерилизационной башне. Однако использование химических антисептиков усложняет технологический процесс, удорожает продукцию, приводит к выделению токсических газов. К тому же выбор средств, с помощью которых бумага и картон могут быть предохранены от микробиологического загрязнения, является еще большой проблемой.

Одним из наиболее простых и не требующих дополнительных капитальных затрат способов является термическое обеззараживание в сушильной части бумагоделательной машины при температуре 90—130°С. Вместе с тем в процессе технологической обработки бумага и картон, изготовленные с использованием макулатуры, могут оказаться обсемененными микроорганизмами и загрязненными солями свинца, цинка и хрома.

Источником поступления микрофлоры в технологический поток производства бумаги и картона может быть сырье (целлюлоза, макулатура, наполнитель), промышленные и оборотные воды, воздух помещений и транспорт.

Соли тяжелых металлов в бумагу и картон могут попадать из сырья, технологического оборудования, оборотной воды и др.

Для предупреждения отрицательного влияния микрофлоры и солей тяжелых металлов на организм человека в результате прямого контакта пищевых продуктов с упаковочными материалами, изготовленными с использованием макулатуры, последние подлежат гигиеническому контролю.

Заводские лаборатории 1 раз в смену должны отбирать пробы бумаги и картона для проведения органолептических и миробиологических исследований.

Санитарно-эпидемиологические станции 1 раз в квартал должны осуществлять санитарно-химические и микробиологические исследования готовой бумажной продукции.

2. Гигиенические требования к бумаге и картону на основе макулатуры

2.1. Бумага и картон, изготовленные с использованием макулатуы, должны иметь гладкую, ровную или слегка шероховатую поверхность.

2.2. Бумага и картон на основе макулатуры должны быть белого, светло-серого или светло-желтого цвета.

2.3. Бумага и картон на основе макулатуры не должны иметь постороннего запаха выше 1 балла.

2.4. Общее содержание микроорганизмов на 100 см^2 поверхности бумаги и картона на основе макулатуры не должно превышать 300 микробных клеток.

2.5. Бактерии кишечной палочки должны отсутствовать в 5 г бумаги и картона на основе макулатуры.

2.6. Сальмонеллы должны отсутствовать в 10 г бумаги и картона на основе макулатуры.

2.7. Из бумаги и картона на основе макулатуры площадью 1000 см^2 не должны вымываться хром (общий) и свинец.

2.8. Из бумаги и картона на основе макулатуры допускается миграция цинка на уровне 0,1 мг/л поверхности 1000 см^2.

gost.e-ecolog.ru

3. Санитарно-химические исследования

3.1. Отбор проб

Из рулона отбирают два куска бумаги или картона размером 25 х 10 см (можно и больше — до 1000 см[2]).

Каждый образец помещают в отдельную стеклянную колбу с пробкой, заливают 500 мл дистиллированной воды при температуре 20°С и выдерживают 6 ч. Соотношение площади поверхности образца (S) в $см^2$ (учитывают обе стороны) к объему воды (V) в мл должно быть: S:V = 1:1 $см^2$/мл.

Контрольной пробой служит дистиллированная вода в колбе, выдержанная в аналогичных условиях.

Через 6 ч вытяжку из образца переливают в чистую стеклянную емкость, проводят органолептические и химические исследования на содержание в ней ионов цинка, свинца и хрома одним из представленных методов или другим — с аналогичной чувствительностью.

3.2. Органолептические исследования

Исследования начинают с визуального осмотра сухих образцов бумаги и картона, изготовленных на основе макулатуры. Обращают внимание на состояние поверхности, цвет и запах.

Для определения запаха водных вытяжек из бумаги и картона используют три емкости. В двух из них находится вода, а в третьей — вытяжка. Дегустаторы открыто знакомятся с запахом одной контрольной пробы, а потом — закрыто с двумя остальными методом неглубокого вдоха воздуха из них. Сравнивают интенсивность запахов.

Характеристика интенсивности запаха

Описание определения	Интенсивность, обнаруженная дегустатором	Интенсивность, в баллах
Отсутствие ощутимого запаха	Никакого	0
Запах, не поддающийся обнаружению потребителем, но обнаруженный опытным дегустатором	Едва уловимый, очень слабый	1
Запах, не привлекающий внимание потребителей, но заметный, если указать на него	Слабый	2
Запах, легко обнаруживаемый	Заметный	3
Запах, обращающий на себя внимание	Отчетливый	4
Запах сильный, который вызывает неприятные ощущения	Резкий, очень сильный	5

3.3. Определение ионов хрома. Сущность метода

Метод основан на образовании растворимого соединения красно-фиолетового цвета при взаимодействии хрома с дифенилкарбазидом. Минимально определяемая концентрация — 0,05 мг/л.

