

СОВЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ВЗАИМОПОМОЩИ

СТАНДАРТ СЭВ
СТ СЭВ 2432–80

ОБОЛОЧКА БЕЛКОВАЯ ИСКУССТВЕННАЯ ДЛЯ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Цена 5 коп.

1981

gost.e-ecolog.ru

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 30 декабря 1980 г. № 6069 стандарт Совета Экономической Взаимопомощи СТ СЭВ 2432—80 «Оболочка белковая искусственная для колбасных изделий. Методы микробиологических испытаний» введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта СССР.

в народном хозяйстве СССР

с 01.01. 1982 г.

в договорно-правовых отношениях по сотрудничеству

с 01.01. 1981 г.

УДК 637.523.68.001.4

Настоящий стандарт СЭВ является обязательным в рамках Конвенции о применении стандартов СЭВ

СОВЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ВЗАИМОПОМОЩИ	СТАНДАРТ СЭВ	СТ СЭВ 2432—80
	ОБОЛОЧКА БЕЛКОВАЯ ИСКУССТВЕННАЯ ДЛЯ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ Методы микробиологических испытаний	Группа Н19

1. ПРОБЫ

1.1. Для микробиологического испытания искусственной белковой оболочки от каждого комплекта белковой оболочки произвольно отбирают по 3 m от партии в рулонах или по 5 отрезков — от партии в отрезках. Пробы отбирают стерильными инструментами. Отобранные пробы упаковывают в стерильные пакеты из фольги, на которых должно быть указано: «Проба для микробиологического анализа».

Для проведения микробиологических испытаний применяется вытяжка (суспензия), подготовленная двумя методами обработки проб, а именно: методом встряхивания и методом смыва.

1.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Для приготовления вытяжки (суспензии) применяют в стерильном виде:

1) колбы конические вместимостью 100—150 cm^3;
2) раствор Баттерфильда или физиологический раствор;
3) пробирки с притертыми пробками (или металлическими пробками);
4) шаблон с прямоугольным вырезом площадью 10 cm^2;
5) тампоны;
6) бусинки стеклянные.

1.3. Приготовление вытяжки методом встряхивания

1 g измельченной пробы взвешивают в колбе со стеклянными бусинками, приливают 10 cm^3 физиологического раствора или раствора Баттерфильда, закрывают пробкой и настаивают в течение 10 min, периодически встряхивая, затем интенсивно встряхивают в течение 1 min и дают отстояться. После отстаивания полученную вытяжку используют для дальнейших исследований.

Утвержден Постоянной Комиссией по стандартизации
Бухарест, июнь 1980 г.

1.4. Приготовление суспензии методом смыва

Отмеренные шаблоном внутреннюю и внешнюю площади образца белковой оболочки (10 $см^2$) вертикальным движением смывают тампоном, смоченным в 0,5 $см^3$ раствора Баттерфильда или физиологического раствора. Деревянную шпильку с тампоном отламывают и помещают в пробирку с 10 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Энергично встряхивают в течение 2 min пробирку с тампоном до его разволокнения, вследствие чего микробы попадают в образующуюся суспензию. Полученную суспензию применяют для дальнейших исследований.

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА МЕЗОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1. Сущность метода

Метод основан на росте самого большого количества видов мезофильных микроорганизмов в плотной питательной среде, которая по своему составу способствует созданию оптимальных условий для их роста. По общему количеству мезофильных микроорганизмов можно судить о степени микробиальной зараженности используемого сырья, соблюдении установленной технологии и гигиены производства искусственной белковой оболочки.

2.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения испытания применяют в стерильном виде:

1) мясопептонный агар;
2) чашки Петри;
3) пипетки вместимостью 1 и 2 $см^3$;
4) термостат с регулированием температуры.

2.3. Проведение испытания

2 $см^3$ разбавляемой вытяжки, приготовленной в соответствии с п. 1.3, или 1 $см^3$ суспензии, приготовленной в соответствии с п. 1.4, переносят в пустые стерильные чашки Петри, заливают мясопептонным агаром, охлажденным до температуры 45°С±5°С, перемешивают содержимое чашки с вытяжкой или суспензией и оставляют застынуть. Чашки Петри с посевом агара помещают в термостат крышкой вниз и инкубируют при температуре 30°С±0,5°С в течение 72 h. Наблюдения за появлением колоний микробов проводят ежедневно. Количественную оценку колоний проводят спустя 72 h после инкубации чашек. В случае активного роста колоний микробов подсчет проводят раньше, т. е. через 48 h или через 24 h после инкубации.

