Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции

Методические указания
МУК 4.2.801—99

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2000

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.204.1
М54

М54 Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000.—35 с.

ISBN 5—7508—0198—5

1. Разработаны: Федеральным центром госсанэпиднадзора Минздрава России (Подунова Л. Г., Кривопалова Н. С., Стрелкова Н. Е.), Научно-производственным центром «Гидробиос» Федерального управления медико-биологических и экстремальных проблем при Минздраве России (Герасимова Г. А., Синилов С. К., Бутова Л. Г., Критская И. В.), Научно-исследовательским институтом медицины труда РАМН (Просветова Н. К., Александрова Л. З., Иванова Л. А., Фролова Я. А.).

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации 27 декабря 1999 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.204.1

ISBN 5—7508—0198—5

© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000

Содержание

1. Общие положения 4
2. Нормативные ссылки 5
3. Методы отбора и подготовки проб для микробиологического анализа 5
3.1. Отбор проб 5
3.2. Подготовка проб к анализу 6
4. Методы анализа 9
4.1. Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий 9
4.2. Определение количества дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов 11
4.3. Выявление и идентификация бактерий сем. Enterobakteriaceae 13
4.4. Выявление и идентификация Pseudomonas aeruginosa 15
4.5. Выявление и идентификация Staphylococcus aureus 16
4.6. Испытание на стерильность 18
5. Микробиологические нормативы для парфюмерно-косметической продукции 20
6. Аппаратура, растворы реактивов, питательные среды 22
6.1. Аппаратура 22
6.2. Питательные среды и реактивы 22
6.3. Материалы 24
6.4. Приготовление растворов реактивов и питательных сред 25
Список литературы 35

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации – Первый заместитель министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
27 декабря 1999 г.
МУК 4.2.801—99
Дата введения – с момента утверждения

4. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции

Методические указания МУК 4.2.801—99

1. Общие положения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для обеспечения контроля качества парфюмерно-косметических изделий по микробиологическим показателям, введенным СанПиН 1.2.631—97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции», и устанавливают методы лабораторных испытаний качества парфюмерно-косметической продукции по микробиологическим показателям безопасности для здоровья человека, проводимых в порядке производственного контроля, государственного санитарно-эпидемиологического надзора и при испытании указанной продукции в целях сертификации соответствия.

Издание официальное

Настоящие методические указания не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Минздрава России.

1.2. Методические указания предназначены для использования в аккредитованных бактериологических производственных, испытательных лабораториях и лабораториях организаций государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и позволяют проводить контроль на соответствие СанПиН 1.2.631—97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции».

1.3. Данный документ разработан в связи с необходимостью унификации и усовершенствования методов микробиологического анализа парфюмерно-косметической продукции.

Методы адаптированы к условиям работы лабораторий, осуществляющих контроль качества и безопасности парфюмерно-косметической продукции.

1.4. Настоящие методические указания должны учитываться при пересмотре действующей и разработке вновь создаваемой нормативной документации на парфюмерно-косметическую продукцию.

2. Нормативные ссылки

2.1. Закон Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.99 № 52-ФЗ.

2.2. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 15.06.94 № 625.

2.3. Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе РФ, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 30.06.98 № 680.

3. Методы отбора и подготовки проб для микробиологического анализа

3.1. Отбор проб

3.1.1. При отборе проб следует руководствоваться требованиями ГОСТ 29188.0—91 «Парфюмерно-косметические изделия. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний» и ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических анализов».

3.1.2. Пробы парфюмерно-косметических изделий для микробиологического анализа отбирают до отбора проб для физико-химических, органолептических и других видов испытаний с соблюдением правил асептики, для того чтобы исключить вторичное микробное загрязнение продукта.

3.1.3. От каждой партии парфюмерно-косметических изделий, подлежащих контролю, следует брать не менее трех единиц изделий в потребительской таре (упаковке), которая не должна иметь следов повреждений.

3.1.4. При испытаниях на стерильность от каждой партии парфюмерно-косметических изделий, независимо от ее объема, отбирают 10 ампул или 10 других единиц упаковки.

3.1.5. Пробу, отобранную от отдельной единицы упаковки, называют разовой. Количество продукта в разовых пробах из каждой единичной упаковки должно быть одинаковым. Разовые пробы соединяют, перемешивают и составляют среднюю пробу.

3.2. Подготовка проб к анализу

3.2.1. Подготовка проб для определения микробиологической чистоты

3.2.1.1. Перед вскрытием упаковки место соединения крышки с тарой обрабатывают 70 %-ным раствором этилового спирта. Первую порцию в количестве примерно 10 % содержимого упаковки отбрасывают, затем отбирают пробы и переносят в стерильную колбу или флакон вместимостью 100—200 $см^3$.

3.2.1.2. Для испытания готовят среднюю пробу не менее 15 г ($см^3$) из упаковок, отобранных по п. 3.1.3, и состоящую из равных разовых проб. Такое же количество упаковок используют и для повторных испытаний. В случае, если масса (объем) парфюмерно-косметического средства в единичной упаковке менее 5 г ($см^3$), содержимое исследуют полностью или используют большее количество упаковок.

3.2.1.3. (5,0 ±0,1) г ($см^3$) или (10,0 ±0,1) г ($см^3$) средней пробы отбирают стерильно и помещают в стеклянные колбы или флаконы, содержащие соответственно (45 ± 1) $см^3$ или (90 ± 1) $см^3$ 1 %-ного раствора твина-80 в физиологическом растворе (п. 6.4.2). Смесь тщательно перемешивают в течение 15—30 мин до полной гомогенизации (либо помещают на аппарат для встряхивания). При необходимости пробы прогревают на водяной бане или в термостате до 40—45 °С, но не более 10 мин. Для гомогенизации продукции, плохо растворимой в воде, используют стеклянные бусы.

Эмульсии типа вода-масло подготавливают аналогичным способом, используя 4 %-ный раствор твина-80 в физиологическом растворе (п. 6.4.2) и предварительно (до встряхивания) прогревая на водяной бане или в термостате до 40—45 °С в течение 20 мин.

Получают смесь, в 10 г ($см^3$) которой содержится 1 г ($см^3$) парфюмерно-косметического средства – первое разведение 1 : 10 (10^{-1}). При необходимости делают последующие десятикратные 1 : 100 (10^{-2}) и 1 : 1000 (10^{-3}) разведения.

3.2.1.4. Полученные разведения используют для посевов. Время с момента окончания подготовки пробы до начала высева не должно превышать 30 мин.