3.3.1. Реактивы

1. Бидистиллированная вода. Используется для приготовления всех реактивов.
2. Фосфорная кислота, плотн. 1,68—1,70 г/$см^3$.
3. Серная кислота, разбавленный (1:1) раствор.
4. Дифенилкарбазид, 0,5%-ный раствор в ацетоне. Применяют свежеприготовленным.
5. Персульфат аммония, 0,1%-ный раствор. Применяют свежеприготовленным.
6. Бихромат калия, стандартный раствор.

а) Основной раствор. Растворяют 2,8285 г $K_2Cr_2O_{10}$, высушенного при температуре 105°С, в бидистиллированной воде и доводят объем при 20°С до 1 л в мерной колбе. 1 мл раствора содержит 1 мг хрома.

б) Рабочий стандартный раствор I. Разбавляют 25 мл основного раствора бидистиллированной водой, доводят объем до 500 мл в мерной колбе; 1 мл раствора содержит 0,050 мг хрома.

в) Рабочий стандартный раствор II. Разбавляют 20 мг рабочего стандартного раствора I бидистиллированной водой до 500 мл в мерной колбе. 1 мл раствора содержит 0,002 мг хрома. Применяют свежеприготовленным.

3.3.2. Ход определения

Вариант А (определение хрома VI).

В мерную колбу емкостью 100 мл помещают такой объем прозрачной пробы, чтобы в нем содержалось от 0,005 до 0,1 мг хрома, приливают 1 мл серной кислоты (1:1), 0,3 мл фосфорной кислоты, доводят объем бидистиллированной водой до метки и перемешивают. Добавляют 2 мл 0,5%-ного раствора дифенилкарбазида и снова перемешивают. Через 5—10 мин фотометрируют с зеленым светофильтром (λ= 540 нм) в кюветах с толщиной оптического слоя 5 см по отношению к бидистиллированной воде, обработанной как проба. Содержание хрома находят по калибровочному графику или визуальным сравнением интенсивности окраски пробы и шкалы стандартных растворов.

Вариант Б (определение общего содержания хрома).

К 100 мл неразбавленной, разбавленной или сконцентрированной выпариванием пробы, содержащей в этом объеме 0,005—0,1 мг хрома, добавляют 0,3 мл 1 н серной кислоты и 5—10 мл 0,1%-ного раствора персульфата аммония и кипятят раствор 20—25 мин. Весь персульфат должен разложиться. Раствор упаривают приблизительно до 50 мл, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и продолжают анализ по варианту А.

3.3.3. Приготовление шкалы стандартных растворов и построение калибровочного графика

При фотометрическом определении в ряд мерных колб вместимостью 100 мл вносят 0,1,2,5,10,15,20,30,40,50 мл рабочего стандартного раствора II, после доведения объемов до метки получают серию стандартов с концентрациями хрома 0, 0,02; 0,04;...1,0 мг/л. Затем проводят определение по варианту А. При фотометрическом определении по полученным величинам строят график в координатах: оптическая плотность — концентрация хрома (мг/л).

Содержание хрома (VI) и общее содержание хрома (мг/л) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A\cdot 100}{V},$$

где А — концентрация хрома, найденная по калибровочному графику;
V — объем пробы, взятой для анализа (мл);
100 — объем, до которого разбавлена проба (мл).

3.4. Определение ионов цинка и свинца

3.4.1. Качественная реакция

Для качественного определения ионов цинка и свинца можно пользоваться дитизоном. Минимально определяемое количество цинка — 0,01 мг/л, свинца — 0,04 мг/л.

300 мл вытяжки при pH 8,5—10 встряхивают с 5 мл 0,002%-ным раствором дитизона в хлороформе.

При наличии ионов цинка и свинца раствор становится красного цвета, что связано с образованием комплексного соединения.

3.4.2. Количественная реакция

Количество ионов цинка и свинца определяют с диэтилдитиокарбаминатом натрия.

Сущность метода

Метод основан на образовании комплекса ионов цинка и свинца с диэтилдитиокарбаминатом натрия, экстракции образовавшегося комплекса хлороформом и хроматографическом определении на пластинах "Silufol". Чувствительность метода: для цинка — 0,005 мг/л; для свинца — 0,01 мг/л.

