4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического контроля готовых изделий с кремом

Методические указания МУК 4.2.762—99

1. Разработаны Институтом питания Российской академии медицинских наук (В. А. Тутельян, И. Б. Куваева, С. А. Шевелева, Н. Р. Карликанова), Государственным научно-исследовательским институтом хлебопекарной промышленности (Т. Г. Богатырева, О. А. Сидорова, С. П. Полякова).

2. Утверждены и введены в действие Первым заместителем министра здравоохранения Российской Федерации – Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 02.07.99.

3. С введением настоящих методических указаний утрачивают силу «Методические указания по проведению санитарно-бактериологических исследований на предприятиях, вырабатывающих кондитерские кремовые изделия» № 1351—75.

gost.e-ecolog.ru

Содержание

1. Общие положения 218
2. Нормативные ссылки 219
3. Методы отбора, доставки и подготовки проб к анализу 219
3.1. Отбор проб 219
3.2. Доставка и хранение проб 221
3.3. Подготовка проб к анализу 221
4. Методы анализа 222
4.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) 223
4.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) 225
4.3. Определение бактерий рода Salmonella 226
4.4. Определение коагулазоположительных стафилококков (Staphylococcus aureus) 235
4.5. Определение дрожжей и плесневых грибов 237
5. Микробиологические нормативы для кондитерских изделий с кремом 238
6. Материалы, реактивы и питательные среды 243
Список литературы 253

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный
санитарный врач Российской
Федерации – Первый заместит
министра здравоохранения
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
МУК 4.2.762—99
2 июля 1999 г.
Дата введения: 2 сентября 1999

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы микробиологического контроля готовых изделий с кремом

Методические указания

1. Общие положения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы лабораторных исследований (испытаний) качества готовых издели с кремом по микробиологическим показателям безопасности дл здоровья человека, проводимых в порядке производственного кон троля, государственного санитарно-эпидемиологического надзора а также при испытании указанной продукции в целях сертификаци соответствия.

1.2. Методические указания предназначены для применения аккредитованных бактериологических производственных, испыта тельных лабораториях и лабораториях организаций государствен ной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации осуществляющих контроль качества и безопасности готовых изде лий с кремом, и позволяют проводить контроль на соответстви СанПиН 2.3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов».

1.3. Данный документ разработан в связи с необходимостью совершенствования методов микробиологического анализа в соот ветствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ.

Методы адаптированы к условиям работы лабораторий, осуществляющих контроль качества и безопасности готовых изделий с кремом.

1.4. Для правильного выбора массы продукта, засеваемой при контроле за отсутствием бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий), S. aureus, патогенных микроорганизмов, в т. ч. сальмонелл, в методические указания включены микробиологические нормативы, соответствующие СанПиН 2.3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству продовольственного сырья и пищевых продуктов», а также микробиологические нормативы в соответствии с утвержденной в установленном порядке нормативной документацией на изделия с кремом, производимые по усовершенствованным технологиям, с использованием новых видов жиров и т. д.

1.5. Настоящие методические указания должны учитываться при пересмотре действующей и разработке вновь создаваемой нормативной документации на готовые изделия с кремом, вырабатываемые хлебопекарными и кондитерскими предприятиями и цехами, и компоненты, используемые при их изготовлении.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.99.

2.2. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 05.06.94 № 625 с изменениями и дополнениями к нему, утвержденными постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 680.

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

3. Методы отбора, доставки и подготовки проб к анализу

3.1. Отбор проб

3.1.1. Качество изделий с кремом оценивают по результатам анализа части продукции, отобранной из партии. Партией считают продукцию одного вида, сорта и наименования, выработанную за

одну смену и оформленную документом о качестве установленной формы. Документ о качестве должен содержать:

- наименование продукции;
- наименование и адрес изготовителя;
- номер и дату выдачи;
- дату и час выработки;
- условия хранения и сроки годности;
- подтверждение о соответствии качества продукции нормативно-технической документации;
- обозначение нормативно-технической документации.

3.1.2. При отборе проб следует руководствоваться ГОСТ 26668—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов» и ГОСТ 5904—82 «Изделия кондитерские. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб».

Для составления объединенной пробы от выборки отбирают:

- для тортов не менее 1 шт. массой не менее 300 г;
- для пирожных в ассортименте – не менее 10 шт. массой менее 50 г, не менее 6 шт. массой 50—60 г, не менее 5 шт. массой 65—75 г, не менее 4 шт. массой 80—90 г, не менее 3 шт. массой 100—200 г.

Отбор проб производят, вскрывая определенное количество транспортных единиц упаковки, оговоренное в нормативно-технической документации, и изымая часть продукции. Пробы отбирают асептически с помощью стерильных инструментов в стерильную посуду таким образом, чтобы в них были представлены все компоненты изделий в соотношении, наиболее близком к составу анализируемых тортов или пирожных.

3.1.3. Пробу, отобранную из отдельной единицы упаковки, называют разовой. Количество продукта в разовых пробах из каждой единицы упаковки должно быть одинаковым. Разовые пробы соединяют, перемешивают и составляют среднюю пробу. Средняя проба должна быть отобрана таким образом, чтобы ее состав соответствовал всей партии. Масса средней пробы должна быть не менее 250 г.

3.1.4. Банку с пробой снабжают этикеткой, на которой указывают:

- номер пробы, дату и час отбора пробы;
- наименование продукции;
- номер и объем партии;

- дату и час выработки продукции;
- должность и подпись лица, отбиравшего пробу;
- обозначение действующей нормативно-технической документация, по которой вырабатывалась продукция.

Пробу, отправляемую в лабораторию вне данного предприятия, пломбируют или опечатывают и снабжают этикеткой, на которой дополнительно указывают наименование предприятия-изготовителя.

3.2. Доставка и хранение проб

3.2.1. Доставка проб в лабораторию должна осуществляться, по возможности, специальным автотранспортом в термоконтейнерах с охлаждающими вкладышами не позднее 2 ч с момента их отбора.

3.2.2. Бактериологическое исследование продукции производят не позднее, чем через 4 ч с момента отбора пробы. Образцы до начала исследования сохраняют при температуре от 2 до 6 °С.

3.3. Подготовка проб к анализу

3.3.1. Подготовка проб к анализу проводится по ГОСТ 26669—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов» и ГОСТ 5904—82 «Изделия кондитерские. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб». Все работы проводят с помощью стерильных инструментов в стерильных условиях.

3.3.2. Среднюю пробу асептично помещают в стерильный стакан гомогенизатора или фарфоровую ступку и тщательно измельчают до однородной массы (при необходимости можно добавить 2—5 г стерильного кварцевого песка).

3.3.3. Приготовление разведений для посева.

3.3.3.1. Навеску массой 10,0 ± 0,1 г, приготовленную по п. 3.3.2, отбирают из средней пробы изделия и асептично вносят в колбу с 90 $см^3$ стерильного физиологического раствора (п. 6.3.1.2) или 0,1 %-ной пептонной воды (п. 6.3.1.1), тщательно перемешивают круговыми движениями и помещают на водяную баню либо в термостат при 45 °С на 15—20 мин, либо на аппарат для встряхивания при той же температуре на 3—5 мин до получения однородной взвеси. В 1 $см^3$ приготовленной таким образом взвеси (гомогената) содержится 0,1 г исследуемого образца (первое разведение). Если при гомогенизации продукта получена неоднородная взвесь, то ее отстаивают в течение

15 мин и для посева и (или) приготовления разведений используют надосадочную жидкость.

3.3.3.2. Из первого разведения образца стерильной пипеткой берут 1 $см^3$ и переносят в пробирку, содержащую 9 $см^3$ стерильного раствора. Другой пипеткой взвесь перемешивают 5—10 раз и получают второе разведение (1 : 100). При необходимости последующие разведения готовят таким же образом. При приготовлении разведений каждый раз используют новую пипетку, опуская конец пипетки в жидкость не более чем на 2 см ниже уровня. Перед посевом разведения осторожно встряхивают .