3.2.1.5. Определение собственной антимикробной активности парфюмерно-косметической продукции.

Метод основан на подавлении роста тест-штаммов микроорганизмов под действием испытуемого парфюмерно-косметического средства. В качестве тест-штаммов используют Bacillus subtilis ATCC 6633 (или Bacillus cereus ATCC 10702), Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (или Pseudomonas aeruginosa ГИСК 453), Staphylococcus aureus ATCC 6538-P и культуру Candida albicans ATCC 885-653.

Определение собственной антимикробной активности проводится для парфюмерно-косметических средств, в состав которых входят консерванты и другие вещества, обладающие антимикробным действием.

Собственная антимикробная активность определяется однократно для каждой конкретной рецептуры парфюмерно-косметического средства.

Культуры Bacillus subtilis (Bacillus cereus), Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus выращивают на одной из жидких сред по п. 6.4.11.1 или п. 6.4.11.2 при температуре (37 ± 1) °С в течение (19 ± 1) ч. Культуру Candida albicans выращивают на жидкой среде Сабуро по п. 6.4.8.1 при температуре (30 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч.

Из каждой выросшей культуры готовят взвесь микроорганизмов, добавляя физиологический раствор по п. 6.4.1 в соотношении 1 : 1000.

В пробирки вносят по 1 $см^3$ первого разведения испытуемой пробы парфюмерно-косметического средства по п. 3.2.1.3 и добавляют:

- в пробирку № 1 – 10 $см^3$ буферного раствора по п. 6.4.16 и 1 $см^3$ взвеси Bacillus subtilis (Bacillus cereus);
- в пробирку № 2 – 10 $см^3$ буферного раствора по п. 6.4.16 и 1 $см^3$ взвеси Candida albicans;
- в пробирку № 3 – 10 $см^3$ одной из питательных сред по п. 6.4.9 и 1 $см^3$ взвеси Escherichia coli;

• в пробирку № 4 – 10 см³ одной из питательных сред по п. 6.4.11 и 1 см³ взвеси Pseudomonas aeruginosa;

• в пробирку № 5 – 10 см³ одной из питательных сред по п. 6.4.13 и 1 см³ взвеси Staphylococcus aureus.

Контролем служат пробирки с питательными средами и соответствующими тест-штаммами, в которые вместо испытуемого парфюмерно-косметического средства вносят то же количество стерильной дистиллированной воды.

Посевы инкубируют при (30 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч.

В случае отсутствия роста тест-штаммов микроорганизмов на соответствующих питательных средах отмечают антимикробное действие испытуемого средства.

Для устранения антимикробного действия входящих в состав парфюмерно-косметических средств консервантов или веществ, обладающих антимикробным действием, среднюю пробу в количестве (5,0 ± 0,1) г (см³) или (10,0 ± 0,1) г (см³) отбирают стерильно и помещают в стеклянные колбы или флаконы, содержащие соответственно (45 ± 1) см³ или (90 ± 1) см³ 4 %-ного раствора твина-80 в физиологическом растворе, или увеличивают разведение испытуемой пробы.

Дальнейшие испытания проводят в соответствии с п. 4.

3.2.2. Подготовка проб к анализу на стерильность

Испытание парфюмерно-косметических средств на стерильность проводят методом прямого посева или методом мембранных фильтров.

Метод мембранных фильтров не применим для суспензий или гомогенатов парфюмерно-косметических средств, загрязняющих при фильтрации поры фильтров.

3.2.2.1. Перед вскрытием ампулы с парфюмерно-косметической продукцией обрабатываются этиловым спиртом. Шейка ампулы осторожно прогревается в пламени горелки. На хорошо прогретую шейку ампулы капают 1 каплю стерильного физиологического раствора (п. 6.4.1). Ампулы осторожно вскрывают по месту образовавшейся в стекле трещины.

3.2.2.2. Содержимое 10 ампул или 10 других упаковок объединяют в единую пробу. Из объединенной пробы отбирают стерильно (5,0 ± 0,1) г (см³) или (10,0 ± 0,1) г (см³) парфюмерно-косметического средства.

При испытаниях методом прямого посева отобранные пробы непосредственно засевают в соответствующие питательные среды.

При испытаниях методом мембранных фильтров отобранные пробы помещают в стеклянные колбы или флаконы, содержащие соответственно (45 ± 1) см³ или (90 ± 1) см³ стерильного 1%-ного раствора твина-80 в физиологическом растворе, предварительно пропущенного через мембранный фильтр с размером пор (0,45 ± 0,02) мкм. Пробы тщательно перемешивают в течение 15—20 мин до полной гомогенизации.

При испытании масляных растворов пробы подготавливают аналогичным способом, используя 4 %-ный раствор твина-80 в физиологическом растворе и предварительно (до встряхивания) прогревая на водяной бане или в термостате до 40—45 °С в течение 20 мин.

4. Методы анализа

При микробиологическом контроле парфюмерно-косметической продукции используют стандартизованные методы микробиологического посева. Определяют следующие группы микроорганизмов: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы; дрожжи, дрожжеподобные и плесневые грибы; бактерии семейства Enterobacteriaceae; бактерии вида Staphylococcus aureus; бактерии вида Pseudomonas aeruginosa.

В микробиологических лабораториях, осуществляющих контроль качества и безопасности парфюмерно-косметической продукции, допускается применение импедансного метода в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.590—96 «Бактериологические исследования с использованием экспресс-анализатора «Бак Трак 4100», утвержденными 18.11.96. Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора. Использование прибора «Бак Трак 4100» позволяет сократить время испытаний и получить результат через 6—8 ч после начала исследований. Прибор аттестован и внесен в Государственный реестр (№ 14313-94).

4.1. Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий

4.1.1. Сущность метода

Метод основан на выявлении и количественном подсчете всех выросших колоний микроорганизмов при культивировании посевов в аэробных условиях при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч и пересчете их количества на 1 г (см³) исследуемого продукта.

4.1.2. Проведение анализа

Для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий выбирают те разведения, при посеве которых на чашках вырастает не менее 15 и не более 300 колоний.

Посев осуществляют глубинным или двухслойным агаровым методами.

4.1.2.1. Метод глубинного посева

По 1 см^3 исследуемого материала из разведений, приготовленных по п. 3.2.1.3, высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. При посеве крышку чашки Петри слегка приоткрывают и посевной материал вносят на дно чашки. Не позже чем через 15 мин после внесения материала, его заливают 15—20 см^3 одной из сред по п. 6.4.7, предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1)°С. Чашки с посевами, залитыми питательной средой, осторожно вращают, чтобы посевной материал равномерно распределился по всей питательной среде. Затем чашки с посевами оставляют на горизонтальной поверхности до полного застывания питательной среды.

После застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном и термостатируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч.

4.1.2.2. Двухслойный агаровый метод

По 1 см^3 исследуемого материала из разведений, приготовленных по п. 3.2.1.3, вносят в каждую из двух пробирок с 4 см^3 одной из сред по п. 6.4.7, предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С. Быстро перемешивают содержимое пробирок и переносят в чашки Петри с застывшей средой, распределяя его равномерно по поверхности среды.

После застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном и термостатируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч.

4.1.2.3. Обработка результатов

Просмотр посевов осуществляется каждый день.

Результаты оцениваются по каждой пробе отдельно.

Подсчитывают количество колоний на тех чашках, где их выросло от 15 до 300, суммируют и находят среднее арифметическое из них.

Допускается учитывать колонии с помощью лупы с 5^x увеличением.

Полученное среднее арифметическое число колоний округляют следующим образом:

- если число меньше 100 – его округляют до ближайшего числа, кратного 5;
- если число больше 100 и его последняя цифра 5 – его округляют до ближайшего числа, кратного 20;
- если число больше 100 и его последняя цифра не 5 – его округляют до ближайшего числа, кратного 10.

Количество микроорганизмов в 1 г продукта (X) вычисляют по формуле:

$$X = a \cdot 10^N / q, \text{ где}$$

a – округленное среднее арифметическое число колоний;

q – объем посевного материала, внесенного в чашку, см^3;

N – степень десятикратного разведения продукта.

Результаты анализа выражаются числом от 1,0 до 9,9, умноженным на 10^N, где N – соответствующая степень десятикратного разведения продукта.

Если на чашках с разведением 1 : 10 не обнаружено роста бактерий, то результат записывают так: менее $1{,}0 \cdot 10^1$ клеток на 1 г (см^3).

Если на чашках выросло более 300 колоний, то посевы повторяют, используя более высокие разведения продукта.

4.2. Определение количества дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов

4.2.1. Сущность метода

Метод основан на выявлении и количественном подсчете всех выросших колоний микроорганизмов, типичных по макро- и (или) микроскопической морфологии, на селективной агаризованной питательной среде Сабуро, при культивировании посевов при температуре (30 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч.

4.2.2. Проведение анализа

Для определения количества дрожжей и плесневых грибов выбирают те разведения, при посеве которых на чашках вырастает не менее 15 и не более 150 колоний для дрожжей и не менее 5 и не более 50 – для плесеней.

Посев осуществляют глубинным или двухслойным агаровым методами.

4.2.2.1. Метод глубинного посева

По 1 $см^3$ исследуемого материала из разведений, приготовленных по п. 3.2.1.3, высевают параллельно в две чашки Петри для каждого разведения. При посеве крышку чашки Петри слегка приоткрывают и посевной материал вносят на дно чашки. Не позже чем через 15 мин после внесения материала его заливают 15—20 $см^3$ предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С агаризованной среды Сабуро по п. 6.4.8. Чашки с посевами, залитыми питательной средой, осторожно вращают, чтобы посевной материал равномерно распределился по всей питательной среде. Затем чашки с посевами оставляют на горизонтальной поверхности до полного застывания питательной среды.

После застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч.

4.2.2.2. Двухслойный агаровый метод

По 1 $см^3$ исследуемого материала из разведений, приготовленных по п. 3.2.1.3, вносят в каждую из двух пробирок с 4 $см^3$ предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С агаризованной среды Сабуро. Быстро перемешивают содержимое пробирок и переносят в чашки Петри с застывшей агаризованной средой Сабуро, распределяя его равномерно по поверхности среды.

После застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч.

4.2.2.3. Обработка результатов

Результаты оцениваются по каждой пробе отдельно.

Просмотр посевов осуществляется каждый день, предварительный учет типичных колоний проводят через (72 ± 3) ч термостатирования посевов, а окончательный – через (120 ± 3) ч.

На поверхности плотной среды рост и развитие дрожжей и дрожжеподобных грибов характеризуется появлением плоских или выпуклых колоний белого или кремового, иногда серо-белого цвета. В глубине агара дрожжи образуют чечевицеобразные колонии.

Развитие плесневых грибов характеризуется появлением сметанообразных, слизистых колоний различной окраски с последующим опушением.

Подсчитывают все выросшие колонии, суммируют и находят среднее арифметическое из них.

Допускается учитывать колонии с помощью лупы с 5^x увеличением.

Полученное среднее арифметическое число колоний, если необходимо, округляют как описано в п. 4.1.2.3.

Количество дрожжей и плесневых грибов в 1 г (см^3) продукта (X) вычисляют по формуле:

$$X = a \cdot 10^N / q, \text{ где}$$

a – округленное среднее арифметическое число колоний;

q – объем посевного материала, внесенного в чашку, см^3;

N – степень десятикратного разведения продукта.

Результаты анализа выражаются числом от 1,0 до 9,9, умноженным на 10^N, где N – соответствующая степень десятикратного разведения продукта.

Если на чашках с разведением 1 : 10 не обнаружено роста дрожжей и плесневых грибов, то результат записывают так: «не обнаружены».

Если на чашках выросло более 150 колоний, то посевы повторяют, используя более высокие разведения продукта.

4.3. Выявление и идентификация бактерий сем. Enterobacteriaceae

К семейству Enterobacteriaceae относятся грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты и восстанавливают нитраты в нитриты.

4.3.1. Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий семейства Enterobacteriaceae с использованием накопительных и селективных питательных сред с дальнейшей идентификацией выявленных бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

4.3.2. Проведение испытания

10 см^3 исследуемого материала из разведения 10^{-1}, приготовленного по п. 3.2.1.3, вносят в стеклянный флакон вместимостью 200 см^3, содержащий 100 см^3 одной из питательных сред по п. 6.4.9. Смесь перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24—48 ± 3) ч.

При наличии признаков роста на средах накопления (помутнение среды, изменение ее цвета) делают пересев петлей на чашки Петри со средой Эндо (п. 6.4.10.1). Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24—48 ± 3) ч.

На среде Эндо бактерии семейства Enterobacteriaceae образуют колонии круглые, малиновые с металлическим блеском или без него, розовые, бесцветные, блестящие, выпуклые, диаметром 1—4 мм.

