МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32012—2012

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных микроорганизмов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИМС» Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 3 декабря 2012 г. № 54)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарта Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

(Поправка).

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 230-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32012—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54075—2010*

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ИЗДАНИЕ (ноябрь 2019 г.) с Поправкой (ИУС 6—2019)

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 230-ст ГОСТ Р 54075—2010 отменен с 15 февраля 2015 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2013, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы 3
5 Отбор проб 4
6 Метод определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий 5
7 Метод определения количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий . . 8
Приложение А (обязательное) Рост споровых анаэробных бактерий на среде СДА 10
Приложение Б (обязательное) Рост споровых анаэробных лактатсбраживающих бактерий на среде ЛАССА 11

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения содержания спор мезофильных анаэробных микроорганизмов

Milk and milk product. Methods for determination of the spores content of mesophilic anaerobic microorganisms

Дата введения — 2014—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое и подвергнутое термизации или низкотемпературной пастеризации молоко, сыры и другую молочную продукцию и устанавливает методы определения в них содержания общего количества спор мезофильных анаэробных микроорганизмов (бактерий) и спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных микроорганизмов (бактерий).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 199 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 490 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 745 Фольга алюминиевая для упаковки. Технические условия

ГОСТ 779 Мясо-говядина в полутушах и четвертинах. Технические условия*

ГОСТ 975 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4025 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4147 Реактивы. Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4199 Реактивы. Натрий тетраборнокислый 10-водный. Технические условия

ГОСТ 4201 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9412 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 10163 Крахмал растворимый. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 54315—2011.

Издание официальное

ГОСТ 13928 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия*

ГОСТ 19881 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 23683 Парафины нефтяные твердые. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26678 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169 (ИСО 648—77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, установленные ГОСТ ISO 7218, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **общее количество спор мезофильных анаэробных бактерий:** Количество микроорганизмов, сохранившихся после тепловой обработки исследуемого продукта или его разведений при температуре (75 ± 1) °С в течение 30 мин, способных прорастать, размножаться и давать видимые признаки роста в анаэробных условиях на соответствующих основных питательных средах при температуре (37 ± 1) °С.

3.2 **количество спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий:** Количество микроорганизмов, сохранившихся после тепловой обработки исследуемого материала или его разведений при температуре (75 ± 1) °С в течение 30 мин, способных прорастать, размножаться и давать видимые признаки роста в анаэробных условиях при температуре (37 ± 1) °С на соответствующих дифференциально-диагностических питательных средах, содержащих в качестве источника углеводного питания только лактаты.

3.3 **основная питательная среда (общего назначения):** Среда, предназначенная для выращивания различных микроорганизмов.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 55878—2013.

3.4 **дифференциально-диагностическая питательная среда:** Среда, предназначенная для разграничения отдельных групп (видов) микроорганизмов.

3.5 **сухие питательные среды (СДА, ЛАССА и др.):** Порошкообразные или гранулированные питательные среды промышленного производства, отвечающие требованиям соответствующих документов, предназначенные для приготовления рабочих питательных сред, а также среды зарубежного производства, имеющие разрешение на их применение.

3.6 **рабочая питательная среда:** Среда, приготовленная из одноименной сухой питательной среды или отдельных компонентов и подготовленная для выполнения микробиологических посевов.

3.7 **полужидкая (полутвердая) питательная среда:** Рабочая питательная среда, содержащая микробиологического агара от 0,3 % до 0,8 %.

3.8 **рабочая питательная среда СДА:** Полужидкая основная питательная среда для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий при контроле молока, сыров и другой молочной продукции.

3.9 **рабочая питательная среда ЛАССА:** Полужидкая дифференциально-диагностическая питательная среда для определения спор лактатсбраживающих маслянокислых бактерий.

3.10 **признак роста:** Внешнее изменение питательной среды, свидетельствующее о росте и развитии микроорганизмов.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Анализатор потенциометрический для контроля pH по ГОСТ 19881, диапазоном измерения pH 3—8, погрешностью измерения pH ±0,02.

Весы лабораторные среднего класса точности, с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ±0,01 и ±0,1 г.

Термостат жидкостный (редуктазник), позволяющий поддерживать температуру от 25 °С до 55 °С, с отклонением от заданной температуры ±1 °С.