Реактивы и растворы

1. Хлороформ, ГОСТ 20015—74.
2. Диэтилдитиокарбаминат натрия, 1%-ный водный раствор.
3. Толуол, ГОСТ 5789—78.
4. Бензол, ГОСТ 5955—68.
5. Буферный раствор: 35 г хлористого аммония растворяют в 285 мл 25%-ного аммиака.
6. Аммиак, 25%-ный раствор, ГОСТ 3760—75.
7. Натрий сернокислый безводный, ГОСТ 4166—76.
8. Дитизон в хлороформе, 0,002—0,005%-ный раствор.
9. Стандартные хроматографические пластины "Silufol", лучше без добавки.
10. Делительные воронки, 500—1000 мл.
11. Прибор для отгонки растворителя.
12. Камера для хроматографирования.
13. Пульверизатор.
14. Камера с аммиаком.
15. Микропипетки для нанесения проб.
16. Стандартные растворы цинка и свинца.

0,1 г чистого металлического цинка растворяют в пробирке в 2 мл HCl (1:1), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Количество цинка — 1000 мкг/мл.

0,160 г нитрата свинца $Pb(NO_3)_2$, высушенного до постоянного веса при температуре 100—105°С, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл дистиллированной водой, подкисленной 0,5 мл азотной кислоты (1:5). Количество свинца — 1000 мкг/мл.

3.4.3. Ход определения

В делительные воронки отбирают 500 мл пробы. С помощью буфера доводят до pH 8,5—9. К пробе добавляют 0,5—1 мл 1%-ного раствора диэтилдитиокарбамината натрия. Затем экстрагируют хлороформом 3 раза по 25—30 мл в течение 3 — 5 мин. Объединенные экстракты пропускают через безводный сульфат натрия и упаривают до объема 0,2—0,3 мл. Хлороформом пробу количественно переносят в мерную пробирку на 5—10 мл и доводят упариванием общий объем до 0,4 мл.

На хроматографическую платину в одну точку наносят 0,1 мл, в другую — 0,3 мл хлороформенного экстракта. Рядом с пробой наносят хлороформенные экстракты стандартных растворов, упаренные до 0,2 мл. Таких точек делают 3—4 с различным содержанием ионов цинка и свинца.

Хроматографирование проводят в камере, заполненной смесью растворителей: толуол или бензол и хлороформ в соотношении 2:1. Пластину сушат 5—7 мин в сушильном шкафу при температуре 100—120°С.

Детектирование веществ на пластине проводят раствором дитизона в хлороформе. Ионы цинка проявляются в виде розовых пятен R_f=0,7± 0,06. Пластину помещают в камеру с аммиаком. Ионы свинца проявляются в виде розово-малиновых пятен на светлом фоне с R_f=0,55± 0,05.

Количество ионов цинка и свинца можно определить и по калибровочному графику, построенному для данной серии пластин на стандартных растворах в зависимости площади пятна от концентрации.

Расчет содержания свинца и цинка в пробах проводят по формуле:

$$C=\frac{A\cdot 1000}{B}\ \text{мг/л},$$

где A — количество свинца или цинка, обнаруженное на пластине;
B — объем пробы, взятой для анализа.

4. Микробиологические исследования

4.1. Отбор проб

Пробы продукции отбирают ежесменно, через 2 ч после начала смены. Из рулона на накате вырезают 4—5 слоев бумаги или картона массой не менее 100 г, заворачивают в лист той же продукции и доставляют в лабораторию для анализа. Отбор проб, доставка и дальнейшая их обработка должны проводиться с соблюдением правил стерильности, исключающих вторичную бактериальную контаминацию продукта: пробу снабжают этикеткой, в которой указывают: номер образца; наименование продукции; номер партии; день и час отбора образца; должность и фамилию лица, проводившего отбор; номер стандарта или технических условий, по которым изготовлена продукция; наименование микробиологических анализов, которые необходимо провести в отобранной пробе.

4.2. Определение общего микробного числа

4.2.1. Сущность метода

Метод основан на количественном подсчете бактериальных колоний, вырастающих при посеве исследуемых проб на плотных питательных средах определенного состава.

4.2.2. Аппаратура, материалы, реактивы

1. Автоклав вертикальный, ГОСТ 9586—75.
2. Анализатор потенциометрический, диапазон измерения pH от 7,0 до 8,0 с погрешностью не более ±0,05, ГОСТ 19881—74; или потенциометр универсальный pH-340.
3. Аппарат универсальный типа АВУ-6С для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках.
4. Аппарат для измельчения тканей.
5. Баня водная с обогревом.
6. Весы лабораторные 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104—80.
7. Лупа измерительная, ГОСТ 8309—75.
8. Микроскоп биологический, ГОСТ 8284—78.
9. Стерилизатор СС-200 М, ТУ 64-1-2498—75.
10. Термостат с водяной рубашкой электрический ЗЦ-1125М, ТУ 64-1-1868—75 или ТС-80, ТУ 64-1-1382—72.
11. Прибор для счета колоний бактерий ПСБ по ТУ 64-1-2401—72.
12. Холодильник электрический бытовой, ГОСТ 16317—76.
13. Карандаш по стеклу.
14. Колбы конические вместимостью 40, 200, 400, 1000, 1600 мл, ГОСТ 19908—80.
15. Ножи.