При окраске по Граму наблюдаются грамотрицательные неспорообразующие палочки.

При отсутствии роста на среде Эндо типичных для семейства Enterobacteriaceae колоний считают, что в образце нет представителей данного семейства.

Колонии, подозрительные по морфологии (каждую отдельно), пересевают петлей на одну из скошенных сред по п. 6.4.7. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Культуры проверяют на чистоту.

Чистые культуры исследуют на наличие фермента цитохромоксидазы, для чего полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом на обнаружение цитохромоксидазы (п. 6.4.6) и наносят бактериологической петлей или стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий. Синее окрашивание, появляющееся через 2—5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

При отрицательной оксидазной реакции культуры пересевают петлей на среду для определения ферментации глюкозы по п. 6.4.10.2 (допускается использование O/F-теста) и в среду для определения способности восстанавливать нитраты в нитриты по п. 6.4.10.3.

В половину пробирок со средой для определения ферментации глюкозы вносят по 0,5 $см^3$ стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. При наличии роста ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды из красного в желтый в пробирках с маслом и без него.

При проведении O/F-теста посев производят уколом в два столбика со средой Хью-Лейфсена по п. 6.4.10.4, один из которых заливают 1 $см^3$ стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. При положительной реакции происходит изменение цвета среды при культивировании как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

О наличии нитритов в среде судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса (п. 6.4.5). Для чего к суточной исследуемой культуре на среде для определения наличия нитритов приливают 0,2—0,3 $см^3$ реактива Грисса, погружая пипетку до дна пробирки. Появление красного окрашивания свидетельствует о наличии нитритов.

4.3.3. Обработка результатов

Если в исследуемом образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты и восстанавливают нитраты в нитриты, это значит, что парфюмерно-косметическое средство контаминировано бактериями сем. Enterobacteriaceae.

4.4. Выявление и идентификация Pseudomonas aeruginosa

Микроорганизмы вида Pseudomonas aeruginosa представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию, образуют проникающий в субстрат пигмент феназинового ряда, имеющий буроватый оттенок с вариантами от сине-зеленого (пиоцианин) до коричнево-красного, и способны к росту при температуре (42 ± 1) °С.

4.4.1. Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий вида Pseudomonas aeruginosa с использованием накопительных и селективных питательных сред с дальнейшей идентификацией выявленных бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

4.4.2. Проведение испытаний

10 $см^3$ исследуемого материала из разведения 10^{-1}, приготовленного по п. 3.2.1.3, вносят в стеклянный флакон вместимостью 200 $см^3$, содержащий 100 $см^3$ одной из питательных сред по п. 6.4.11. Смесь перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24—48 ± 3) ч.

При наличии признаков роста в среде накопления делают пересев петлей на чашки с одной из питательных сред по п. 6.4.7. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24—48 ± 3) ч.

При наличии роста зеленоватых, флюоресцирующих колоний, обладающих характерным запахом и окрашивающих среду, из них делают мазки и окрашивают по Граму.

Колонии, подозрительные по морфологии (каждую отдельно), пересевают петлей на одну из скошенных сред по п. 6.4.7. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Культуры проверяют на чистоту.

Чистые культуры колоний исследуют на наличие цитохромоксидазы. Для чего полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом на обнаружение цитохромоксидазы (п. 6.4.6) и наносят

бактериологической петлей или стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий. Синее окрашивание, появляющееся через 2—5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

Оксидазоположительные колонии пересевают петлей на среду Кинг-А (п. 6.4.12) и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24—48 ± 3) ч.

На среде Кинг-А культура Pseudomonas aeruginosa образует пигмент феназинового ряда, имеющий буроватый оттенок с вариантами от сине-зеленого (пиоцианин) до коричнево-красного и проникающий в субстрат.

Для дополнительного подтверждения принадлежности в виду Pseudomonas aeruginosa чашки со средой Кинг-А инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Культура Pseudomonas aeruginosa растет в вышеуказанных условиях с образованием сине-зеленого пигмента.

4.4.3. Обработка результатов

Если в результате исследований обнаружены колонии грамотрицательных неспорообразующих палочек, дающих положительную оксидазную реакцию, образующие пигмент или без него и дающие рост при 42 °С, считают, что парфюмерно-косметическое средство контаминировано Pseudomonas aeruginosa.

4.5. Выявление и идентификация Staphylococcus aureus

Микроорганизмы вида Staphylococcus aureus представляют собой грамположительные кокки, обладающие лецитиназной активностью, сбраживающие маннит в аэробных и анаэробных условиях или мальтозу в анаэробных условиях и дающие положительную реакцию плазмокоагуляции.

4.5.1. Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий вида Staphylococcus aureus с использованием накопительных и селективных питательных сред с дальнейшей идентификацией выявленных бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

4.5.2. Проведение испытаний

10 $см^3$ исследуемого материала из разведения 10^{-1}, приготовленного по п. 3.2.1.3, вносят в стеклянный флакон вместимостью 200 $см^3$, содержащий 100 $см^3$ одной из сред, приготовленных по п. 6.4.13. Смесь перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

При наличии признаков роста делают пересев петлей на чашки с одной из сред: п. 6.4.14.1 – желточно-солевой агар или п. 6.4.14.2 – Байрд-Паркер агар или п. 6.4.14.3 – маннитно-солевой агар. Посевы на желточно-солевой и Байрд-Паркер агар инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч, а посевы на маннитно-солевой агар – в течение (24—48 ± 3) ч.

При росте на желточно-солевом агаре Staphylococcus aureus образует круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными краями диаметром 2—2,5 мм, окрашенные в желтый, золотистый, кремовый, палевый или белый цвет, окруженные зоной лецитиназной активности.

На среде Байрд-Паркер Staphylococcus aureus растет в виде черных блестящих колоний диаметром 1—1,5 мм, окруженных зоной лецитиназной активности.

Наличие на маннитно-солевом агаре колоний, окруженных желтыми зонами, свидетельствует о способности этих микроорганизмов ферментировать маннит.

Из подозрительных по морфологии колоний делают мазки и окрашивают по Граму. Стафилококки по Граму окрашиваются положительно, имеют шарообразную или близкую к ней форму с диаметром 0,6—1,0 мкм и располагаются обычно в виде скоплений, напоминающих гроздья винограда.

