ГОСТ 10444.12—88

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:543.06:006.354 Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод определения дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10444.12—88

Food products.
Method for determination of yeast and mould

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Дата введения 01.01.90

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод определения в них дрожжей и плесневых грибов.

Метод основан на высеве продукта или гомогената продукта и (или) их разведений в питательные среды, определении принадлежности выделенных микроорганизмов к плесневым грибам и дрожжам по характерному росту на питательных средах и по морфологии клеток.

Допускается использование хромогенных сред для предварительного выявления дрожжей и плесневых грибов в масложировой продукции.

Метод предназначен для:

установления соответствия микробиологических показателей качества пищевого продукта требованиям нормативно-технической документации;

установления промышленной стерильности консервов;

выяснения причин возникновения дефектов продуктов.

(Поправка)*.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Отбор проб пищевых продуктов по ГОСТ 26668, ГОСТ 26809 и ГОСТ 9225**.

1.2. Подготовка проб пищевых продуктов к испытанию по ГОСТ 26669, ГОСТ 9225.

Консервы проверяют на герметичность по ГОСТ 8756.18.

Полные консервы, нормальные по внешнему виду, перед испытанием термостатируют при 30 — 37 °С в таре вместимостью до 1 $дм^3$ включительно не менее 5 сут, в таре вместимостью свыше 1 $дм^3$ — не менее 7 сут.

Пищевые продукты, в которых нормируется допустимое количество дрожжей и плесневых грибов, термостатированию не подлежат.

Масса (объем) навески, предназначенной для приготовления гомогената продукта или исходного разведения — не менее (10,0±0,1) г ($см^3$).

Исходные разведения продуктов с массовой долей NaCl более 5% готовят с использованием пептонной воды; исходные разведения мясных продуктов готовят с использованием физиологического раствора. Для приготовления последующих десятикратных разведений используют пептонно-солевой раствор. Пептонную воду и пептонно-солевой раствор готовят по ГОСТ 26669, физиологический раствор — по ГОСТ 10444.1.

Из пробы пищевого продукта, в котором нормируется количество дрожжей и (или) плесневых грибов, или из исходного разведения пищевого продукта готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством дрожжей и (или) плесневых грибов, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта.

* Действует только на территории Российской Федерации.

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53430—2009.

Издание официальное ★ Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1988
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

2.1. Для проведения испытаний применяют аппаратуру, материалы, реактивы по ГОСТ 10444.1, а также аппаратуру, материалы и реактивы, указанные ниже:

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104*, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и поверочной ценой деления не более 2 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104*, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и поверочной ценой деления не более 20 мг (для взвешивания продукта);

термостат, позволяющий поддерживать температуру (24±1) °С;

микроскоп световой биологический или других аналогичных марок;

масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739;

стекла предметные по ГОСТ 9284;

стекла покровные по ГОСТ 6672;

вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;

агар сывороточный БФ;

бромфеноловый синий, водорастворимый, индикатор;

гентамицина сульфат во флаконах по 0,08 г или в ампулах по 1 или 2 $см^3$ водный раствор массовой долей 4%;

окситетрациклина дегидрат в таблетках по 0,25 г (250000 ЕД);

неомицина сульфат во флаконах по 0,5 г (50000 ЕД) или в таблетках по 0,10 и 0,25 г;

препараты группы левомицетина:

левомицетин сукцинат растворимый (для инъекций) во флаконах по 0,5 и 1,0 г;

левомицетин в таблетках по 0,25 и 0,5 г;

препараты группы пенициллина:

бензилпенициллина натриевая соль или калиевая соль во флаконах по 250000, 500000 или 1000000 ЕД;

бензилпенициллина новокаиновая соль во флаконах по 300000, 600000 или 1200000 ЕД;

новоцин во флаконах по 400000, 800000, 1200000 ЕД;

препараты группы стрептомицина:

стрептомицина сульфат во флаконах по 0,25 г (250000 ЕД), 0,5 г (500000 ЕД), 1 г (1000000 ЕД);

стрептосульмицина сульфат во флаконах по 0,25, 0,5 или 1 г;

стрептомицина-хлоркальциевый комплекс во флаконах по 0,1, 0,2, 0,5 г;

дигидрострептомицина сульфат во флаконах по 0,25, 0,5 или 1 г;

дигидрострептомицина пантотенат во флаконах по 0,25 г (250000 ЕД), 0,5 г (500000 ЕД), 1 г (1000000 ЕД).