16. Ножницы.
17. Посуда мерная лабораторная, стеклянная ГОСТ 1770—74.
18. Пипетки 1-го класса точности вместимостью 1, 2, 10 мл, ГОСТ 20292—74, или 2-го класса точности, ГОСТ 1770-74.
19. Пробирки вместимостью 20 мл, ГОСТ 19908—80.
20. Спиртовки лабораторные стеклянные, ГОСТ 10090—74.
21. Стаканчики для взвешивания (бюксы), ГОСТ 7148—70.
22. Стаканы типа ВН-100 вместимостью 100 мл, ГОСТ 19908—80.
23. Ступки фарфоровые, ГОСТ 9147—73.
24. Цилиндры вместимостью 100, 500 мл, ГОСТ 1770—74.
25. Петля микробиологическая.
26. Чашки биологические (Петри), ГОСТ 10973—75.
27. Бумага индикаторная, ТУ 6-09-1181—76.
28. Вата, ГОСТ 5556—81.
29. Марля, ГОСТ 9412—77.
30. Штативы для пробирок.
31. Агар микробиологический, ГОСТ 17206—71.
32. Агар питательный сухой, ТУ 42-14-33—75.
33. Среда питательная сухая для определения ОМЧ.
34. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709—72.
35. Вода питьевая, ГОСТ 2874—82.
36. Гидролизат казеина панкреатический, ТУ 42-14-4—74.
37. Д-глюкоза, ч., ГОСТ 6038—79.
38. Калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч. или ч.д.а.., ГОСТ 4198—75.
39. Кислота соляная, ч.д.а., ГОСТ 3118—77, плотн. 1,190 г/см^3, 1 н раствор.
40. Масло иммерсионное для микроскопии, ГОСТ 13739—78.
41. Натрия гидроокись, х.ч., ч.д.а.,ГОСТ 4328—77, 1 н раствор.
42. Стекла предметные, ГОСТ 9284—75.
43. Спирт этиловый, ректификованный технический, ГОСТ 5962—67.
44. Спирт этиловый, ректификованный технический, ГОСТ 18300—72.
45. Экстракт кормовых дрожжей, ТУ 42-14-56—76.

4.2.3. Приготовление концентрированного и разбавленного фосфатных буферных растворов для разведений осуществляют в соответствии с прописями, приведенными ниже (пп. 5.1.1, 5.1.2.).

4.2.4. Проведение анализа

Приготовление разведения для посева.

Для приготовления первого разведения (1:10) асептически делают навески из среднего слоя образца в количестве 10± 0,1 г. После измерения площади бумаги или картона навеска нарезается мелкими лентами и помещается в колбу вместимостью 200 мл. К каждой навеске добавляют 90 мл стерильного разбавленного фосфатного буфера и перемешивают на аппарате для встряхивания жидкостей в течение 5± 1 мин.

Из первого разведения взвеси пробы стерильной пипеткой на 1 мл набирают 1 мл и переносят в пробирку, содержащую 9 мл разбавленного фосфатного буфера и перемешивают (1:100).

Последующие разделения в зависимости от предполагаемого обсеменения образца 1:1000, 1:10000 и т.д. готовят аналогично.

По 1 мл каждого разведения высевают на три чашки Петри вглубь питательных сред, рецепт которых приведен ниже (п.5).

После застывания среды чашки Петри переворачивают крышками вниз и помещают в таком виде в термостат. Инкубацию производят в течение 48± 3 ч при 37°С для ускорения развития микроорганизмов.

После инкубации подсчитывают количество колоний в каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением от 4 до 10 раз.

Каждую подсчитанную колонию отмечают на дне чашки чернилами.

Можно производить подсчет колоний с помощью специального прибора.

4.2.5. Подсчет результатов

Для определения числа микроорганизмов в 1 г пробы вычисляют среднее арифметическое из количества колоний, выросших на чашках одного разведения.

Среднюю величину умножают на разведение, получая число микроорганизмов в 1 г образца. Затем результат пересчитывают на 100 см^2 бумаги (картона) с указанием соответствия содержания микроорганизмов микробиологическому нормативу по этому показателю.

Например: среднее число микроорганизмов в 1 г образца равно 50. Площадь образца — 25 см^2, тогда считаем, что образец 100 см^2 будет содержать 50 х 4 = 200 клеток микроорганизмов, т.е. количество микроорганизмов не превышает 300, и бумага соответствует микробиологическому нормативу по этому показателю.