При обнаружении грамположительных кокков делают пересев на одну из скошенных сред, приготовленных по п. 6.4.7. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Выделенную чистую культуру пересевают в среду Гисса с маннитом или мальтозой по п. 6.4.14.4, разлитую высоким столбиком (посев производят уколом). Инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

В случае роста стафилококков на среде Гисса с маннитом или мальтозой наблюдается ферментация или окисление углевода, сопровождающиеся изменением цвета среды.

Выделенную чистую культуру исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы.

Для проведения реакции в стерильную пробирку с 0,5—1,0 см^3 плазмы крови кролика, разведенной в 3—4 раза или приготовленной из сухого препарата промышленного производства, вносят одну петлю суточной агаровой культуры. Одну пробирку с плазмой крови оставляют незасеянной для контроля. Содержимое пробирок

перемешивают и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Результат учитывают через 2, 4, 6 и 24 ч.

При отсутствии свертывания плазмы через 24 ч исследуемую культуру относят к коагулазоотрицательной.

Реакцию считают положительной при образовании даже небольшого сгустка.

4.5.3. Обработка результатов

Если в результате исследований обнаружены колонии грамположительных кокков, ферментирующие маннит в аэробных и анаэробных условиях или мальтозу в анаэробных условиях, обладающие лецитиназной активностью и дающие положительную реакцию плазмокоагуляции, считают, что парфюмерно-косметическое средство контаминировано Staphylococcus aureus.

4.6. Испытание на стерильность

4.6.1. Метод прямого посева

4.6.1.1. Сущность метода

Метод основан на способности основного большинства как аэробных, так и анаэробных бактерий давать видимый рост на тиогликолевой среде, а дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов на среде Сабуро.

4.6.1.2. Проведение испытания

Из объединенной пробы, приготовленной по п. 3.2.2.2, отбирают стерильно по (5,0 ± 0,1) г (см^3) или (10,0 ± 0,1) г (см^3) испытуемого средства и высевают в два стеклянных флакона (параллельные определения) вместимостью 100 или 200 см^3, содержащие 50 или 100 см^3 жидкой среды Сабуро по п. 6.4.8.1 и 50 или 100 см^3 тиогликолевой среды по п. 6.4.15 соответственно.

Посевы в среде Сабуро инкубируют при температуре (30 ± 1) °С, а посевы в тиогликолевой среде при температуре (30—35) °С в течение 14 сут. Посевы просматривают ежедневно.

4.6.3. Метод мембранных фильтров

4.6.3.1. Сущность метода

Метод мембранных фильтров основан на фильтрации растворов через мембранные фильтры с размером пор не более (0,45 ± 0,02) мкм, на которых улавливается основное количество микроорганизмов, с последующим культивированием их в тиогликолевой среде и в жидкой среде Сабуро.

4.6.3.2. Проведение испытания

Фильтрование проводят в стерильных условиях с использованием фильтрационной установки, включающей фильтродержатель, соединенный с колбой приемником. Фильтродержатель состоит из воронки с крышкой и основания из пористой пластины, на которую помещается мембранный фильтр.

Фильтрационную установку стерилизуют любым способом, обеспечивающим сохранность рабочих характеристик мембран, а также стерильность мембран и всей установки.

Для фильтрации используют нитратцеллюлозные мембранные фильтры с размером пор (0,45 ±0,02) мкм, диаметром около 47 мм (мембрана «Владипор» типа МФАС-Б5 или МФА-МА-N5 или другие, удовлетворяющие требованиям).

Фильтрование проводят под вакуумом 93,3 кПа (70 мм рт. ст.).

Для фильтрования продуктов, содержащих небольшое количество взвешенных частиц, используют предварительную фильтрацию через префильтр. В качестве префильтров можно использовать фильтры типа АР 15 (Millipore), картон для предварительной фильтрации марки КФБЖ, картон для предварительной фильтрации марки КФМП и другие материалы, способные эффективно задерживать твердые частицы.

Пробу, подготовленную по п. 3.2.2.2, немедленно фильтруют. Фильтрацию заканчивают в момент исчезновения влаги на поверхности фильтра. После окончания фильтрации мембрану отмывают 3—5 порциями по 100 см^3 стерильного физиологического раствора для полного удаления с поверхности фильтра веществ, препятствующих росту микроорганизмов.

После отмывания мембрану немедленно извлекают из фильтродержателя, разрезают стерильными ножницами пополам и одну половину помещают в стеклянный флакон вместимостью 100 или 200 см^3, содержащий 50 или 100 см^3 жидкой среды Сабуро по п. 6.1.9.1, а вторую половину – в стеклянный флакон, содержащий 50 или 100 см^3 тиогликолевой среды по п. 6.1.16 соответственно.

Посевы в среде Сабуро инкубируют при температуре (30 ±1) °С, а посевы в тиогликолевой среде – при температуре 30—35 °С в течение 7 сут. Посевы просматривают ежедневно.

4.6.4. Обработка результатов

Посевы просматривают в рассеянном свете ежедневно и по окончании периода инкубации. Наличие роста микроорганизмов в питательных средах оценивают визуально по появлению мутности, пленки, осадка и других макроскопических изменений. Выявленный рост микроорганизмов подтверждают микроскопированием.

Испытуемая продукция считается стерильной при отсутствии роста микроорганизмов.

При обнаружении роста хотя бы в одном флаконе его подтверждают микроскопированием и повторяют испытание на таком же количестве образцов, как и в первый раз. В случае роста при повторном испытании микроорганизмов, морфологически сходных с микроорганизмами, выявленными при первичном посеве, испытуемую продукцию считают нестерильной. Если при повторном посеве наблюдается рост микроорганизмов, отличающихся по морфологии от первоначально выделенных, испытание проводят в третий раз на удвоенном количестве образцов. При наличии роста хотя бы в одном флаконе при третьем испытании косметическую продукцию считают нестерильной.

5. Микробиологические нормативы для парфюмерно-косметической продукции

Микробиологическому контролю подлежат средства для ухода за кожей лица и тела (косметические кремы, кремообразные маски, косметическое молочко, косметические эмульсии, шампуни, жидкие мыла, гели для душа и ванн, пены для ванн, бальзамы, дезодоранты, депилятории, средства для и после бритья, лосьоны-тоники, лосьоны, тоники), средства декоративной косметики (в т. ч. средства для глаз: жидкая тушь, средства для подведения линии глаз, компактные сухие и жидкие тени для век, губная помада, пудра, румяна компактные и кремообразные), детская косметика и парфюмерия, средства для ухода за волосами (шампуни, ополаскиватели, бальзамы, маски, средства для укладки волос и др.), средства интимной гигиены, специальная косметическая продукция (средства для загара, фотозащитные средства и др.), косметические средства разового использования (в ампулах, капсулах и др.), душистые воды.