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление растворов антибиотиков

3.1.1. Растворы антибиотиков готовят непосредственно перед использованием. Антибиотики в таблетках используют для приготовления растворов при отсутствии антибиотиков для инъекций. При приготовлении растворов антибиотиков из таблеток не допускается проводить взвешивание, так как в таблетках может содержаться разное количество наполнителя. В этом случае приготовление растворов основано на использовании целых таблеток с точно известным содержанием антибиотиков.

Допускается при анализе пищевых продуктов (кроме консервов) проводить приготовление растворов антибиотиков из таблеток с соблюдением правил асептики на стерильной дистиллированной воде.

3.1.2. Раствор массовой концентрацией гентамицина сульфата 10 $г/дм^3$:

во флакон с 80 мг гентамицина сульфата (для инъекций) вносят 8 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, содержимое флакона растворяют. Раствор добавляют к готовой основе среды.

При использовании раствора гентамицина сульфата в ампулах исходят из того, что ампула с 1 $см^3$ раствора содержит 40 мг гентамицина, а с 2 $см^3$ — 80 мг.

---

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

3.1.3. Раствор массовой концентрацией левомицетина сукцината растворимого 50 и 100 г/дм^3: во флакон с 0,5 или 1,0 г левомицетина (для инъекции) вносят 10 см^3 стерильной дистиллированной воды, содержимое флакона растворяют. Раствор добавляют к готовой основе среды.

При использовании левомицетина в таблетках по 0,25 и 0,5 г готовят растворы массовой концентрацией левомицетина 5 г/дм^3. Для этого 2 таблетки по 0,25 г или 1 таблетку по 0,5 г растирают в ступке, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, смывая дистиллированной водой, стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670. Допускается раствор левомицетина стерилизовать вместе с основой среды.

3.1.4. Раствор массовой концентрацией окситетрациклина дигидрата 1 г/дм^3: 1 таблетку по 0,25 г растирают в ступке, переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3, смывая дистиллированной водой. Раствор доводят до метки дистиллированной водой, стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

3.1.5. Растворы препаратов группы пенициллина готовят из расчета содержания антибиотика 50000 или 100000 ЕД в 1 см^3 раствора:

во флаконы с 250000, 300000, 500000 ЕД вносят соответственно 5, 6, 10 см^3 стерильной дистиллированной воды, содержимое флакона растворяют, получая растворы, содержащие в 1 см^3 50000 ЕД антибиотика;

во флаконы с 1000000, 1200000 ЕД вносят соответственно 10, 12 см^3 стерильной дистиллированной воды, получая растворы, содержащие в 1 см^3 100000 ЕД антибиотика.

3.1.6. Растворы препаратов группы стрептомицина массовой концентрацией антибиотика 100 г/дм^3: во флаконы с 0,10; 0,25; 0,50 и 1 г антибиотика вносят соответственно 1; 2,5; 5; 10 см^3 стерильной дистиллированной воды, содержимое флакона растворяют.

3.1.7. Раствор массовой концентрацией неомицина сульфата 50 г/дм^3: во флакон с 0,5 г неомицина сульфата (для инъекций) вносят 10 см^3 стерильной дистиллированной воды.

При приготовлении раствора массовой концентрацией неомицина сульфата 10 г/дм^3 из таблеток: 2 таблетки по 0,25 г или 5 таблеток по 0,1 г растирают в ступке, порошок переносят в мерную колбу на 50 см^3, смывая дистиллированной водой, объем доводят до метки. Раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

3.2. Приготовление питательных сред

3.2.1. Питательные среды с антибиотиками готовят непосредственно перед использованием.