4.3. Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП)

4.3.1. Сущность метода

Для приведения в соответствие показателя "бактерии группы кишечных палочек" с принятой международной номенклатурой (ФАО/ВОЗ и СЭВ) в настоящих методических рекомендациях к БГКП отнесе-

ны грамотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре 37± 1°С в течение 24—48 ч, в основном являющиеся представителями родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter и Serratia.

4.3.2. Аппаратура, материалы и реактивы

Для проведения анализа используют аппаратуру, материалы и реактивы, перечисленные в п. 4.2.2., включая дополнительно следующие материалы и реактивы:
пробирки Уленгута (поплавки);
стаканы высокие с носиком вместимостью 200 мл, ГОСТ 19908—80;
среда Кесслера сухая, ТУ 49365—76 с учетом изменения N 2 от 01.05.85 г.;
бромтимоловый синий, ч.д.а., ТУ 6-09-2086—77;
желчь сухая, ОСТ 49278—75;
кристаллический фиолетовый, ч.д.а., ТУ 6-09-4119—75;
культуры БГКП (контрольные штаммы);
лактоза, ОСТ 4963—73;
магний сернокислый, ГОСТ 4523—77;
натрий хлористый, ГОСТ 4233—77;
натрий-аммоний фосфорнокислый, ГОСТ 4170—78;
натрий лимоннокислый, ГОСТ 22280—76;
натрий сернокислый, ГОСТ 903—76;
среда Эндо сухая, ТУ 49-876—82;
агар с эозинмителеновым синим, сухой (среда Левина), ТУ 42-1495—77;
пептон сухой ферментативный, ГОСТ 13805—76;
фуксин основной, МРТУ 6-09-6436—69.

Подготовку к анализу проводят как указано в п. 4.2.4. Готовят разведение исследуемой пробы 1:10. Для посева используют 5,0 г бумаги (картона).

Образец подготавливают к посеву как указано выше. Затем 50 мл разведения 1:10, содержащего 5,0 г исследуемого образца, вносят в колбу с 45 мл среды Кесслера с двойной концентрацией лактозы. Посевы помещают в термостат при температуре 37± 1°С на 48 ч. При отсутствии роста дается заключение об отсутствии БГКП в засеваемой массе продукта. При наличии признаков роста — газообразования, помутнения, изменения цвета среды — на среде Касслера с лактозой, для окончательного заключения о присутствии в продукции БГКП из подозрительных колб и пробирок производят высев на чашки со средой Эндо или Левина, которые готовятся согласно прописям на этикетках банок. Посев производят петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37± 1°С на 18—24 ч. Учет результатов посева производят в соответствии с п. 4.3.3.

4.3.3. Учет результатов

При отсутствии на среде Эндо или Левина колоний, типичных для БГКП (на среде Эндо — красных с металлическим блеском или без него, розовых и бледно-розовых; на среде Левина — черных с металлическим блеском, темных с черным центром, коричневых с темным центром), засеянная навеска считается незагрязненной ими, т.е. исследуемый образец соответствует нормативу на БГКП.

При наличии на среде Эндо или Левина типичных для кишечных палочек колоний их продолжают изучать. Из изолированных колоний, характерных или подозрительных на БГКП, делают препараты, окрашивая их по Граму, и микроскопируют.

У грамотрицательных палочек проверяют оксидазную активность. Постановка оксидазного теста осуществляется следующим образом: петлей снимают колонии грамотрицательных палочек со среды Эндо или Левина и наносят на фильтровальную бумагу, смоченную специальным реактивом (пропись приготовления которого дана ниже в разделе "Специальные питательные среды и реактивы", п. 5.2.2.6.).

В месте нанесения бактериальной массы цвет бумаги не изменяется, если оксидазный тест отрицательный, и — синеет в течение 1 мин, если бактерии имеют активную оксидазу.

При наличии на поверхности сред Эндо или Левина колоний, состоящих из грамотрицательных палочек с отрицательной оксидазной активностью, их подсчитывают и причисляют к бактериям группы кишечных палочек после подтверждения ферментации глюкозы. Для этого засевают 2—3 колонии каждого типа в пробирки со средой Гисса с глюкозой (по 2—3 мл среды в пробирке) и инкубируют в течение 24 ч при температуре 37°С. Если за это время в среде происходит образование кислоты и газа, то это подтверждает наличие бактерий группы кишечных палочек в исследуемом образце. Признаком газообразования является появление пузырька газа в стеклянном поплавке; об образовании кислоты свидетельствует пожелтение среды. При отсутствии газообразования и пожелтения среды получают окончательный отрицательный результат, при наличии — положительный.