2.4. Оценка результатов

Этим методом не определяется количество живых микробов, а только количество их естественных скоплений или скоплений, обусловленных недостаточной гомогенизацией пробы.

Для подсчета колоний микробов применяют чашки с средой, на которой выросло не менее 30 и не более 300 колоний и преимущественно среды, инокулированные самым большим количеством исследованной пробы.

Установленное среднее количество колоний в чашках пересчитывается в соответствии с использованным разбавлением и объемом посева на 1 $см^2$ поверхности белковой оболочки.

Разница в результатах исследования одной и той же пробы в одной и той же лаборатории не должна превышать 50 %.

3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КОЛИФОРМНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

3.1. Сущность метода

Метод основан на расщеплении колиформными микроорганизмами лактозы при определенной температуре и образовании на дифференциально-диагностической среде Эндо красно окрашенных морфологических типичных колоний. Колонии колиформных микробов проявляют отрицательную реакцию на цитохромоксидазу и при помощи цитохромоксидазного теста можно их отличить от других видов микробов. По количеству колиобразных микробов можно судить о степени загрязнения искусственной белковой оболочки микробами, которые считаются индикатором фекального загрязнения, а также о соблюдении установленной технологии и гигиены производства искусственной белковой оболочки.

3.2. Аппаратура, материалы, реактивы и растворы

Аппаратура, материалы, реактивы и растворы — по п. 2.2 со следующими дополнениями:

1) агар Эндо:
   - отвар говяжьего мяса;
   - вода дистиллированная;
   - пептон для микробиологических целей;
   - агар;
   - натрий сернокислый безводный;
   - стерильный водный раствор лактозы;
   - раствор основного фуксина 10%-ный в этиловом спирте.

Смешивают 350 cm^3 отвара говяжьего мяса с 650 cm^3 дистиллированной воды, прибавляют хлористый натрий и 10 g пептона и растворяют в горячем состоянии. Прибавляют 20 g промытого агара и разваривают текучим паром (потоком пара). Значение pH доводят 20%-ным раствором гидроокиси натрия до 6,9 (чтобы готовая среда имела окончательное значение pH 7). Снова кипятят 30 min и фильтруют через вату. Стерилизуют 30 min в автоклаве при 0,15 MPa.

После тщательного перемешивания полученной основной агаровой среды (1000 cm^3) и растворения реактивов (натрий сернокислый безводный — 1,2 g; стерильный водный раствор лактозы 20%-ный — 50 cm^3; раствор основного фуксина 10%-ный в этиловом спирте — 1,7 cm^3) среду стерилизуют 15 min текучим паром;

2) согнутые стеклянные палочки;

3) раствор нафтола в этиловом спирте (CH_3CH_2OH), готовят следующим образом: растворяют 1 g нафтола в 100 cm^3 96%-ного этилового спирта;

4) водный раствор Т-32 (этилоксиэтилпарафенилэндиамина) готовят следующим образом: растворяют 1 g этилоксиэтилпарафенилэндиамина в 100 cm^3 дистиллированной воды;

5) натрия гидроокиси (NaOH) раствор, готовят следующим образом: растворяют 200 g гидроокиси натрия (NaOH) в 800 cm^3 дистиллированной воды и доводят водой до объема 1000 cm^3;

6) вода дистиллированная.

3.3. Проведение испытания

В чашки Петри заливают агар Эндо и охлаждают. На поверхность застывшего подсушенного агара пипеткой наносят 0,2 cm^3 вытяжки, подготовленной в соответствии с п. 1.3, или суспензии, подготовленной в соответствии с п. 1.4, и растирают их согнутой стеклянной палочкой по всей поверхности чашки.

Чашки помещают в термостат для подсыхания и инкубации при 37°C в течение 24 h. Выросшие колонии после 24 h инкубации анализируют по цитохромоксидазному тесту.

Непосредственно перед использованием раствора нафтола и этилового спирта смешивают в соотношении 1 : 1 с водным раствором Т-32. Выросшие на агаре Эндо колонии микробов заливают подготовленным раствором. Ровно через 3 min устанавливают цвет колоний: колонии, дающие положительную реакцию на цитохромоксидазу, имеют синий цвет, а отрицательную — остаются красными. Колиформные микробы реагируют отрицательно на цитохромоксидазу. Через 3 min

происходит посинение всех колоний и поэтому обработку цитохромоксидазного теста необходимо произвести в установленном промежутке времени.