3.3.4. Время от момента приготовления разведений до посева не должно превышать 30 мин.

4. Методы анализа

При контроле микробиологического качества и безопасности кондитерских изделий с кремом используют стандартизованные методы микробиологического посева. При этом определяют следующие группы микроорганизмов: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, бактерии группы кишечных палочек (колиформные бактерии), S. aureus и патогенные микроорганизмы, в т. ч. сальмонеллы, дрожжи и плесени.

При выявлении или определении количества микроорганизмов соответствующих групп необходимо руководствоваться ГОСТ 26670—91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

При проведении посевов на селективные среды накопления для определения условно-патогенных и патогенных микроорганизмов рекомендуется использовать контрольные культуры соответствующих микроорганизмов, которые следует изучать параллельно с культурами, выделенными из исследуемых образцов тортов и пирожных.

В аккредитованных микробиологических лабораториях, осуществляющих контроль качества и безопасности кондитерских изделий с кремом, допускается использование автоматизированных экспресс-методов микробиологического контроля.

Для автоматизированного микробиологического экспресс-контроля применяют компьютеризированные приборы, представляющие собой измерительные системы для определения микробной обсемененности и выявления различных микробов, принцип дейст-

вия которых основан на регистрации относительного изменения электрического сопротивления, оптической плотности, турбидиметрического или колориметрического эффекта питательных сред, происходящих под влиянием процессов роста и размножения микроорганизмов. Для этих целей применяют микробиологические экспресс-анализаторы БакТрак 4100 (Австрия), Рэббит (Англия), Мальтус (Ирландия), Бактометр (Франция), БакТ/Алерт (США), Биоскрин (Финляндия) или другие приборы аналогичного назначения.

Анализаторы позволяют определять мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, условно-патогенные и патогенные микроорганизмы (колиформы, сальмонеллы, стафилококки и др.), дрожжи, плесени, молочнокислые бактерии и др.

В комплект приборов входят: контролируемые компьютером термостатируемые инкубаторные блоки на различное количество образцов, персональный компьютер, принтер, комплекты измерительных ячеек с электродами (объемом на 10 и 100 мл), наборы высокоселективных сред, другие материалы.

Использование микробиологических автоматических анализаторов позволяет сократить время на проведение испытаний и получить результаты анализа уже через 6—8 ч после начала исследования.

Обязательным условием для применения микробиологических анализаторов при осуществлении контроля качества продукции является наличие утвержденных в установленном порядке в системе государственного санитарно-эпидемиологического нормирования методических указаний, созданных в результате сравнительных испытаний определения на приборе конкретного типа со стандартизованными методами микробиологического контроля и адаптированных к установленным в СанПиН 2.3.2.560—96 нормативным показателям для кондитерских изделий с кремом.

4.1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

4.1.1. Сущность метода.

Метод основан на количественном подсчете колоний микроорганизмов, вырастающих в глубине и на поверхности плотного питательного агара при температуре (30 ± 1) °С в течение 72 ч.

При определении количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов руководствуются ГОСТ

26670—91 и ГОСТ 10444.15—94 с учетом нижеизложенных рекомендаций.

4.1.2. Проведение анализа.

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

Перед посевом чашки маркируют. На дно чашки карандашом по стеклу наносят номер исследуемого образца, разведение и дату.

По 1 $см^3$ каждого разведения образца, приготовленного по п. 3.3.3, вносят в 2 чашки Петри (параллельное определение). Посевной материал можно вносить от большего разведения к меньшему, пользуясь одной пипеткой. Пипетку с посевным материалом держат под углом 45°, касаясь концом пипетки дна чашки, не выдувая последнюю каплю из пипетки. Затем, не позже чем через 20 мин, вносят в чашку питательную среду (п. 6.3.2.3, 6.3.2.5), расплавленную на водяной бане и остуженную до 45 °С, осторожно и равномерно перемешивают содержимое чашки. Высота слоя питательной среды должна быть не менее 4—5 мм.

После застывания среды чашки переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при (30 ± 1) °С на 72 ч (допускается предварительный учет через 48 ч с последующим окончательным учетом еще через 24 ч).

После инкубации подсчитывают все выросшие колонии на тех чашках, где их количество составляет 15—300 колоний, при этом чашки располагают вверх дном на темном фоне. Подсчет производят при помощи лупы с увеличением от 4 до 10 раз или специального прибора для счета колоний.

Если инкубированные чашки с разведением 1 : 10 не содержат колоний, то результат выражают так: меньше чем 1×10^1 КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 г исследуемого образца.

Если на каждой из двух параллельных чашек с разведением 1 : 10 содержится меньше чем 15 колоний, то результат выражается так: менее чем $1{,}5 \times 10^2$.

Если количество колоний более 15, подсчитывают колонии на обеих чашках с одним и тем же разведением и вычисляют среднюю величину, умножают среднюю величину на соответствующее разведение и получают число микроорганизмов в 1 г продукта.

При подсчете микроорганизмов целесообразно руководствоваться ГОСТ 26670—85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы культивирования микроорганизмов».

Полученный результат округляют до числа, кратного:

- 5, если среднее арифметическое число микроорганизмов менее 100;
- 20, если среднее арифметическое число микроорганизмов более 100 и оканчивается цифрой 5;
- 10, если среднее арифметическое число микроорганизмов более 100 и не оканчивается цифрой 5.

Ответ выражают в виде числа КОЕ/г с указанием соответствия или несоответствия тортов и пирожных микробиологическому нормативу на этот показатель (см. табл. 2, 3, 4).

4.2. Определение бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

В соответствии с принятой международной номенклатурой к бактериям группы кишечных палочек (БГКП) отнесены факультативно-анаэробные, грамотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (36 ± 1) °С в течение 24—48 ч, в основном являющиеся представителями родов Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia (т. е. учитываются как цитратотрицательные, так и цитратположительные варианты БГКП). Методы исследования на БГКП приведены в ГОСТ Р 50474—93.

4.2.1. Сущность метода.

Метод основан на высеве определенного количества продукта в жидкую селективную среду, содержащую лактозу для определения сбраживающей способности по образованию кислоты и газа и, при необходимости, пересева культуральной жидкости на поверхность плотных специальных агаризованных сред для подтверждения принадлежности по культуральным и биохимическим признакам выделенных колоний к колиформным бактериям.

4.2.2. Проведение анализа.

Для посева используют то количество продукта, подготовленного по п. 3.3.3, в котором предусматривается отсутствие БГКП (табл. 2). Посев производят в среду Кесслер с лактозой (п. 6.3.2.5) (с поплавками) в соотношении разведения и среды 1 : 10.

Пробирки или колбы с посевами помещают в термостат при температуре (36 ± 1) °С на 24—48 ч, после этого посевы просматри-

вают и при отсутствии признаков роста – газообразования или помутнения среды – дают заключение об отсутствии БГКП (колиформ) в исследуемой массе изделия.

Из пробирок или колб со средой Кесслер, в которых обнаружено газообразование или помутнение, производят пересев на среду Эндо или Левина (п. 6.3.2.6). Посев производят петлей по поверхности хорошо подсушенной среды штрихами для получения изолированных колоний. Чашки с посевами помещают крышками вниз в термостат с температурой (36 ± 1) °С на 18—24 ч.

При отсутствии на среде Эндо или Левина колоний, типичных для бактерий группы кишечных палочек (на среде Эндо – красных и темно-красных с металлическим блеском или без него, розовых или бледно-розовых; на среде Левина – черных с металлическим блеском, темных с черным центром, сиреневых с темным центром), дают заключение об отсутствии БГКП в исследуемом количестве изделия и соответствии его нормативу на бактерии группы кишечных палочек (*колиформные бактерии*).

При наличии на среде Эндо или Левина колоний, характерных для кишечных палочек, из них готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.

Наличие в мазках-препаратах грамотрицательных, не содержащих спор палочек, указывает на присутствие бактерий группы кишечных палочек в анализируемой массе изделия и несоответствие его микробиологическому нормативу.