4.4. Определение сальмонелл в 10 г бумаги (картона)

4.4.1. Сущность метода

Сущность определения заключается в использовании методов накопления патогенных энтеробактерий в средах обогащения с последующим пересевом на плотные селективные и дифференциальные среды с последующим проведением серологической идентификации.

При проведении анализов используют аппаратуру, материалы и реактивы, перечисленные выше, включая дополнительно следующие материалы и реактивы:
бутыли стеклянные, ГОСТ 5717—81;
кастрюли эмалированные, ГОСТ 24788—81;
целлофан (пленка полиэтиленцеллофановая), ОСТ 6-06-114—79;

дрожжи хлебные прессованные, ГОСТ 171—81;
висмут-сульфитный агар, ТУ 42.14127—78;
железо сернокислое, ч.д.а., ГОСТ 9485—60;
Д-лактоза, 1-водная, ч., ТУ 6-09-2293—79;
магний хлористый, 6-водный, ч., х.ч., ч.д.а., ГОСТ 4209—77;
мел химический осажденный, ГОСТ 6253-72;
мочевина, ч., ГОСТ 6691—77;
натрий хлористый, ч., х.ч., ч.д.а., ГОСТ 4233—77;
натрий сернова тистокислый, ч.д.а., СТ СЭВ 223—75;
сахароза, ч.д.а., ГОСТ 5833—75;
среда Плоскирева, МРТУ 42-154—67;
соль Мора, ч., ГОСТ 4208—72;
среда Клиглера;
сыворотка сальмонеллезная О-агглютинирующая адсорбированная, ГОСТ 16449—78;
феноловый красный, ТУ 6-09-4530—77;
хлороформ технический, ГОСТ 20015—74;
культуры бактерий рода сальмонелла (контрольные штаммы).

4.4.3. Проведение анализа

В стерильных условиях в стакане вместимостью 50 мл взвешивают 10,0± 0,1 г бумаги (картона) и затем мелко нарезанную навеску асептически переносят в колбу вместимостью 200 мл, содержащую 90 мл разбавленного фосфатного буфера (п. 5.1.2.).

При этом соотношение массы образца и буфера соблюдается 1:10. Проверяют pH с помощью индикаторной бумаги и доводят pH смеси до 6,8—7,2 1 н раствором гидроокиси натрия. Все содержимое тщательно перемешивают или встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 3—5 мин. Переносят по 1 мл полученной пробы в пробирки с двумя средами накопления (10 мл). В качестве сред накопления рекомендуется магниевая среда и среда Мюллера. Пробы инкубируют при 37°С в течение 24 ч.

После инкубации в термостате производят высев из пробирок с магниевой средой и средой Мюллера на поверхность хорошо подсушенных чашек с дифференциально-диагностическими средами Плоскирева и висмут-сульфитного агара.

Для получения отдельных колоний петлей берут минимальное количество посевного материала и производят посев штрихом.

Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37± 1°С на 24—48 ч. Проверку посевов осуществляют дважды: через 24± 1 ч и 48± 3 ч после выдерживания в термостате.

4.4.4. Обработка результатов

На среде Плоскирева колонии сальмонелл бесцветные, плотные, на висмут-сульфитном агаре — черные, с характерным металлическим блеском, при этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией.

При отсутствии типичных колоний сальмонелл на каждой из сред конечный результат анализа записывают как отрицательный, т.е. в исследуемой массе пробы сальмонеллы отсутствуют.

При наличии на любой из питательных сред на чашках Петри типичных или подозрительных колоний на сальмонеллы производят их дальнейшее изучение.

Из каждой среды на чашке Петри, содержащей подозреваемую колонию сальмонелл, выбирают изолированную колонию и высевают штрихом и уколом на трехсахарный агар с мочевиной или среду Клиглера для накопления чистой культуры и изучения ферментативных свойств. Пробирки с посевами выдерживают в термостате при 37± 1°С в течение 24 ч.

Окончательное определение биохимических и серологических свойств био- и сероваров проводят по действующим инструкциям, указаниям и ГОСТам, утвержденным МЗ СССР (п.7.).

При выделении культур грамотрицательных палочек, ферментирующих глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующих лактозу и сахарозу, образующих или не образующих сероводород и обладающих четкой серологической характеристикой, считают, что в исследуемой навеске пробы присутствуют бактерии рода сальмонелла.

Бумага (картон) в качестве тароупаковочного материала сухих пищевых продуктов к реализации не допускается. В этом случае должна быть проведена тщательная санитарная обработка технологической линии производства картонно-бумажной продукции.