Обязательному микробиологическому контролю также подлежит сырье природного и синтетического происхождения и другие компоненты, входящие в состав косметических средств (биологически активные вещества – действующее начало, ингредиенты основы –

структурообразующие эмульгаторы, поверхностно-активные компоненты, солюбилизаторы, консерванты и др.).

Не подлежат обязательному микробиологическому контролю готовые средства, содержащие более 25 % этилового спирта, окислительные краски для волос и ногтей.

Микробиологические показатели безопасности парфюмерно-косметической продукции в соответствии с требованиями СанПиН 1.2.631—97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции» (прилож. 2), приведены в табл. 1.

Таблица 1

Группы	Вид косметической продукции	Общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных бактерий МАФАнМ	Дрожжи, дрожжеподобные и плесневые грибы	Бактерии семейства Enterobacteriaceae	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa
		КОЕ в 1 г ($см^3$) продукции				
I группа	Ампульная косметика, используемая для введения методом электрофореза	Стерильная продукция				
II группа	Детская косметика. Косметика для глаз	Не более $1 \cdot 10^2$	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие
III группа	Остальная косметика	Не более $1 \cdot 10^3$	Не более $1 \cdot 10^2$	Отсутствие	Отсутствие	Отсутствие

6. Аппаратура, растворы реактивов, питательные среды

6.1. Аппаратура

Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г	ГОСТ 24104—88Е
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88Е
pH-метр любой марки с набором электродов с погрешностью измерений ±0,1 pH	
Термометр 0—100 °С, цена деления 1 °С	ГОСТ 28498—90
Автоклав (паровой стерилизатор)	ГОСТ 19569—89Е
Аппарат для встряхивания	
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 40—45 °С	
Дистиллятор электрический ДЭ-4	
Лупа с пятикратным увеличением	ГОСТ 25706—83
Прибор для счета колоний бактерий	
Прибор вакуумного фильтрования ПВФ-47	
Спиртовка	ГОСТ 25336—82Е
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1 °С	

6.2. Питательные среды и реактивы

Агар микробиологический	ГОСТ 17206—96
Агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов	ФС 42—188ВС—90
Агар Эндо	ФС 42—186ВС—88
Бромкрезоловый пурпурный (индикатор)	ГФ XI изд.
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Вода мясная	ГОСТ 10444.1—84
Глюкоза	ГОСТ 6038—79
Гидролизат казеина панкреатический	
Глицерин	ГОСТ 6824—96
Желчь сухая медицинская	ОСТ 49278—75
Калий азотнокислый	ГОСТ 4217—77
Калий сернокислый	ГОСТ 4145—74

Калий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 2493—75
Калия теллурит, раствор массовой концентрацией 2 %	
Кислота соляная, раствор массовой концентрацией (HCl) = 0,1 моль/дм^3	ГОСТ 3118—77
Кислота сульфаниловая	ГОСТ 5821—78
Кислота тиогликолевая	
Кислота уксусная ледяная	ГОСТ 61—75
Литий хлористый, 6-водный	ГОСТ 4328—77
Магний хлористый	ГОСТ 4209—77
Малахитовый зеленый, индикатор	ГФ XI изд.
Маннит	ГОСТ 8321—74
Мальтоза	
Масло вазелиновое	ГОСТ 3164—78
Масло иммерсионное	ГОСТ 13739—78
Метиленовый синий	
Натрия гидроокись, раствор массовой концентрацией (NaOH) = 0,1 моль/дм^3	ГОСТ 4328—77
Натрия резазурин, раствор массовой концентрацией 1,0 г/дм^3	
Натрий сернистокислый, раствор массовой концентрацией (Na_2SO_3) = 0,1 г/дм^3	ТУ 6—09—5313—86
Натрия тиогликолят	
Натрий хлористый	ГОСТ 4233—77
Натрий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 245—76
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 4172—76
N, N-диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид, раствор массовой концентрацией 1 %	
1-Нафтиламин	ГОСТ 8827—79
1-Нафтол, спиртовый раствор массовой концентрацией 1 %	ГОСТ 5838—79
Основа бактериологических питательных сред сухая (Бактофок-МК)	ФС 42—3407—97
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	ГОСТ 13805—76
Питательная среда № 1 (для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), сухая	ВФС 42—1801—88

Питательная среда № 2 (для выращивания плесневых грибов), сухая	ВФС 42—1802—88
Питательная среда № 3 (обогащения для бактерий семейства Enterobacteriaceae), сухая	ВФС 42—1803—88
Питательная среда № 6 (для определения ферментации глюкозы)	ВФС 42—2038—91
Питательная среда № 7 (для определения реакции нитратов в нитриты), сухая	ВФС 42—2020—90
Питательная среда № 8 (для выращивания P. aeruginosa и S. aureus), сухая	ФС 42—3181—95
Питательная среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина P. aeruginosa), сухая	ВФС 42—1908—89
Питательная среда № 10 (для идентификации S. aureus), сухая	ВФС 42—1909—89
Питательная среда для контроля стерильности, сухая	ФС 42—3390—97
Плазма кролика, сухая, цитратная для реакции плазмокоагуляции	
Цистин (цистеин)	
Растворы и реактивы для окраски мазков по Граму	ГОСТ 10444.1—84
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Феноловый красный, индикатор	ГФ XI изд.
Экстракт дрожжевой	

6.3. Материалы

Бумага индикаторная универсальная	
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Марля медицинская	ОСТ 9412—93
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ОСТ 25336—82
Картон для предварительной фильтрации марки КФБЖ	ТУ 13-7308000-691—84
Картон для предварительной фильтрации марки КФМП	ТУ 13-7308001-673—84
Пипетки разной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 20292—74
Пробирки типов П1 и П2	ГОСТ 25336—82
Штативы для пробирок	

Шпатели	
Чашки Петри диаметром 90—100 мм	ГОСТ 25336—82
Цилиндры на 100—250 см³	ГОСТ 1770—74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 мл	ГОСТ 10782—85
Фильтры мембранные типа МФАС-Б5 или МФА-МА-N5 диаметр 47 мм, размер пор 0,45 мкм	ТУ 6—05—1903—81
Фильтры мембранные типа HAWG (Millipore) диаметр 47 мм, размер пор 0,45 мкм	
Фильтры мембранные типа АР 15 (Millipore) диаметр 47 мм	

Допускается применение средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов, материалов и питательных сред по качеству не ниже указанных.