При выявлении на среде Эндо мелких бесцветных колоний, подозрительных на наличие возбудителей кишечных инфекций, колонии снимают и изучают на принадлежность к патогенным микроорганизмам семейства кишечных (п. 4.3), а в случае подтверждения извещают территориальное учреждение госсанэпиднадзора и при необходимости передают туда для дальнейшей идентификации.

4.3. Определение бактерий рода Salmonella

Сальмонеллы – обширный род семейства энтеробактерий, включающий более 2 000 сероваров, большинство которых обладает патогенными свойствами. Сальмонеллы – факультативно-анаэроб-ные грамотрицательные, в основном подвижные палочки или неподвижные (S. pullorum, S. gallinarum и др.), хорошо растущие на обычных питательных средах и разнообразных пищевых субстратах.

При исследовании образцов на наличие сальмонелл руководствуются ГОСТ Р 50480—93 с учетом нижеизложенных методических рекомендаций.

4.3.1. Сущность метода.

Метод основан на высеве определенной массы (количества) продукта, в которой нормируется отсутствие патогенных микроорганизмов, в жидкую неселективную среду, инкубировании посевов, последующем накоплении бактерий в жидких селективных средах, выявлении бактерий, образующих типичные колонии на агаризованных дифференциально-диагностических средах, имеющих типичные для бактерий рода Salmonella биохимические и серологические характеристики.

4.3.2. Проведение анализа.

Навеску изделия (25 г), соответствующую указанному в табл. 2 нормативу на сальмонеллы, приготовленную по п. 3.3.1, засевают в колбу с пептонным буферным раствором (п. 6.3.2.8) в соотношении 1 : 9 для предварительного неселективного обогащения. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

После этого производят пересев культуры из пептонного буферного раствора в две среды для селективного обогащения. Для этого 10 $см^3$ культуральной жидкости переносят в 100 $см^3$ магниевой среды, приготовленной по п. 6.3.2.11, и в 100 $см^3$ тетратионатной среды, приготовленной по п. 6.3.2.10 или по 10 $см^3$ культуры переносят в 100 $см^3$ селенитовой среды (п. 6.3.2.13) и в 100 $см^3$ тетратионатной среды.

Посевы инкубируют 24 ч на магниевой и селенитовой средах при температуре (36 ± 1) °С, а на тетратионатной среде при температуре (43 ± 1) °С.

Через 24 ч инкубирования культуры пересевают на три агаризованные среды: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева и среду Эндо (взамен Эндо можно использовать среду Левина).

Допускается использование одной чашки каждой из сред для одновременного высева с двух селективных сред.

Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

После 24 ч инкубирования посевов проводят предварительный учет результатов, а после 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевов на дифференциально-диагностических средах отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода Salmonella:

- на висмут-сульфит агаре – колонии черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментированием среды под колонией;
- на среде Плоскирева – колонии бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо;
- на среде Эндо – колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные;
- на среде Левина – колонии прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

При отсутствии в посевах на дифференциально-диагностических средах характерных для бактерий рода Salmonella колоний дают заключение об отсутствии бактерий рода Salmonella в анализируемой навеске продукта.

При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде характерных для бактерий рода Salmonella колоний проводят их дальнейшее изучение.

4.3.3. Биохимическое подтверждение принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода Salmonella.

Не менее трех характерных колоний с каждой дифференциально-диагностической среды (а в случае наличия 1—2 типичных колоний – каждую из них) пересевают на скошенную поверхность мясопептонного агара или среды из сухого питательного агара, приготовленные по п. 6.3.2.4 или п. 6.3.2.5. Часть колоний пересевают штрихом по поверхности и уколом в столбик трехсахарного агара, приготовленного по п. 6.3.2.13.

Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Из отобранных по п. 4.3.3 для биохимического подтверждения колоний приготовляют мазки и окрашивают по Граму (по ГОСТ 10444.1).

Бактерии рода Salmonella являются бесспоровыми грамотрицательными палочками с закругленными концами.

После инкубации посевов, как указано в п. 4.3.3, проводят учет результатов ферментации лактозы, глюкозы и сахарозы на трехсахарном агаре:

- пожелтение скошенной части среды указывает на ферментацию лактозы или сахарозы или обоих сахаров (пожелтение столбика среды с разрывом агара или пузырьками газа ука-

зывает на ферментацию глюкозы с образованием кислоты и газа, пожелтение столбика среды без разрывов или пузырьков газа указывает на ферментацию глюкозы до кислоты без образования газа);

- почернение среды в столбике указывает на образование сероводорода.

Типичными для бактерий рода Salmonella являются культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, образующие сероводород.

Дальнейшему изучению подвергаются также лактозоположительные бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

У культур, отобранных согласно п. 4.3.3 и пересеянных на поверхность мясо-пептонного агара или среды, приготовленной из сухого питательного агара, изучают следующие биохимические и физиологические признаки: расщепление мочевины, образование ацетоина и индола, ферментацию лизина, сахарозы, маннита, салицина и подвижность.

4.3.3.1. *Определение расщепления мочевины.*

Культуры пересевают штрихом на поверхность агара Кристенсена с мочевиной (п. 6.3.2.23). Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

При положительной реакции – расщепление мочевины – цвет среды от розового до светло-вишневого. Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования.

Бактерии рода Salmonella не расщепляют мочевину.

4.3.3.2. Изучение ферментации маннита и сахарозы.

Культуры пересевают в среды Гисса с маннитом и сахарозой.

Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Бактерии рода Salmonella не сбраживают сахарозу, но сбраживают маннит. При сбраживании маннита цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

4.3.3.3. Определение образования индола.

При исследовании на индол из подозрительной колонии микроорганизмы высевают в пробирки с 1 %-ной пептонной водой или среду на индол с триптофаном по п. 6.3.2.7 и термостатируют при (36 ± 1) °С 24 ч. Затем в пробирку с суточной культурой по стенке

добавляют 5—10 капель реактива Эрлиха (п. 6.3.1.5). При наличии индола не позднее чем через 5 мин в пограничном слое образуется ярко-красное кольцо, при отсутствии – кольцо остается светло-желтого цвета.

Для определения индолообразования пользуются также реактивом Ковача (п. 6.3.1.6). К суточной культуре добавляют 0,2—0,3 $см^3$ реактива и взбалтывают. Результаты учитывают через 10 мин: реактив поднимается на поверхность среды и при наличии индола окрашивается в темно-красный цвет.

Бактерии рода Salmonella индола не образуют.

4.3.3.4. Определение образования ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра).

Культуры пересевают в мясопептонный бульон с глюкозой (п. 6.3.2.4). Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубирования к 1 $см^3$ культуральной жидкости добавляют 0,6 $см^3$ раствора альфа-нафтола (п. 6.3.1.3) и 0,2 $см^3$ раствора гидроокиси калия (400 $г/дм^3$). После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление ярко-красного окрашивания не позднее чем через 15 мин указывает на положительную реакцию образования ацетоина.

4.3.3.5. Определение подвижности.

Культуры пересевают уколом в полужидкий мясопептонный агар.

Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. При росте подвижных культур отмечается диффузный рост по всему столбику агара, при росте неподвижных культур – вдоль места укола.

Большинство штаммов бактерий рода Salmonella подвижны.

4.3.3.6. Определение декарбоксилирования лизина.

Культуру высевают на поверхность жидкой лизиновой среды для декарбоксилирования (п. 6.3.2.21). Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. Появление темно-красной или фиолетовой окраски – положительная реакция, желтая окраска среды – отрицательная реакция.

Бактерии рода Salmonella дают положительную реакцию.

4.3.3.7. Определение способности ферментировать салицин.

Исследуемую культуру пересевают в полужидкую среду по п. 6.3.2.25. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. О ферментации салицина судят по изменению цвета среды, с образованием или без образования газа. Бактерии рода Salmonella (за исключением IV группы) салицин не ферментируют.