5. Питательные среды и реактивы

5.1. Питательные среды и реактивы общего назначения

5.1.1. Концентрированный фосфатный буферный раствор

Взвешивают 34,0± 0,1 г однозамещенного фосфорнокислого калия и растворяют в 500 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл. Устанавливают pH раствора до 7,2± 0,1 1н раствором гидроокиси натрия и доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Хранят раствор в емкости, укупоренной резиновой пробкой в холодильнике.

5.1.2. Разбавленный фосфатный буферный раствор с pH 7,0—7,2

По тексту данный раствор именуется "разбавленный фосфатный буфер".

Пипеткой вместимостью 2,0 мл вносят 1,25 мл концентрированного фосфатного буферного раствора в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем дистиллированной водой до метки.

Разливают разбавленный фосфатный буфер по 10,0 мл в пробирки, по 100,0 мл в колбы вместимостью 200 мл и закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121± 2°С в течение 18± 3 мин.

5.1.3. Приготовление физиологического раствора натрия хлорида, реактивов для окраски по Граму, мясо-пептонного агара (МПА) производят согласно ГОСТ 9225—84

5.1.4. 1 н раствор гидроокиси натрия

Взвешивают 40,0± 0,1 г едкого натра в стакане вместимостью 100 мл и переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводят объем до метки и получают раствор с массовой концентрацией 40 г/дм^3 (1 н раствор NaOH).

При необходимости раствор стерилизуют автоклавированием при 121± 2°С в течение 18± 3 мин.

5.1.5. 1 н раствор соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл наливают до половины дистиллированную воду, потом осторожно вносят 30,6 мл концентрированной соляной соляной кислоты плотностью 1,19 г/см^3. Доводят объем до метки водой и получают раствор с массовой концентрацией 36,5 г/дм^3 1 н раствор HCl. При необходимости раствор стерилизуют автоклавированием при температуре 121± 2°С в течение 18± 3 мин.

5.2. Специальные питательные среды и реактивы

5.2.1. Среда для определения общего количества микроорганизмов

Сухой питательный агар производства ДагНИИ питательных сред	35 г
Экстракт кормовых дрожжей производства МНИИВС им. Мечникова	2,5 г
Глюкоза	1,0 г
Вода дистиллированная	1000 мл
pH	7,0

Стерилизация в автоклаве при 121± 2°С в течение 21± 3 мин.

5.2.2. Среды и реактивы для выделения бактерий группы кишечных палочек

5.2.2.1. Среда Кесслера с лактозой (с двойной концентрацией ингредиентов)

К 1000 мл водопроводной воды добавляют 20,0± 0,1 г пептона и 100 мл желчи крупного рогатого скота. Смесь кипятят на водяной бане при перемешивании 20—30 мин. Затем фильтруют ее через ватномарлевый фильтр, добавляют 5,0 г лактозы, доводят объем водой до 1000 мл. Устанавливают pH 7,4—7,6, используя 1 н раствор NaOH или HCl.

Добавляют 8 мл 1%-ного водного раствора генцианового фиолетового, разливают в колбы по 45 мл и в пробирки по 10 мл, закладывают поплавки (пробирки Уленгута) отверстием вниз. Стерилизуют при температуре 121± 2°С в течение 15 мин.

5.2.2.2. 1%-ный водный раствор генцианового фиолетового

Взвешивают 1,0± 0,01 г генцианового фиолетового (кристаллического), помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре 4± 1°С в течение 7 сут.

5.2.2.3. Среда Кесслера с лактозой из сухих питательных сред

Среда готовится согласно прописи на этикетке банки (для получения двойной концентрации ингредиентов, количество воды уменьшается вдвое).

5.2.2.4. 0,1%-ный водный раствор бриллиантового зеленого

Взвешивают 0,10± 0,01 г бриллиантового зеленого, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре 4± 1°С в течение 7 сут. в колбе, укупоренной резиновой пробкой.

5.2.2.5. Среды Эндо, с эозинметиленовым синим, (Левина) из сухих питательных сред

Среды Эндо и Левина производства ДагНИИ питательных сред готовят согласно прописям на этикетках банок. Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить при температуре 4± 1°С до 10 сут.

5.2.2.6. Реактив для определения оксидазной активности

30—40 мг γ-нафтола растворяют в 2,5 мл ректификованного этилового спирта, прибавляют 7,5 мл дистиллированной воды и растворяют 40—60 мг диметилфенилендиамина. Раствор готовят непосредственно перед определением.