6.4. Приготовление растворов реактивов и питательных сред

Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х. ч.» или «ч. д. а.»

Необходимое значение pH растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия, раствор концентрации (NaOH) = 0,1 моль/дм³ или раствора соляной кислоты, раствор концентрации (HCl) = 0,1 моль/дм³.

Значение pH растворов определяют потенциометрически при температуре (20 ± 2) °С.

Ориентировочное определение pH растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

6.4.1. Изотонический 0,85 %-ный раствор хлористого натрия (физиологический раствор)

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

6.4.2. Раствор твина-80

1,0 г или 4,0 г твина-80 растворяют соответственно в 99 см³ или в 96 см³ физиологического раствора, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

6.4.3. Раствор фенолового красного массовой концентрацией 1 %

1,0 г фенолового красного растирают в ступке, добавляя небольшими порциями 28,2 см^3 раствора натрия гидроокиси массовой концентрацией 0,01 моль/дм^3. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки.

Хранят во флаконе из темного стекла при температуре 4—10 °С.

6.4.4. Раствор малахитового зеленого массовой концентрацией 0,5%

0,5 г малахитового зеленого помещают в стерильный флакон, заливают 100 см^3 горячей дистиллированной воды и помещают на сутки в термостат с температурой (37 ± 1) °С, периодически перемешивая.

Хранят во флаконе из темного стекла при температуре 4—10 °С.

6.4.5. Реактив Грисса

Раствор № 1. 0,5 г кислоты сульфаниловой растворяют в 30 см^3 кислоты уксусной ледяной, прибавляют 100 см^3 воды, фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор годен в течение месяца.

Раствор № 2. 0,1 г 1-нафтиламина растворяют в 100 см^3 кипящей воды, охлаждают, прибавляют 30 см^3 кислоты уксусной ледяной, фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор годен в течение 7 сут.

Перед употреблением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

6.4.6. Реактив для определения наличия фермента цитохромоксидазы

Раствор № 1. 1,0 г 1-нафтола растворяют в 100 см^3 спирта этилового.

Раствор № 2. 1,0 г N, N-диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорида растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды.

Перед употреблением смешивают растворы № 1 и № 2 в соотношении 2 : 3.

Хранят во флаконах нейтрального светозащитного стекла при температуре 4—10 °С в течение 14 сут.

6.4.7. Среды для культивирования аэробных и факультативно анаэробных бактерий

6.4.7.1. Мясо-пептонный агар с глюкозой

Пептон	10,0 г
Мясная вода	1000 см^3
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар микробиологический	13,0 г

Все ингредиенты растворяют в мясной воде, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного его расплавления, устанавливают pH = 7,3 ±0,1, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С.

6.4.7.2. Питательный агар «МК» с глюкозой

Бактофок-МК	20,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар микробиологический	13,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты растворяют в воде, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного его расплавления, устанавливают pH = 7,3 ±0,1, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С.

Допускается использовать агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов или питательную среду № 1 сухую.

6.4.8. Среда для выращивания грибов (среда Сабуро)

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Глюкоза или мальтоза	40,0 г
Агар микробиологический	13,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения всех компонентов, устанавливают pH = 5,8 ±0,2, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С.

Допускается использовать питательную среду № 2 сухую.

6.4.8.1. Среда Сабуро жидкая

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Глюкоза или мальтоза	40,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения всех компонентов, устанавливают pH = 5,8 ±0,2, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.9. Среды обогащения для бактерий сем. Enterobacteriaceae

6.4.9.1. Среда для выращивания бактерий сем. Enterobacteriaceae

Пептон или Бактофок-МК	20,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,5 г
Калия фосфат однозамещенный	2,5 г
Феноловый красный	0,08 г
Малахитовый зеленый	0,015 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Питательную основу и соли растворяют в дистиллированной воде при нагревании, вносят глюкозу, прибавляют 8 см^3 1 %-ного раствора фенолового красного и 3 см^3 0,5 %-ного малахитового зеленого, устанавливают pH = 7,5 ±0,1, нагревают до полного растворения компонентов, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.9.2. Среда Мак-Конки

Пептон или Бактофок-МК	20,0 г
Лактоза	10,0 г
Желчь сухая	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	0,01 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения компонентов, устанавливают pH = 7,5 ±0,1, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Допускается использовать питательную среду № 3 сухую.

6.4.10. Питательные среды для идентификации бактерий сем. Enterobacteriaceae

6.4.10.1. Агар Эндо

Среду готовят, как указано на этикетке или по следующей прописи.

К 100 см³ питательного агара, приготовленного по п. 6.1.8, соблюдая правила асептики добавляют вместо глюкозы 1 г лактозы, растворенной в 5 см³ стерильной воды, и подогревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин.

В отдельную пробирку наливают 1,0 см³ насыщенного спиртового раствора фуксина основного, к которому добавляют свежеприготовленный водный раствор натрия сернистокислого массовой концентрацией 10 % до обесцвечивания фуксина (бледно-розовый цвет). Полученную смесь добавляют в расплавленный лактозный агар, перемешивают, избегая вспенивания, и разливают в чашки Петри.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 5 сут.

6.4.10.2. Среда для определения ферментации глюкозы

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Глюкоза	40,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Вода дистиллированная	1000 см³

Питательную основу и натрия хлорид растворяют в дистиллированной воде при нагревании, вносят глюкозу, прибавляют 8 см³ 1 %-ного раствора фенолового красного, устанавливают pH = 7,4 ±0,2, кипятят 1 мин, фильтруют и разливают в пробирки с поплавками по 4—5 см³. Стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин. Затем как можно быстрее охлаждают среду.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Допускается использовать среду № 6 сухую.

6.4.10.3. Среда для определения восстановления нитратов в нитриты

Пептон или Бактофок-МК	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия нитрат	1,5 г
Вода дистиллированная	1000 см³

Все ингредиенты растворяют в воде при нагревании, устанавливают pH = 7,4 ±0,2, кипятят 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр и разливают в пробирки по 4—5 см³. Стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Допускается использовать питательную среду № 7 сухую.