Допускается для биохимического подтверждения принадлежности выделенных культур к бактериям рода Salmonella, вместо классических методов, описанных в п. 4.3.3, использовать коммерческие наборы для идентификации микроорганизмов, зарегистрированные и сертифицированные в системе государственного санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации.

4.3.3.8. Использование системы мультимикротестов (ММТ Е1 и ММТ Е2) для биохимической идентификации энтеробактерий.

ММТ Е1 и ММТ Е2 – системы одноразового использования для идентификации микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae.

ММТ Е1 позволяет определить 12 ключевых ферментативных свойств энтеробактерий: образование сероводорода, индола, наличие лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, уреазы, фенилаланиндезаминазы, утилизацию цитрата натрия (модификация цветной реакции Симмонса), малоната натрия, маннита, сахарозы, лактозы, сорбита.

ММТ Е2 позволяет определить 12 дополнительных биохимических свойств, которые в сочетании с 12 ключевыми свойствами, определяемыми ММТ Е1, служат для видовой идентификации энтеробактерий: наличие аргининдегидролазы, бета-галактозидазы, нитратредуктазы, утилизацию инозита, дульцита, арабинозы, рамнозы, мальтозы, адонита, рафинозы, салицина, глюкозы.

Системы ММТ Е1 и ММТ Е2 представляют собой прозрачные полистироловые 96-луночные или 48-луночные планшеты, в лунки которых помещены соответствующие субстратно-индикаторные среды, стабилизированные поливиниловым спиртом и стерилизованные ультрафиолетовым излучением.

Исследуемые культуры предварительно выращивают на питательном агаре или на средах для первичной дифференциации (среда Клиглера, Олькеницкого) в течение 12—18 ч при температуре (36 ± 1) °С, затем приготавливают из них суспензию.

Исследования бактериальных культур проводят согласно инструкциям, прилагаемым к указанным системам. Учет результатов проводят визуально с помощью приложенной к системам таблицы через 18—24 ч инкубации.

Идентификацию проводят с помощью таблицы «Биохимическая характеристика энтеробактерий» с учетом данных по характеру роста, микроскопии, источников изоляции и др., или с помощью компьютерной программы «IDENT», разработанной НПО «Аллерген».

Результаты полученных биохимических реакций сравнивают с данными табл. 1.

Типичными для бактерий рода Salmonella являются подвижные культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не образующие индол и ацетоин, образующие сероводород.

Однако установлено, что при определенных условиях сальмонеллы могут приобретать признак сбраживания лактозы. Вопрос о принадлежности таких штаммов к бактериям рода Salmonella решается по совокупности результатов серологических и биохимических тестов.

Если ни одна из выделенных культур не показывает типичных для бактерий рода Salmonella биохимических реакций, то дают заключение об отсутствии сальмонелл в исследуемой массе изделия.

С культурами, давшими типичные биохимические реакции согласно табл. 1, проводят дальнейшее изучение с постановкой серологических реакций.

Также серологическому исследованию подлежат лактозоположительные или типичные (не более чем по одному из других перечисленных выше биохимических признаков, исключая индол и ацетоин) штаммы бактерий, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, которые по компл ккс у основных биохимических тестов могут расцениваться как подозрительные на принадлежность роду Salmonella.

4.3.4. Серологические исследования.

Серологическое исследование проводят из пробирок с суточными культурами, предварительно пересеянными на поверхность скошенного мясопептонного агара или среды, приготовленной из сухого питательного агара.

Таблица 1

Наименование биохимических характеристик	Salmonella I	Salmonella II	Salmonella III-Arizona	Salmonella IY	Salmonella cholerae suis	Salmonella gallinarum	Salmonella paratyphi A	Salmonella pullorum	Salmonella typhi
Образование индола	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Образование ацетоина	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Образование H_2S на трехсахарном агаре	+	+	+	+	(–)	+	–	+	+
Декарбоксилирование лизина	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Ферментация салицина	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Расщепление мочевины	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Подвижность	+	+	+	+	+	–	+	–	+
Сбраживание глюкозы с образованием газа	+	+	+	+	+	–	+	(+)	–
Сбраживание глюкозы с образованием кислоты	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сбраживание лактозы	–	–	(–)	–	–	–	–	–	–
Сбраживание сахарозы	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сбраживание маннита	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Условные обозначения: «+» – 90—100 % штаммов положительны; «(+)» – 76—89 % штаммов положительны; «(–)» – 26—75 % штаммов положительны; «–» – 0—10 % штаммов положительны.

Для этого петлей берут небольшое количество культуры и пробирок, помещают на предметное стекло и добавляют каплю по ливалентной адсорбированной сальмонеллезной диагностическо О-сыворотки; осторожно покачивают предметное стекло для полу чения однородной суспензии культуры.

Положительная реакция на сальмонеллы (агглютинация) на блюдается в течение 30—60 с и проявляется в виде склеивания бак териальной массы и полного или частичного просветления жидко сти. При отрицательной реакции агглютинации культура в капл сыворотки сохраняется в виде гомогенной смеси.

Обязательна постановка отрицательной реакции (куль тура + физиологический раствор) для выявления способности к са моагглютинации. Штаммы бактерий, обладающие самоагглютина цией, не подвергают дальнейшему серологическому тестированию.

По показаниям и при необходимости для полной типизации самьмонелл по схеме Кауфмана-Уайта проводят постановку реак ций агглютинации не только с О-, но и с Н-сыворотками (наставле ние по применению агглютинирующих диагностических сальмонел лезных О- и Н-сывороток).

4.3.4.1. Оценка результатов.

Выделенную культуру относят к бактериям рода Salmonella, если она показывает типичные биохимические и серологические реакции.

Предположительно относят к бактериям рода Salmonella:

- культуры, у которых не обнаружено самоагглютинации и О-антигенов, но показавших типичные биохимические ре акции;
- культуры, у которых обнаружена самоагглютинация, и по казавших типичные биохимические реакции;
- культуры, у которых обнаружена самоагглютинация, и по казавших типичные биохимические реакции;
- культуры, у которых обнаружены не все типичные биохими ческие реакции, но дающие положительную серологическую реакцию с одной из сывороток групп А, В, С, D, Е.

В этих случаях констатируется присутствие бактерий рода Salmonella в засеянной массе изделия и несоответствие его микро биологическому нормативу.

Культуры, у которых не обнаружено самоагглютинации и не показавших типичные биохимические и серологические реакции, не относят к бактериям рода Salmonella, а продукты, из которых они

были выделены, считают соответствующими микробиологическому нормативу по этому показателю.

4.4. Определение коагулазоположительных стафилококков (Staphylococcus aureus)

S. aureus – факультативно-анаэробные грамположительные сферические микроорганизмы, обладающие ферментами: коагулазой, термостабильной ДНК-азой, кислой фосфатазой, сбраживающие маннит в анаэробных условиях, определенная часть которых способна продуцировать энтеротоксины.

Исследования на наличие в образце коагулазоположительных стафилококков проводят в соответствии с ГОСТ 10444.2—94 с учетом нижеизложенных рекомендаций.

4.4.1. Сущность метода.

Метод основан на способности микроорганизмов рода Staphylococcus расти на питательных средах с повышенным содержанием хлорида натрия. Наибольшее санитарно-гигиеническое значение имеет S. aureus (золотистый стафилококк), принадлежность к которому, в основном, определяется по способности коагулировать цитратную плазму крови человека или кролика и вырабатывать фермент лецитиназу (фосфолипазу С).

4.4.2. Проведение анализа.

Для посева используют количество средней пробы продукта, подготовленной по п. 3.3.3, в котором предусматривается отсутствие S. aureus (табл. 2). Посевы производят в солевой бульон с 6,5 % хлористого натрия (п. 6.3.2.16). Соотношение засеваемого материала и питательной среды должно составлять 1 : 10. Посевы термостатируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. Затем со среды накопления делают пересев петлей на подсушенные среды типа Байрд-Паркер (п. 6.3.2.17) или ЖСА (желточно-солевой агар) (п. 6.3.2.19) для получения изолированных колоний. Посевы помещают в термостат при температуре (36 ± 1) °С на 18—24 ч.