5.2.2.7. Среда Гисса с глюкозой

К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0,5 г NaCl (поваренной соли). Пептон и соль растворяют при нагревании воды в течение нескольких минут, фильтруют через бумажный фильтр так, чтобы раствор был совершенно прозрачным, добавляют 0,5 г глюкозы и 0,1 мл 1,6%-ного раствора индикатора бромтимолблау.

Готовую среду разливают по 3 мл в пробирки, простерилизованные вместе с поплавками, расположенными запаянным концом кверху. Среду стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин или 20 мин при 112°С. Во время стерилизации поплавки заполняются питательной средой.

5.2.2.8. Индикатор бромтимоловый синий

Бромтимолблау 0,4 г растворяют в 40 мл дистиллированной воды, доводят до кипения. После этого к раствору прибавляют 6,4 мл нормального раствора едкого натра, в результате чего жидкость приобретает зеленоватый цвет и доливают дистиллированной водой.

Приготовленный таким образом индикатор может сохраняться в теплом месте во флаконе с притертой пробкой длительное время.

5.2.3. Среды и реактивы для выделения бактерий рода сальмонелла

5.2.3.1. Магниевая среда

Среда готовится из трех растворов:

I раствор	
Пептон	8,4 г
Хлористый натрий (NaCl)	14,3 г
Дрожжевой автолизат	40,0 мл
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,85 г
Вода дистиллированная	890,0 мл
II раствор	
Магний хлористый ($MgCl_2.6\ H_2O$)	71,4 г
Вода дистиллированная	90,0 мл
III раствор	
0,5%-ный водный раствор бриллиантового зеленого	1,8 мл

После приготовления всех ингредиентов растворы соединяют, разливают приготовленную таким образом среду в пробирки по 10 мл. Среду стерилизуют при температуре 121± 1°С в течение 30 мин.

5.2.3.2. Среда Мюллера

К 90 мл стерильного мясо-пептонного бульона добавляют:

а) 4,5 г мела, предварительно простерилизованного во флаконе сухим паром (при 160°С в течение 2 ч);

б) 10 мл раствора гипосульфита натрия (50 г чистого кристаллического гипосульфита натрия в 100 мл дистиллированной воды стерилизуют текучим паром в течение 30 мин);

в) 2 мл раствора Люголя (металлического йода 25 г, йодистого калия 20 г, дистиллированной воды 100 мл).

После добавления всех ингредиентов смесь взбалтывают и разливают в пробирки по 10—15 мл.

5.2.3.3. Среды Плоскирева и висмут-сульфитный агар

Среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар (ВСА) выпускаются в сухом виде ДагНИИ питательных сред; их следует готовить согласно прописям, указанным на этикетках банок. Изготовленные и разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить в холодильнике до 10 сут.

5.2.3.4. Трехсахарный агар с мочевиной

Трехсахарный агар с мочевиной готовят смешением следующих ингредиентов:

Дистиллированная вода	100 мл
Сухой питательный агар	2,5 г
Лактоза	1,0 г
Сахароза	1,0 г
Глюкоза	0,1 г
Мочевина	1,0 г
Железо сернокислое ($FeSO_4\ .\ 7\ H_2O$)	0,02 г
Гипосульфит натрия ($Na_2S_2O_3.5\ H_2O$)	0,03 г

0,04%-ный водный раствор фенолового красного 0,04 мл

Тщательно перемешивают и устанавливают pH 7,2—7,4. Разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют текучим паром по 20 мин три дня подряд. После стерилизации среду скашивают. Готовая среда имеет бледно-розовый цвет.

5.2.3.5. Среда Клиглера из сухих питательных сред

Среда готовится и стерилизуется согласно прописи на этикетке. Готовую среду скашивают в пробирках так, чтобы остался небольшой столбик (не менее 3 см высотой).

6. Оценка полученных данных

6.1. При гигиенической оценке бумаги и картона, изготовленных с использованием макулатуры, учитывают весь комплекс проведенных исследований: органолептических, санитарно-химических и микробиологических.

6.2. Положительную гигиеническую оценку бумага и картон на основе макулатуры, предназначенные для упаковки сухих пищевых продуктов, получают:

по органолептическому показателю:

поверхность ровная, гладкая или шероховатая;

цвет белый, светло-серый или светло-желтый;

интенсивность запаха (вытяжек) не более 1 балла;

по микробиологическому показателю:

общее микробное число на 100 $см^2$ поверхности не более 300 микробных клеток;

бактерии группы кишечной палочки — отсутствие в 5 г;

сальмонеллы — отсутствие в 10 г;

по санитарно-химическому показателю:

уровень миграции (ДКМ) ионов цинка не выше 0,1 мг/л;

выделение ионов хрома и свинца не допускается.

gost.e-ecolog.ru