3.4. Оценка результатов

Установленное количество красно окрашенных колоний на агаре Эндо пересчитывается на 1 g массы пробы умножением на 5 (инокулировано 0,2 g пробы) и умножением применяемого фактора разбавления соответственно степени использованного разбавления. Результирующее значение выражает количество колиформных микробов в 1 g искусственной белковой оболочки.

Разница в результатах исследования одной и той же пробы и в одной и той же лаборатории не должна превышать 40%.

Все энтеробактерии, расщепляющие лактозу, обозначаются как колиформные бактерии, однако только «Escherichia colin» являются микроорганизмами фекального происхождения. Поэтому количество колиформных микробов является лишь приблизительным показателем фекального загрязнения.

4. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ПЛЕСЕНЕЙ

4.1. Сущность метода

Метод основан на принципе надежного роста плесеней на питательных средах, значение pH которых не превышает 5,0; (pH=5,0 ингибирует рост большинства других видов микробов).

4.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения испытания применяют в стерильном виде:

1) агар сусловый;
2) агар Сабурауда:
   — пептон;
   — глюкоза;
   — агар;
   — вода дистиллированная.

В 100 cm^3 дистиллированной воды с температурой 20—30°C растворяют 10 g пептона с 30 g глюкозы. Доводят остальным количеством воды до объема 1000 cm^3. Прибавляют 20—30 g промытого агара и разваривают текучим паром. Значение pH среды доводят до 5,0 с помощью лимонной кислоты. Среду разливают в требуемых количествах в колбу или флаконы и стерилизуют фракционно текучим паром в течение 3 дней по 30 min ежедневно;

3) чашки Петри;
4) пипетки;

5) палочки согнутые стеклянные;
6) воду дистиллированную;
7) глюкозу;
8) кислоту лимонную.

4.3. Проведение испытания

Испытание производится в стерильных условиях. На поверхность застывшего агара Сусло или агара Сабураудо наносят 0,2 cm^3 вытяжки, подготовленной в соответствии с п. 1.3, или суспензии, подготовленной в соответствии с п. 1.4, и растирают согнутой стеклянной палочкой. Культивирование можно произвести, залив суспензию пробы селективной питательной средой. При этом процессе можно использовать 0,5 cm^3 суспензии пробы. Инкубацию проводят в термостате при 25°С в течение 7 суток. Рост колоний контролируют уже после 48 h инкубации. Подсчет колоний начинают через 48 h ежедневно.

4.4. Оценка результатов

По количеству колоний, установленному на параллельно посевных средах, высчитывают среднюю арифметическую величину и пересчитывают на 1 g массы или 1 cm^2 поверхности искусственной белковой оболочки, соответственно степени разбавления и количеству, использованному для посева на среду. При каждом исследовании следует указать род среды и продолжительность инкубирования.

При существенном расхождении результатов параллельных анализов у того же образца (превышающих 50%) следует исследование повторить.

5. ВЫЯВЛЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ МЕТОДОМ РАЗМНОЖЕНИЯ

5.1. Сущность метода

Учитывая редкость наличия и весьма ограниченное количество сальмонелл в искусственной белковой оболочке, данный метод основан на необходимости размножения сальмонелл путем культивации исследуемой пробы в неселективной жидкой среде и их выделении посредством переноса культуры на плотную селективную среду. Последующей проверкой изучают характер выявленных колоний при помощи биохимических и серологических тестов, имея в виду характерные морфологические, биохимические и серологические признаки сальмонелл.

5.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения испытания применяют в стерильном виде:

1) раствор тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_5 \cdot 5H_2O$): 50 g тиосульфата натрия растворяют в 100 cm^3 дистиллирован-

ной воды, разливают в надлежащих количествах в колбы или флаконы и стерилизуют в автоклаве 30 min при 127°С;

2) желчь говяжью.