На поверхности среды типа Байрд-Паркера S. aureus растут в виде черных, блестящих, слегка выпуклых колоний диаметром 1—1,5—2 мм, окруженных зоной просветления среды шириной 1—3 мм (лецитиназная реакция).

На ЖСА колонии S. aureus имеют форму выпуклых дисков диаметром 2—4 мм белого, желтого, кремового, лимонного, золотистого цвета с ровными краями, вокруг колоний образуется радужное кольцо и зона помутнения среды.

При отсутствии типичных колоний на каждой из сред дают заключение об отсутствии золотистых стафилококков в исследуемом количестве продукта и соответствии его нормативу на S. aureus.

При обнаружении на средах типа Байрд-Паркер или ЖСА подозрительных колоний – их микроскопируют. При наличии в мазках гроздьевидных грамположительных мелких кокков из отобранных колоний (не менее трех колоний каждого вида) делают пересев на сектора чашек Петри или в пробирки со скошенным МПА (п. 6.3.2.2), посевы выдерживают в термостате при (36 ± 1) °С в течение 16—24 ч. Из культур, выросших на МПА, после предварительной проверки мазка на чистоту под микроскопом, ставят реакцию плазмокоагуляции.

4.4.2.1. Постановка реакции плазмокоагуляции.

В пробирку с 0,5 $см^3$ разведенной кроличьей плазмы (п. 6.3.2.18) вносят петлю изучаемой суточной агаровой культуры. Параллельно ставят контроль: одну пробирку с плазмой оставляют незасеянной, а в другую засевают заведомо коагулазоположительный стафилококк. Все пробирки помещают в термостат при температуре (36 ± 1) °С. Учитывают результаты через 1—2—4 ч и оставляют до утра при комнатной температуре для окончательного учета. Ускорение реакции производят за счет использования 3- и 4-часовых бульонных культур стафилококков, добавляя их по 0,1 $см^3$ в 0,5 $см^3$ разведенной цитратной плазмы. Пробирки на свертывание плазмы следует просматривать осторожно, чтобы не разрушить образовавшийся сгусток. При учете реакции плазмокоагуляции могут наблюдаться три степени активности фермента коагулазы:

++++ – сгусток плотный;

+++ – сгусток, имеющий небольшой отсек;

++ – сгусток в виде взвешенного мешочка.

Все три варианта являются положительными результатами, которые свидетельствуют о присутствии коагулазоположительных стафилококков в засеянной массе изделия и несоответствии его микробиологическому нормативу. Отрицательная реакция плазмокоагуляции свидетельствует об отсутствии S. aureus в данной массе продукта.

4.5. Определение дрожжей и плесневых грибов

4.5.1 Сущность метода.

Метод основан на высеве разведений определенного количества продукта в селективную среду, культивировании посевов при (24 ± 1) °С в течение 120 ч, подсчете всех видимых колоний плесневых грибов и дрожжей, типичных по макро- и микроскопической морфологии и пересчете их количеств на 1 г продукта.

При определении количества дрожжей и плесневых грибов необходимо руководствоваться ГОСТ 10444.12—88 с учетом приведенных ниже рекомендаций.

4.5.2 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.

По 1 $см^3$ каждого разведения образца, приготовленного по п. 3.3, вносят в 2 чашки Петри (параллельное определение). Затем не позже чем через 20 мин, вносят в чашку питательную среду (п. п. 6.3.2.20—6.3.2.22), расплавленную на водяной бане и остуженную до 45 °С, осторожно и равномерно перемешивают содержимое чашки. Высота слоя питательной среды должна быть не менее 4—5 мм. Параллельно с этим заливают одну чашку Петри 15—20 $см^3$ среды для проверки ее стерильности.

После застывания среды чашки переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при (24 ± 1) °С на 5 суток. Через 3 суток допускается предварительный учет типичных колоний.

Если в посевах на агаризованных средах присутствуют мукоровые, очень быстро растущие грибы, то учет предварительных результатов необходимо проводить очень осторожно, не допуская того, чтобы споры этих грибов осыпались и дали рост вторичных колоний. На пятые сутки проводят окончательный учет результатов посевов. Колонии дрожжей и плесневых грибов различают визуально.

Рост дрожжей сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих и без блеска, серовато-белых, розоватых, кремовых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

Развитие плесневых грибов на питательных средах сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Для количественного подсчета отбирают те чашки, на которых выросло 15—150 колоний дрожжей и (или) 5—50 колоний плесневых грибов.

5. Микробиологические нормативы для кондитерских изделий с кремом

В табл. 2 отражены микробиологические нормативы для кондитерских изделий с кремом, изготовленных по традиционным технологиям (ОСТ 10—060—95) и имеющих, согласно СанПиН 42—123—4117—86 «Условия и сроки хранения особо скоропортящихся продуктов», срок реализации от 6 до 72 ч при хранении от 2 до 6 °С. Эти нормативы соответствуют СаПиН 2.3.2.560—96 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов».

В табл. 3 отражены рекомендуемые микробиологические нормативы для кондитерских изделий с кремом, изготовленных по усовершенствованным технологиям в целях пролонгирования сроков годности. Указанные технологии включают усиленный входной микробиологический контроль пищевого сырья и компонентов; применение ингредиентов только высшего качества (например, яичного порошка, поступающего по импорту, масла сливочного с содержанием влаги не более 16 % и соответствующего по микробиологическим показателям маслу вологодскому); в качестве консервантов – пищевых добавок с антимикробным действием; а также специальных технологических приемов для снижения бактериальной контаминации (например, белок куриного яйца заливают горячим сиропом (80 °С) и т. д. Применение этих приемов позволяет получить продукцию более чистую в микробиологическом отношении, стабильную в хранении и безопасную для потребителей в течение всего пролонгированного срока. Для такой продукции на основании специальных исследований, проведенных в Институте РАМН и других аккредитованных в системе госсанэпиднадзора РФ испытательных лабораториях, были введены пролонгированные сроки годности (до 5—7 сут.) и усовершенствованы микробиологические нормативы.

В табл. 4 отражены рекомендуемые микробиологические показатели для кондитерских изделий с кремом, изготовленных по новым технологиям с использованием специальных растительных жиров и их композиций, содержащих насыщенные жирные кислоты, для приготовления отделочных полуфабрикатов типа «сливок».

В одних случаях используют взбитые «сливки» на основе только специальных растительных жиров; в других случаях белковая масса начинки производится завариванием белка куриных яиц при температуре (70—90) °С, и в сбивную начинку растительного жира со сгущенным молоком добавляют спирт.