При приготовлении сред с антибиотиками вначале готовят основы сред. К расплавленной и охлажденной до температуры (46±1) °С основе среды добавляют растворы антибиотиков.

3.2.2. Для приготовления питательных сред с антибиотиками используют следующие основы.

3.2.2.1. Основу среды (среду Сабуро) готовят следующим образом: 40,0 глюкозы, 10,0 г пептона, 18,0 г агара добавляют к 1 дм^3 дистиллированной воды. Смесь подогревают, периодически помешивая, до расплавления составных частей, охлаждают до 45—55 °С, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 6,5±0,1, разливают в мерные колбы и стерилизуют 15 мин при температуре (121±1) °С. Основу среды хранят при температуре (4±2) °С не более 14 сут.

Основу среды (среду Сабуро) допускается использовать без добавления антибиотиков при анализе консервов на промышленную стерильность.

3.2.2.2. Основа среды из сухого сывороточного агара БФ.

В состав среды входят, г:

сухая гидролизованная смесь	37,0
калий фосфорнокислый однозамещенный	0,8
натрий фосфорнокислый однозамещенный	0,04
бромфеноловый синий, водорастворимый, индикатор	0,16
агар	22,0.

60,0 г сухого сывороточного агара БФ прибавляют к 1 дм^3 дистиллированной воды, нагревают до полного растворения (при наличии осадка фильтруют). Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации при 25 °С он составлял 4,2±0,2. Определенный объем среды разливают в колбы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Основу среды используют при анализе молока и молочных продуктов.

3.2.3. Для определения дрожжей и плесневых грибов используют среды, указанные в пп. 3.2.3.1—3.2.3.7.

3.2.3.1. Среда агаризованная с левомицетином: к 1 дм^3 основы добавляют 2 см^3 раствора левомицетина сукцината растворимого (для инъекций) массовой концентрацией 50 г/дм^3 или 1 см^3 раствора

массовой концентрацией 100 г/дм^3. При использовании раствора левомицетина массовой концентрации 5 г/дм^3 к 980 см^3 основы добавляют 20 см^3 раствора.

3.2.3.2. Среда агаризованная с окситетрациклином: к 900 см^3 основы добавляют 100 см^3 раствора окситетрациклина дигидрата массовой концентрацией 1 г/дм^3.

3.2.3.3. Среда агаризованная с окситетрациклином и гентамицином: к 895 см^3 основы добавляют 100 см^3 раствора окситетрациклина дигидрата массовой концентрацией 1 г/дм^3 и 5 см^3 раствора гентамицина массовой концентрацией 10 г/дм^3.

3.2.3.4. Среда агаризованная с антибиотиками группы пенициллина и стрептомицина: к 1 дм^3 основы добавляют 1 или 0,5 см^3 раствора антибиотика группы пенициллина, содержащего соответственно 50000 или 100000 ЕД, затем к среде добавляют 0,4 см^3 раствора антибиотика группы стрептомицина массовой концентрацией 100 г/дм^3.

3.2.3.5. Среда агаризованная с неомицином сульфатом: к 1 дм^3 основы добавляют 7 см^3 раствора неомицина сульфата массовой концентрацией 50 г/дм^3.

При использовании раствора неомицина сульфата массовой концентрацией 10 г/дм^3 к 965 см^3 основы добавляют 35 см^3 раствора.

3.2.3.6. Солодовое сусло готовят по ГОСТ 10444.1.

Применяют для выявления дрожжей и плесневых грибов в консервах.

Допускается использование готового неохмеленного пивного сусла вместо осахаренного сусла, получаемого из молотого ячменного солода.

3.2.3.7. Солодовое агаризованное сусло готовят по ГОСТ 10444.1.

Для определения дрожжей и плесневых 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 на 1 дм^3.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Из подготовленной пробы продукта и (или) его разведения отбирают навеску объемом (1±0,1) см^3.

4.2. Продукт и (или) его разведения высевают по ГОСТ 26670 параллельно в две чашки Петри. Посевы заливают расплавленной и охлажденной до температуры (45±1) °С средой (см. пп. 3.2.2.1; 3.2.3.1—3.2.3.5; 3.2.3.7). Параллельно с этим заливают чашку А Петри 15—20 см^3 среды для проверки ее стерильности.