Свежую говяжью желчь фильтруют через фильтровальную бумагу или вату, разливают в требуемых количествах в колбы или флаконы, стерилизуют текучим паром (поток пара) в течение 48 h по 20 min ежедневно. Вместо жидкой желчи допускается использовать также сухую желчь, которую растворяют в стерильной воде согласно инструкции, прилагаемой к каждому флакону упаковки;

3) раствор бриллиантового зеленого, готовят следующим образом: 0,1 g бриллиантового зеленого растворяют в 100 cm^3 стерильной дистиллированной воды, оставляют стоять на ночь в термостате при 37°С и фильтруют через фильтровальную бумагу;

4) углекислый кальций, стерилизованный сухим жаром;

5) раствор Люголя, готовят следующим образом: 20 g йода двойной возгонки с 25 g йодистого калия тщательно растирают в ступке с 10 cm^3 дистиллированной воды. Раствор переносят в темную реактивную склянку с притертой пробкой, остатки раствора в ступке споласкивают отмеренным количеством дистиллированной воды в ту же склянку и доводят общий объем до 100 cm^3 дистиллированной водой;

6) среду Кауфмана или селенитовую среду, готовят следующим образом: бульон мясо-пептонный и другие вышеуказанные растворы и материалы.

Постепенно смешивают 900 cm^3 мясо-пептонного бульона, 20 cm^3 раствора Люголя, 100 cm^3 раствора тиосульфата, 50 cm^3 желчи говяжей, 11 cm^3 раствора бриллиантового зеленого и 45 g кальция углекислого ($CaCO_3$), стерилизованного сухим жаром. Полученную среду разливают по 8—10 cm^3 в пробирки при постоянном помешивании, так как нерастворимый углекислый кальций осаждается на дне. Среду стерилизуют текучим паром в течение 48 h по 20 min ежедневно;

7) агар Эндо;

8) агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным (агар Христенсена);

9) склянку темную реактивную с притертой пробкой;

10) воду дистиллированную;

11) бумагу фильтровальную или вату;

12) чашки Петри;

13) пипетки;

14) ножницы;

15) пинцеты.

5.3. Проведение испытания

Пробу белковой оболочки массой около 0,5 g разрезают стерильными ножницами на мелкие кусочки (размером не более 10 mm×10 mm), помещают в 10 cm^3 питательной среды Кауфмана и подвергают инкубации при 37°С в течение 24 h. Затем при помощи бактериологической петли из среды накопления делают пересев на агар Эндо (см. п. 3.2) или на агар с бриллиантовым зеленым и феноловым красным цветом. Чашки с инокулированным агаром оставляют в термостате при 37°С в течение 24 h.

Колонии сальмонелл с характерными морфологическими признаками выделяют и исследуют биохимическим и серологическим способами.

Данные колонии микробов пересевают на поверхность предварительно подсушенных чашек с глюкозовым агаром и с кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью так, чтобы колонии после нарастания хорошо выделились. Чашки с глюкозовым агаром, на которое был сделан посев, инкубируют при 37°С в течение 20—24 h. Чистые взрослые колонии пересевают на следующие среды:

— на агар с мочевиной;

— в декарбоксилированную среду с лизином;

— в смесь пептона с физиологическим раствором с добавкой толуола с β-галактозидазового реактива.

В случае наличия сальмонелл поверхность агара с лактозой, сахарозой, глюкозой и с цитратом оксиножелезным имеет красную окраску (лактоза и сахароза не были подвергнуты ферментации). У пробирок с этим агаром, у которых был сделан посев путем укола в среду, обнаруживается наличие сальмонелл газовыми пузырями и образованием трещин с черно-желтым окрашиванием их краев (образование сероводорода). Агар с мочевиной в случае появления сальмонелл имеет отрицательную реакцию, не образующую изменения окраски среды, и у декарбоксилированной среды с лизином имеют положительную реакцию, проявляющуюся пурпурно-красной окраской среды и положительной реакцией с галактозидазовым реактивом, у которого желтая окраска среды.

Культуры, у которых биохимически определены признаки сальмонелл, устанавливается серологически наличие «О», «Vi» и «Н» сальмонелльных антигенов аглютинацией на предметном стекле с применением поливалентного «О» антисера группы А—Е, «Vi» антисера и поливалентного «Н» антисера (специфического и неспецифического).

Культуры с типическими биохимическими признаками сальмонелл, у которых сальмонелльный «О» и «Н» антигена

или только сальмонелльный «О» или «Vi» антиген, можно считать сальмонеллами. Данные культуры посылают в лабораторию особого назначения для уточнения и для серотипизации. Культуры с типическими биохимическими признаками сальмонелл, у которых наличие сальмонелловых антигенов не было обнаружено, подвергают испытанию биохимическими тестами и посылают в лабораторию особого назначения для уточнения.