Таблица 2

Микробиологические нормативы для готовых изделий с кремом

Наименование	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечания
		БГКП (колиформы)	S. aureus	патогенные, в т. ч. сальмонеллы			
1	2	3	4	5	6	7	8
Торты, пирожные и рулеты бисквитные, песочные, заварные, слоеные, воздушные, крошковые с отделкой:							* при использовании маргарина
• сливочным кремом	5×10^4	0,01	0,01	25	100*	50*	**при использовании орехов
• белково-сбивной, типа суфле	1×10^4	0,01	0,01	25	50	100	100 КОЕ/г
• фруктово-ягодной, повидлом	1×10^4	0,01	0,1	25	50	50**	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
• заварным кремом	1×10^4	0,01	1,0	25	10	10**	
• творожно-сливочной начинкой	5×10^4	0,01	0,1	25	–	–	
• глазурью, помадкой, шоколадом	1×10^4	0,01	0,1	25	50	100	
• орехом, марципаном, пралине	1×10^4	1,0	1,0	25	50	100	
• комбинированной	5×10^4	0,01	0,01	25	100	100	
Торты, пирожные и рулеты бисквитные, песочные, заварные, слоеные, воздушные, крошковые без отделки	1×10^3	0,1	0,1	25	50	50	

Таблица 3

Микробиологические нормативы для готовых кондитерских изделий с кремом, изготовленных по усовершенствованной технологии, со сроками годности – 5—7 суток при (4 ± 2) °С

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г не более	Масса продукта (г), в которой не допускается			Дрожжи, КОЕ/г не более	Плесени, КОЕ/г не более
		БГКП (колиформные)	S. aureus	Патогенные, в т. ч. сальмонеллы		
Торты и пирожные бисквитно-кремовые с:						
• шоколадной глазурью	1×10^4	0,1	0,1	25	100	50
• суфле	1×10^4	0,1	0,1	25	100	50
• желе и цукатами	1×10^4	0,1	0,1	25	100	50
• сбивной начинкой (заварные)	1×10^4	0,1	0,1	25	100	50

Таблица 4

Микробиологические нормативы для готовых изделий с кремом, изготовленных с использованием специальных растительных жиров и жировых композиций, содержащих насыщенные жирные кислоты со сроками годности 16—30 суток

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г продукта	Масса продукта (г), в которой не допускается			Дрожжи, КОЕ/г не более	Плесени, КОЕ/г не более
		БГКП (колиформные)	S. aureus	Патогенные, в т. ч. сальмонеллы		
Торты и пирожные бисквитные, заварные, слоеные со взбитыми "сливками" на основе растительных жиров	1×10^4	0,1	0,1	25	50	50
С комбинированными отделками на основе растительных жиров и добавлением компонентов, либо применение приемов, снижающих обсеменение (спирт, термообработка)	5×10^3	1,0	1,0	25	50	50

Такая продукция имеет более жесткие микробиологические показатели; сроки годности изделий, вырабатываемых по усовершенствованным технологиям и с использованием новых видов жиров, добавок и т. п., устанавливаются на основе проведения обязательных комплексных санитарно-химических и санитарно-микробиологических испытаний каждого конкретного вида продукта в соответствии с требованиями МУК 4.2.2.727—99 «Гигиеническая оценка сроков годности пищевых продуктов». Указанные нормативы и сроки годности включаются в нормативную документацию на эти виды изделий (технические условия) в установленном порядке.

6. Материалы, реактивы и питательные среды

6.1. Перечень средств измерений, оборудования, инвентаря, лабораторной посуды, материалов, реактивов и питательных сред, необходимых для проведения микробиологических анализов, полностью приведен в ГОСТ 27543—87 «Изделия кондитерские. Аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды для микробиологических анализов».

6.2. Сухие питательные среды для микробиологических анализов промышленного производства, сертифицированные в системе ГСЭН РФ или имеющие НД, согласованные в установленном порядке с Минздравом РФ:

- среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – КМАФАнМ;
- питательный агар (аналог МПА и агара Хоттингера);
- питательный бульон (аналог МПБ и бульона Хоттингера);
- среда Кесслер;
- среда Эндо;
- среда Левина;
- магниевая среда;
- среда Плоскирева;
- висмут-сульфит агар;
- селенитовый бульон;
- среда Олькеницкого;
- среда Ресселя;
- среда Гисса с глюкозой;
- среда Гисса с лактозой;
- среда Гисса с сахарозой;
- среда Гисса с маннитом;

- среда Гисса с мальтозой;
- среда Гисса с сорбитом;
- среда Сабуро;
- Байрд-Паркера агар;
- агар солевой;
- бульон солевой;
- сухая цитратная кроличья плазма.

6.3. Приготовление растворов, реактивов, питательных сред.

6.3.1. Приготовление растворов и реактивов.

6.3.1.1. Водный раствор пептона (0,1 %-ный) – пептонная вода.

К 1 000 $см^3$ дистиллированной воды добавляют 1 г пептона. После размешивания раствор кипятят, фильтруют и разливают в пробирки, колбы и флаконы в необходимых количествах. Стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин. Раствор хранят в условиях, исключающих испарение влаги и нарушение асептики.

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

Для приготовления изотонического раствора с pH 6,9—7,0 используют дистиллированную воду, pH которой проверяют индикатором бромтимолблау. При его добавлении цвет воды должен быть бутылочно-зеленым. В иных случаях воду не используют.

В 1 000 $см^3$ воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, разливают раствор в пробирки, колбы и флаконы в необходимых количествах и стерилизуют в течение 20 мин при 121 °С. Раствор хранят в условиях, исключающих испарение влаги и нарушение асептики.

6.3.1.3. 5 %-ный раствор α-нафтола.

Взвешивают 5,0 г α-нафтола, растворяют в 100 $см^3$ 96 %-ного этилового спирта. Хранят раствор при температуре (4 ± 1) °С.

6.3.1.4. Реактивы для окраски по Граму (модификация Г. П. Калины).

Реактив 1

К 1 000 $см^3$ этилового спирта добавляют 0,5 г кристаллического фиолетового.

Реактив 2

К 96 $см^3$ 0,5 %-ного спиртового раствора йодистого калия добавляют 2 $см^3$ 5 %-ного спиртового раствора основного фуксина и 2 $см^3$ 5 %-ного спиртового раствора йода.

Примечание. Растворение йодистого калия в спирте рекомендуется проводить в водяной бане при температуре 45—50 °С при постоянном помешивании.

6.3.1.5. Реактив на индол (Эрлиха).

Взвешивают 5,0 г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 $см^3$, помещают в коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ и растворяют в 50 $см^3$ этилового спирта. С помощью мерного цилиндра вместимостью 100 $см^3$ медленно добавляют 50 $см^3$ концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С.

6.3.1.6 Реактив на индол (Ковача).

Взвешивают 5,0 г пара-диметиламинобензальдегида в стеклянном стакане вместимостью 100 $см^3$, помещают в коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ и растворяют в 75 $см^3$ изобутилового спирта. С помощью мерного цилиндра вместимостью 100 $см^3$ медленно добавляют 25 $см^3$ концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в колбе с притертой пробкой при температуре 4 °С.

6.3.2. Приготовление питательных сред.

6.3.2.1 Мясопептонный бульон (МПБ).

Говяжье мясо, освобожденное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, взвешивают, складывают в кастрюлю, смешивают с двойным количеством водопроводной воды и оставляют на 12—14 ч при температуре (4—6) °С. Для ускорения процессов экстракции питательных веществ содержимое кастрюли подогревают при 50 °С в течение 1 ч и затем кипятят 30 мин.

После кипячения бульон в горячем состоянии фильтруют через двойной бумажный или ватно-марлевый фильтр, фильтрат измеряют и добавляют к нему водопроводную воду до первоначального объема, а также 1 %-ного пептона и 0,5 %-ной поваренной соли. После установления pH 7,2—7,4 бульон разливают в колбы и стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин. При необходимости бульон перед использованием фильтруют через складчатый фильтр, разливают и повторно стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

6.3.2.2. Мясопептонный агар.

В 1 $дм^3$ мясопептонного бульона добавляют 15—20 г микробиологического агар-агара. После 10—15-минутного набухания агар-агара смесь кипятят при постоянном помешивании до полного его растворения. Полученную среду после установления pH 7,2—7,4 фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают в колбы, флаконы и пробирки и стерилизуют при 121 °С 20 мин.

6.3.2.3. Мясопептонный бульон (агар) с глюкозой.

К 1 дм^3 мясопептонного бульона перед стерилизацией добавляют 1 г или 10 г глюкозы, устанавливают pH 7,0—7,2 и стерилизуют 20 мин при 121 °С.

6.3.2.4. Специальная питательная среда для определения общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов:

питательный агар сухой производства ДагНПО «Питательные среды» или НПЦ «БиоКомпас С» г. Углич	35 г;
экстракт кормовых дрожжей	2,5 г;
глюкоза	1 г;
вода дистиллированная	до 1000 см^3;
pH	7,0;

стерилизация в автоклаве при 121 °С в течение 20 мин.

Среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (общего количества бактерий) также выпускается в сухом виде и готовится согласно прилагаемой прописи.

6.3.2.5. Среда Кесслер (с лактозой).

К 1 000 см^3 водопроводной воды добавляют 10 г пептона и 50 см^3 стерильной бычьей желчи. Смесь кипятят на водяной бане при помешивании 20—30 мин. Затем фильтруют ее через ватно-марлевый фильтр, добавляют 2,5 г лактозы; доводят объем до 1 000 см^3. Устанавливают pH 7,4—7,6, используя 1н растворы NaOH или HCl и проверяя значение pH на pH-метре или универсальной индикаторной бумагой. Добавляют 4 см^3 1 %-ного водного раствора генцианового (кристаллического) фиолетового, разливают в пробирки и колбы в необходимых количествах, закладывают поплавки. Стерилизуют 15 мин при 121 °С.

Возможно использование сухой модифицированной среды Кесслер (п. 6.2).

Подготовку среды для посева и стерилизацию проводят согласно прописи на этикетке.

6.3.2.6. Дифференциально-диагностические среды (сухие):

висмут-сульфит агар (Вильсона-Блера);

среду Эндо;

среду Левина;

среду Плоскирева, выпускаемые в сухом виде, следует готовить согласно прописям, указанным на этикетках. Приготовленные и

разлитые в стерильные чашки Петри среды можно хранить при температуре 4 °С до 10 суток.

6.3.2.7. Среда на индол.

10,0 г сухого панкреатического гидролизата казеина (или 100 $см^3$ жидкого панкреатического гидролизата казеина с содержанием 500 мг % аминного азота), 5,0 г хлористого натрия, 1,0 г DL-триптофана растворяют в 1 000 $см^3$ дистиллированной воды. Доводят pH до 7,0 1н растворами NaOH или HCl и измеряя значение pH на потенциометре или по универсальной индикаторной бумаге, разливают в пробирки по 5 $см^3$, стерилизуют 15 мин при 121 °С.

6.3.2.8. Пептонно-буферный раствор:

калия дигидрофосфат (KH_2PO_4)	0,45 г;
натрия гидрофосфат, безводный (Na_2HPO_4)	5,34 г;
пептонная вода (1 г пептона + 1 000 $см^3$ дистиллированной воды)	1000 $см^3$.

Приготовление: ингредиенты смешивают, разливают в пробирки и флаконы, стерилизуют в автоклаве при 121 °С 30 мин.

6.3.2.9. Среда Мюллера (тетратионатовый бульон Мюллера):

мел, стерилизованный	45 г; или
кальция карбонат ($CaCO_3$), сухой стерильный	25 г;
мясопептонный бульон	900 $см^3$;
раствор Люголя	20 $см^3$;
натрия тиосульфат ($Na_2S_2O_3$ 5 H_2O), 50 %-ный стерильный раствор	100 $см^3$.

Приготовление: в стерильные флаконы помещают по 4,5 г мела, стерилизуют сухим жаром, после чего в каждый флакон наливают по 90 $см^3$ МПБ. Стерилизуют при 121 °С 30 мин (pH 7,2—7,4). Затем асептически добавляют в каждый флакон по 2 $см^3$ раствора Люголя и по 10 $см^3$ раствора натрия тиосульфата, хорошо смешивают и разливают по пробиркам. Готовая среда стерилизации не подлежит.

Приготовление раствора Люголя :

калий йодид (KI)	20 г;
йод кристаллический (I_2)	25 г;
вода дистиллированная	100 $см^3$.

Приготовление 50 %-ного раствора натрия тиосульфата: в мерный цилиндр насыпают 50 г натрия тиосульфата и добавляют воду до 100 $см^3$, растворяют, переливают во флакон, стерилизуют текучим паром 30 мин.

6.3.2.10. Тетратионатная среда (Мюллер-Кауфман):

среда Мюллера (стерильная)	500 $см^3$;
желчь бычья (стерильная)	250 $см^3$;
бриллиантовый зеленый (0,1 %-ный водный раствор)	50 $см^3$.

Приготовление: ингредиенты смешивают, асептически разливают в стерильные пробирки по 10 $см^3$, дополнительно не стерилизуют.

20 %-ный желчный бульон:

бульон мясопептонный (или Хоттингера)	800 $см^3$;
желчь бычья нативная	200 $см^3$.

Приготовление: pH должен быть равен 7,6. Разливают по 50 $см^3$ во флаконы с поплавками. Стерилизуют текучим паром три дня по 30 мин.

6.3.2.11. Магниевая среда.

Среда состоит из трех растворов:

Раствор 1:

пептон	4,2 г;
натрия хлорид (NaCl)	7,15 г;
калия дигидрофосфат (KH_2PO_4)	1,48 г;
дрожжевой диализат	9 $см^3$;
вода дистиллированная	890 $см^3$.

Раствор 2:

магния хлорид ($MgCl_2$)	35 г;
вода дистиллированная	90 $см^3$.

Раствор 3:

Бриллиантовый зеленый 0,5 %-ный водный раствор	0,9 $см^3$.

Приготовление: Все три раствора смешивают в указанных количествах, разливают в необходимых объемах в колбы, флаконы или пробирки, стерилизуют при 121 °С 30 мин.

6.3.2.12. Селенитовый бульон.

Среду готовят из двух основных растворов: А и Б.

Раствор А состоит из 5 г пептона, 7 г безводного двузамещенного фосфорнокислого натрия, 4 г х. ч. лактозы, 100 $см^3$ дистиллированной воды pH 6,9—7,1. Раствор стерилизуют при 121 °С 30 мин.

Раствор Б состоит из 10 %-ного раствора кислого селенитокислого натрия, приготовленного на стерильной воде. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Для приготовления среды в 50 $см^3$ раствора А стерильно добавляют 2 $см^3$ раствора Б. Среду разливают в стерильные пробирки по 5—7 $см^3$, но не стерилизуют, т. к. при этом выпадает осадок красного цвета и среда становится непригодной.

Селенитовая среда выпускается также в сухом виде и готовится по прилагаемой прописи.

6.3.2.13. Комбинированная среда по Олькеницкому:

агар питательный сухой	25 г;
лактоза	10 г;
аммоний-железа (II) сульфат ($FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$)	0,2 г;
натрия тиосульфат ($Na_2S_2O_3 \cdot 3H_2O$)	0,3 г;
мочевина	10 г;
феноловый красный (0,4 %-ный водный раствор)	4 $см^3$;
вода дистиллированная	1000 $см^3$.

Приготовление: соли предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Углеводы и мочевину также растворяют в небольших объемах воды при подогревании на водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют в оставшемся количестве воды при нагревании и помешивании. Затем все ингредиенты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают pH 7,2—7,4, добавляют индикатор и разливают в пробирки по 6—7 $см^3$.

Среду стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 мин и скашивают, оставляя столбик 2—2,5 см. Готовая среда бледно-розового цвета.

Комбинированная среда по Олькеницкому выпускается также в сухом виде и готовится по прилагаемой прописи.

6.3.2.14. Среды для идентификации:

агар Клиглера;

среда Ресселя;

среды Гисса (среды с сахарами) выпускаются в сухом виде. Их приготовление указано на этикетках.

6.3.2.15. Агглютинирующие адсорбированные диагностические сальмонеллезные сыворотки (поливалентные О- и Н групп А, В, С, Д, Е и редких групп).

Необходимые разведения сыворотки готовят перед использованием согласно прилагаемой инструкции.

6.3.2.16. Солевой бульон.

К 100 $см^3$ мясопептонного бульона (МПБ) с pH 7,2—7,4 в колбе вместимостью 200 $см^3$ добавляют 6,5 г хлористого натрия и разли-

вают в пробирки по 10 см³. Стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 20 мин.

6.3.2.17. Агар типа Байрд-Паркер.