6.4.10.4. Среда Хью-Лейфсена

Пептон или Бактофок-МК	2,0 г
Глюкоза	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный	0,3 г
Бромтимоловый синий	0,03 г
Агар микробиологический	3,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Ингредиенты растворяют воде, добавляют заранее замоченный агар, нагревают до полного растворения всех компонентов, кипятят 2—3 мин, устанавливают pH = 7,4 ±0,1, добавляют 3 см^3 1 %-ного водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 10—15 мл и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 15 мин.

Цвет среды до автоклавирования – синий, после – травянисто-зеленый.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.11. Среды для выращивания Pseudomonas aeruginosa

6.4.11.1. Мясо-пептонный бульон с глюкозой

Пептон	10,0 г
Мясная вода	1000 см^3
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г

Все ингредиенты растворяют в мясной воде, нагревают до полного растворения всех компонентов, устанавливают pH = 7,3 ±0,2, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С.

6.4.11.2. Питательный бульон «МК» с глюкозой

Бактофок-МК	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения компонентов, устанавливают pH = 7,3 ±0,2, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С.

6.4.11.3. Среда для выращивания P. aeruginosa

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Глюкоза	2,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный	2,5 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Питательную основу и натрия хлорид растворяют в дистиллированной воде при нагревании, вносят глюкозу, устанавливают pH = 7,3 ±0,2, кипятят 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.12. Среда для выявления пигмента пиоцианина (Среда Кинг-А)

Пептон или Бактофок-МК	20,0 г
Магния хлорид безводный	5,0 г
Калия сульфат безводный	1,0 г
Глицерин	10,0 см^3
Агар микробиологический	13,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все ингредиенты, кроме глицерина, растворяют в воде и оставляют на 15 мин. Затем вносят глицерин, тщательно перемешивают, растворяют при нагревании, устанавливают pH = 7,4 ±0,2, кипятят 1 мин, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Допускается использовать питательную среду № 9 сухую.

6.4.13. Среды для выращивания Staphylococcus aureus

6.4.13.1. Солевой бульон

В 1000 см^3 мясо-пептонного бульона или питательного бульона «МК» вносят 65,0 г натрия хлористого, перемешивают до полного растворения соли, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.13.2. Среда по п. 6.4.11.3.

6.4.14. Среды для идентификации Staphylococcus aureus

6.4.14.1. Желточно-солевой агар

Эмульсия яично-желточная: куриное яйцо протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, помещают в стерильную чашку Петри, стерильным инструментом пробивают с противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно отверстие полностью удаляют белок, затем, увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу с 50 см^3 физиологического раствора, содержимое встряхивают до получения однородной массы.

Хранят при температуре 4—10 °С.

В 100 см^3 одной из питательных сред, приготовленных по п. 6.1.8, расплавленной до 45—50 °С, вносят 9,5 г натрия хлористого и 10 см^3 яично-желточной эмульсии. Смесь перемешивают до полной гомогенизации компонентов и разливают в чашки Петри.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 5 сут.

6.4.14.2. Агар Байрд-Паркер

Основа среды. В 1000 см^3 одной из питательных сред, приготовленных по пп. 6.4.11.1 или 6.4.11.2, вносят 17,9 г лития хлористого, 15 г агара микробиологического, 5,0 г экстракта дрожжевого, перемешивают и нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают до 50—60 °С, устанавливают pH = 6,9 ±0,1, разливают во флаконы по 100 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Перед употреблением к 100 см^3 расплавленной и охлажденной до 45—50 °С основы среды прибавляют 0,5 см^3 2 %-ного раствора калия теллурита и 5 см^3 яично-желточной эмульсии, приготовленной как указано выше. Среду перемешивают до полной гомогенизации компонентов и разливают в чашки Петри. Перед посевом чашки подсушивают в термостате.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 48 ч.

6.4.14.3. Маннитно-солевой агар

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Маннит	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар микробиологический	13,0 г
Вода дистиллированная	1000 см^3

Все компоненты растворяют в воде, вносят 2,5 см³ 1 %-ного раствора фенолового красного, устанавливают pH = 7,6 ±0,2, кипятят 1 мин, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют под давлением при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

Допускается использовать питательную среду № 10 сухую.

6.4.14.4. Среда Гисса с маннитом или мальтозой

Пептон или Бактофок-МК	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Маннит или мальтоза	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар микробиологический	13,0 г
Вода дистиллированная	1000 см³

Все компоненты растворяют в воде, вносят 2,5 см³ 1 %-ного раствора фенолового красного, устанавливают pH = 7,6 ±0,2, кипятят 1 мин, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Стерилизуют под давлением при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 4—10 °С не более 14 сут.

6.4.15. Среда для контроля стерильности (тиогликолевая среда)

Среду готовят в соответствии с указаниями на этикетке или по следующей прописи:

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Натрия хлорид	2,5 г
Глюкоза	5,0 г
Цистин (цистеин)	0,75 г
Тиогликолевая кислота или тиогликолят натрия	0,5 г
Раствор резазурина натрия (1 : 1000)	1,0 см³
Агар микробиологический	0,75 г
Вода дистиллированная	1000 см³

Все ингредиенты растворяют в воде, прибавляют замоченный заранее агар, нагревают до полного растворения всех компонентов, устанавливают pH = 7,2 ±0,2, фильтруют через ватно-марлевый

фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121 ±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре 10—25 °С в защищенном от света месте в течение 14 сут.

6.4.16. Буферный раствор

1,0 г пептона ферментативного (или Бактофок-МК), 4,3 г хлористого натрия, 7,23 г фосфорнокислого двузамещенного натрия и 3,56 г фосфорнокислого однозамещенного калия растворяют при нагревании в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH = 7,0 и разливают в стеклянные флаконы по 400 $см^3$, стерилизуют 15 мин при температуре (121 ±1) °С.

Хранят при температуре 4—6 °С не более 14 сут.

Список литературы

1. СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

2. СанПиН 1.2.631—97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции».

3. ГОСТ 26670—91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

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

5. ГОСТ 10444.2—94 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества Staphylococcus aureus».

6. ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических анализов».

7. ГОСТ 26972—86 «Зерно, крупа, мука, толокно для продуктов детского питания. Методы микробиологического анализа».

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

9. «Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями», МЗ СССР. № 04-723/3 от 17.12.84.

10. Методические указания МУК 4.2.590—96 «Бактериологические исследования с использованием экспресс-анализатора «Бак Трак 4100». Утв.18.11.96 Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора.

11. Государственная Фармакопея XI изд.

12. Определитель бактерий Берджи /Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса.—М.: Мир, 1997.

gost.e-ecolog.ru