5.4. Оценка результатов

Если после инокуляции пробы в питательную среду для накопления и пересева на плотную селективную среду не обнаружат появления колоний сальмонелл, записывают результат: «Наличие сальмонелл в 0,5 g пробы исследованной белковой оболочки не было определено».

Если по инокуляции пробы в питательную среду и пересева на одну из плотных селективных сред были обнаружены колонии сальмонелл, записывают результат: «Наличие сальмонелл было определено в 0,5 g пробы исследованной белковой оболочки». В случае произведенной серотипизации приводят обнаруженный серотип.

6. МЕТОД ДОКАЗАТЕЛЬСТВА БАЦИЛЛУС АНТРАЦИС РЕАКЦИЕЙ АСКОЛИ

6.1. Сущность метода

Метод основан на принципе специфической преципитационной реакции полисахаридных преципитиногенов Б. антрацис, экстрагированных в стерильном физиологическом растворе из исследуемой пробы, со специфическим преципитационным сером. Наличие Б. антрацис подтверждено резко ограниченным белым кольцом преципитата, который образуется на плоскости соприкосновения с экстрактом исследуемой пробы.

6.2. Аппаратура, материалы, реактивы

Для проведения испытания применяют в стерильном виде:

1) сыворотку преципитационную для реакции по Асколи;
2) пробирки преципитационные;
3) колбу коническую;
4) воду дистиллированную;
5) раствор физиологический;
6) петли бактериологические;
7) пипетки.

6.3. Проведение испытания

Испытание производится в стерильных условиях. Навеску белковой оболочки массой около 0,5 g разрезают ножницами на кусочки размером не более 10 mm×10 mm, помещают в

коническую колбу с объемом 50 cm^3 физиологического раствора, периодически встряхивают и оставляют в холодильнике на 48 h. Полученную вытяжку фильтруют и, при необходимости, фильтрование повторяют до получения прозрачного фильтрата. Прозрачный фильтрат осторожно переносят в узкие преципитационные пробирки, в которых находится преципитационный серум, оставляя фильтрат стекать по стене наклонной пробирки в количестве, отвечающем количеству серы. Потом приводят пробирку осторожно в вертикальное положение, вкладывают в подставку и оставляют ее при комнатной температуре.

6.4. Оценка результатов

В случае положительной реакции на поверхности соприкосновения серы с вытяжкой образуется сразу же или в течение не более 5 min резко ограниченное белое кольцо преципитата. Если кольцо ограничено недостаточно резко, или если цвет кольца недостаточно выразительный, или если образуется кольцо после 5 min, реакция считается сомнительной. Преципитаты, возникшие за время больше 15 min, не являются специфическими. При отрицательной реакции кольцо преципитата не образуется.

Положительный результат преципитационной реакции указывает на наличие Б. антрацис в исследуемой пробе. В таком случае производится биологический опыт и культивирование на мясо-пептонном кровяном агаре.

7. ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЯ

Протокол испытания должен содержать следующие данные:

1) результаты проведенных испытаний;

2) описание действий, условий или непредвиденных настоящим стандартом СЭВ обстоятельств, которые могли бы иметь влияние на результаты испытаний;

3) обозначение стандарта СЭВ.

Конец

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Автор — делегация ЧССР в Постоянной Комиссии по пищевой промышленности.
2. Тема — 20.500.01в—76.
3. Стандарт СЭВ утвержден на 47-м заседании ПКС.
4. Сроки начала применения стандарта СЭВ:

Страны—члены СЭВ	Срок начала применения стандарта СЭВ в договорно-правовых отношениях по экономическому и научно-техническому сотрудничеству	Срок начала применения стандарта СЭВ в народном хозяйстве
НРБ	Январь 1981 г.	Январь 1982 г.
ВНР	Январь 1983 г.	Январь 1983 г.
ГДР	Январь 1983 г.	Январь 1983 г.
Республика Куба		
МНР		
ПНР		
СРР	Январь 1982 г.	—
СССР	Январь 1981 г.	Январь 1982 г.
ЧССР	Январь 1982 г.	Январь 1982 г.

5. Срок первой проверки — 1985 г., периодичность проверки — 7 лет.

Сдано в наб. 24.12.80 Подп. к печ. 12.02.81 0,75 п. л. 0,71 уч.-изд. л. Тир. 8000 Цена 5 коп.

Орден «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, Новопресненский пер., 3.
Тип. «Московский печатник». Москва, Лялин пер., 6. Зак. 1697

gost.e-ecolog.ru