Допускается при установлении промышленной стерильности консервов и при выявлении возбудителей порчи в продуктах по 2,0 см^3 исследуемого материала высевать параллельно в две пробирки с 5 см^3 жидкого солодового сусла (см. п. 3.2.3.6).

4.3. Посевы термостатируют при температуре (24±1) °С в течение 5 сут, посевы на чашках Петри термостатируют дном вверх.

Через 3 сут термостатирования проводят предварительный учет типичных колоний или появления характерных признаков роста на жидких питательных средах.

Если в посевах на агаризованных средах присутствуют мукоровые, очень быстро растущие грибы, то снятие предварительных результатов необходимо проводить очень осторожно, не допуская того, чтобы споры этих грибов осыпались и дали рост вторичных колоний. Через 5 сут проводят окончательный учет результатов термостатирования посевов. Колонии дрожжей и плесневых грибов разделяют визуально.

Рост дрожжей на агаризованных средах сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем. Развитие дрожжей в жидкой среде сопровождается появлением мути, запаха брожения и газа.

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

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

4.5. При необходимости для разделения колоний дрожжей и плесневых грибов проводят микроскопические исследования. Для этого из отдельных колоний или из посевов на жидкую среду готовят

препараты методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды. Затем в эту каплю прокаленной иглой вносится часть колонии или петлей наносят каплю культуральной жидкости. Полученная суспензия покрывается покровным стеклом.

Результаты микроскопирования оценивают пользуясь характеристикой дрожжей и плесневых грибов, указанной в приложении.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

5.2. Если при испытании продукта на питательных средах обнаружен рост дрожжей и плесневых грибов и их присутствие подтверждено микроскопированием, то дают заключение о присутствии этих микроорганизмов в продукте.

5.3. Результаты обрабатывают и пересчитывают отдельно для дрожжей и плесневых грибов.

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

$$X = \frac{\Sigma C}{n_1 + n_2 \cdot 0{,}1} \cdot 10^n,$$

где ΣC — сумма всех подсчитанных колоний на чашках Петри в двух последовательных десятикратных разведениях при условии, что на каждой чашке число колоний отвечает требованиям п. 4.4;

n_1 — количество чашек Петри, подсчитанное для меньшего разведения, т. е. для более концентрированного разведения продукта;

n_2 — количество чашек Петри, подсчитанное для большего разведения;

n — степень разведения продукта (для меньшего разведения).

5.5. Результаты испытания записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Справочное

ХАРАКТЕРИСТИКА ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Группа микроорганизмов	Характеристика
Дрожжи	Одноклеточные микроорганизмы, клетки круглой, овальной или продолговатой формы, длиной от 2,5 до 30 мкм и шириной от 2,5 до 10 мкм, часто почкующиеся
Плесневые грибы	Состоят из нитей-гифов, без перегородок или септированных на клетки. Гифы образуют боковые выросты и разветвления, от вегетативных гифов поднимаются гифы, несущие плодовые тела

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Государственным агропромышленным комитетом СССР**

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 21.09.88 № 3208**

3. **В стандарт введен международный стандарт ИСО 7954—87**

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 10444.12—75, ГОСТ 10444.13—75, ГОСТ 26888—86**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 5556—81	2.1
ГОСТ 6672—75	2.1
ГОСТ 8756.18—70	1.2
ГОСТ 9225—84	1.1, 1.2
ГОСТ 9284—75	2.1
ГОСТ 10444.1—84	1.2, 2.1, 3.2.3.6, 3.2.3.7
ГОСТ 13739—78	2.1
ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 26668—85	1.1
ГОСТ 26669—85	1.2
ГОСТ 26670—91	3.1.3, 3.1.4, 3.1.7, 4.2, 5.5
ГОСТ 26809—86	1.1

6. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 4—94)**

7. **ИЗДАНИЕ. (Апрель 2010 г.) с Поправкой (ИУС 8—2009).**

gost.e-ecolog.ru