30 г сухого питательного агара размешивают в 1 дм³ дистиллированной воды, добавляют 10 г пирувата натрия, 5 г хлористого лития, тщательно перемешивают и кипятят в течение 1 мин до полного растворения ингредиентов. Устанавливают pH 7,2. Разливают по флаконам объемами 100—200—300 см³ в зависимости от потребности и стерилизуют при 121 °С 15 мин. Среда может храниться в течение месяца в условиях холодильника. Перед употреблением в растопленную и охлажденную до (45—50) °С среду с соблюдением правил асептики прибавляют (из расчета на 100 см³ среды) 0,5 см³ 2 %-ного раствора теллурита калия и 5 см³ эмульсии яичного желтка. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри в объеме не менее 20 см³ на чашку. Чашки со средой могут быть использованы в течение 24 ч, максимум 48 ч. Перед посевом чашки со средой подсушивают в термостате общепринятым способом.

6.3.2.18. Цитратная плазма кролика.

Цитратная плазма кролика для реакции плазмокоагуляции выпускается в сухом виде. Готовят непосредственно перед употреблением согласно прописи в прилагаемом наставлении.

6.3.2.19. Желточно-солевой агар (ЖСА).

Основа – солевой агар: к мясопептонному бульону (МПБ) с pH 7,2—7,4 добавляют 2 % агара и 6,5 % хлористого натрия, расплавляют на водяной бане, при необходимости фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают мерным цилиндром по 100 см³ в колбы вместимостью 250 см³ и стерилизуют при 121 °С в течение 30 мин. Получают солевой агар. Вместо МПБ можно использовать сухой питательный агар, добавив к нему 6,5 % хлористого натрия.

ЖСА: на 100 см³ стерильного расплавленного и остуженного до 45 °С солевого агара добавляют 20 см³ эмульсии яичного желтка. После полного размешивания желточно-солевой агар разливают в стерильные чашки Петри по 20—25 см³ и хранят в холодильнике 5—7 дней.

Эмульсия яичного желтка: на дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, которое тщательно протирают ватой, смоченной этиловым спиртом. Стерильным пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 см³. Желток добавляют в колбу с 4-мя объемами стерильного физиологического раствора, затем содержимое тщательно встряхивают до получения гомогенной массы.

6.3.2.20. Среда Сабуро (основа среды).

40 г глюкозы, 10 г пептона, 18 г агара добавляют к 1 дм³ дистиллированной воды. Смесь подогревают, периодически помешивая, до расплавления составных частей, охлаждают до 45—50 °С, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 6,5 ± 0,1, разливают в мерные колбы и стерилизуют при 121 °С 15 мин.

Основу среды хранят при температуре (2—6) °С не более 14 сут.

6.3.2.21. Среда с лизином.

10,0 г L-лизина или L-лизина монохлорида, 5,0 г пептона, 3,0 г дрожжевого экстракта, 1,0 г глюкозы, 0,012 г бромкрезолового пурпурного (или 0,6 см³ 1,6 %-ного спиртового раствора) растворяют в 1 000 см³ кипящей дистиллированной воды, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 6,8 ± 0,1. Среду разливают в узкие бактериологические пробирки по 5 см³ и стерилизуют при 110 °С 30 мин. Среда имеет светло-фиолетовый цвет. Используют в день приготовления.

6.3.2.22. Питательные среды с антибиотиками.

Среда агаризованная с левомицетином.

К 1 дм³ основы (п. 6.3.2.20) добавляют 2 см³ раствора левомицетина сукцината растворимого (для инъекций) массовой концентрацией 50 г/дм³ или 1 см³ раствора массовой концентрацией 100 г/дм³. При использовании левомицетина массовой концентрации 5 г/дм³ к 980 см³ основы добавляют 20 см³ раствора.

Среда агаризованная с окситетрациклином.

К 900 см³ основы добавляют 100 см³ раствора окситетрациклина дигидрата массовой концентрацией 1г/дм³.

Среда агаризованная с окситетрациклином и гентамицином.

К 890 см³ основы добавляют 100 см³ раствора окситетрациклина дигидрата массовой концентрацией 1 г/дм³ и 5 см³ раствора гентамицина массовой концентрацией 10 г/дм³.

Среда агаризованная с антибиотиками группы пенициллина и стрептомицина.

К 1 дм³ основы добавляют 1 или 0,5 см³ раствора антибиотика группы пенициллина, содержащего соответственно 50 000 или 100 000 ЕД, затем к среде добавляют 0,4 см³ раствора антибиотика группы стрептомицина массовой концентрацией 100 г/дм³.

Среда агаризованная с неомицином сульфатом.

К 1 дм³ основы добавляют 7 см³ раствора неомицина сульфата массовой концентрацией 50 г/дм³.

При использовании раствора неомицина сульфата массовой концентрацией 10 г/дм³ к 965 см³ основы добавляют 35 см³ раствора.

6.3.2.23. Солодовое агаризованное сусло.

Солодовое сусло готовят по ГОСТ 10444.1—84.

В 1 л водопроводной воды с температурой 50 °С вносят 250 г ячменного неферментированного солода, перемешивают и ставят на водяную баню. В течение 30 мин поддерживают температуру смеси 45 °С. Затем температуру затора медленно (не быстрее, чем на 1 °С в мин) доводят до 63 °С и эту температуру поддерживают до конца осахаривания (в течение 2 ч). Осахаренный затор фильтруют через сито, отжимают и после остывания устанавливают плотность сусла по сахарометру 3 Б или 6 Б. Сусло разливают в колбы, добавляют 2 % агара и стерилизуют в автоклаве при 112 °С в течение 30 мин. Допускается использование готового неохмеленнного пивного сусла.

Для определения дрожжей и грибов в продуктах, сильно обсемененных микроорганизмами, сусло при приготовлении подкисляют стерильным раствором лимонной кислоты массовой концентрацией 200 г/дм^3 или стерильным раствором молочной кислоты с объемной долей молочной кислоты 40 % до pH 3,6 ± 0,1, при этом при приготовлении среды увеличивают количество агара до 30 г/дм^3.

6.3.2.24. Питательный полужидкий агар.

3,0 г мясного экстракта, 5,0 г пептона, 4—8 г агара растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 7,0 ± 0,1. Среду разливают в пробирки по 5—7 см^3 и стерилизуют при 121 °С 20 мин.

6.3.2.25. Среда с салицином.

10,0 г пептона, 5,0 г натрия хлорида, 10 мл индикатора Андреде*, 2—4 г агара растворяют в 1 000 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH 7,1—7,2 и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин; к стерильной основе добавляют салицин в количестве 0,5 % (5 г на 1000 см^3 основы среды) растворяют и разливают в стерильные пробирки по 3—4 см^3 и стерилизуют при 110 °С в течение 30 мин (или дробной стерилизацией текучим паром два дня по 30 мин).

---

* В качестве индикатора pH могут также быть использованы растворы бромтимолового синего, фенолового красного или бромкрезолового пурпурного.

Список литературы

1. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.560—96. —М., 1996.
2. Методические указания по проведению санитарно-бактериологических исследований на предприятиях, вырабатывающих кондитерские кремовые изделия.—М., 1975.
3. Рецептуры на торты, пирожные, кексы и рулеты.— Ч. I, II, III. —М., 1977.
4. Технологические инструкции по производству мучных кондитерских изделий.—М., 1992.
5. ГОСТ 5904—82. Изделия кондитерские. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб.
6. ГОСТ 10444.1—84. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе.
7. ГОСТ 10444.2—94. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества Staphylococcus aureus.
8. ГОСТ 10444.12—88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.
9. ГОСТ 10444.15—94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
10. ГОСТ 26668—85. Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов
11. ГОСТ 26669—85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.
12. ГОСТ 26670—91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.
13. ГОСТ 27543—87. Изделия кондитерские. Аппаратура, материалы, реактивы и питательные среды микробиологических анализов.
14. ГОСТ Р 50474—93. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий).
15. ГОСТ Р 50480—93. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella.

gost.e-ecolog.ru