Термостат жидкостный, позволяющий поддерживать температуру от 15 °С до 55 °С, с отклонением от заданной температуры ±1 °С.

Термостат суховоздушный с естественной или принудительной циркуляцией воздуха, с охлаждением.

Стерилизатор паровой медицинский (автоклав).

Баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 0 °С до 100 °С, с отклонением от заданной температуры ±2 °С.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025.

Термометр стеклянный жидкостный (нертутный) по ГОСТ 28498, диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С.

Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание температуры (160 ± 5) °С.

Анаэростаты или другие устройства, создающие анаэробные условия.

Часы по ГОСТ 27752 или таймер.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Холодильник бытовой по ГОСТ 26678.

Спиртовка СЛ-1 по ГОСТ 25336.

Пробки резиновые конусные.

Емкости металлические или кастрюли, используемые для растворения, расплавления, нагревания или охлаждения питательных сред и воды.

Вспомогательное оборудование для отбора проб: трубка, отборник, шпатель, щуп, ложка, мешалка, нож, пробник.

Фольга алюминиевая по ГОСТ 745.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Бумага индикаторная универсальная.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Пипетки 1—1(2)—1 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1—1(2)—1(2)—1(2, 5, 25) по ГОСТ 29227.

Колбы мерные 2—50(100, 200, 500, 1000)—2 по ГОСТ 1770.
Колбы конические Кн-2—100(250)—34 ТХС по ГОСТ 25336.
Цилиндры 1(2)—25(50, 100)—1 по ГОСТ 1770.
Пробирки П1, П2—16—150 ТС по ГОСТ 25336.
Пробирки П1, П2—21—200 ТС по ГОСТ 25336.
Стаканчики для взвешивания (бюксы) типов СВ и СН по ГОСТ 25336.
Стекло часовое.
Ступки лабораторные фарфоровые с пестиком по ГОСТ 9147.
Ланцет.
Штатив для пробирок.
Агар микробиологический по ГОСТ 17206.
Кислота соляная по ГОСТ 3118, раствор объемной долей 20 %.
Кислота молочная по ГОСТ 490, раствор объемной долей 20 %.
Кальций молочнокислый по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, раствор массовой долей 20 %.
Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, ч. д. а.
Натрий уксуснокислый 3-водный по ГОСТ 199, ч. д. а.
Натрий хлористый по ГОСТ 4233.
Натрий тетраборнокислый 10-водный по ГОСТ 4199, ч. д. а.
Парафин по ГОСТ 23683.
Масло вазелиновое.
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.
Гидролизат белков молока по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Гидролизат казеина.
Мясо — говядина по ГОСТ 779.
Автолизат дрожжевой сухой по нормативным документам государств, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975.
Крахмал растворимый по ГОСТ 10163.
Кислота аскорбиновая пищевая по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Цистеин солянокислый по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Железо (Ш) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147, ч. д. а.
Индикатор нейтральный красный (нейтральрот) по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Среда сухая для определения спор мезофильных анаэробных бактерий (СДА) по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Среда сухая для определения лактатсбраживающих анаэробных бактерий (ЛАССА) по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Спирт этиловый ректификованный и спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.
Вода питьевая по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Допускается применение других средств измерений, реактивов, по качеству и метрологическим характеристикам не уступающих перечисленным выше.

5 Отбор проб

Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1.

6 Метод определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий

6.1 Сущность метода

Метод основан на способности спор мезофильных анаэробных микроорганизмов (бактерий), сохранившихся после тепловой обработки исследуемого материала или его разведений при температуре (75 ± 1) °С в течение 30 мин, прорастать, размножаться и давать видимые признаки роста в питательных средах.

Метод предназначен для оценки сырого молока и выявления источника микробиологической порчи молочных продуктов.

6.2 Подготовка к анализу

6.2.1 Приготовление раствора хлористого натрия (физиологический раствор) для приготовления разведений

В 1 дм^3 питьевой воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, затем раствор разливают по 10 см^3 в чистые стеклянные пробирки диаметром 21 мм, по 93 см^3 — в колбы. Емкости закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (20 ± 5) мин. После стерилизации в пробирках должно остаться около 9 см^3, а в колбах — около 90 см^3 раствора хлористого натрия.

6.2.2 Приготовление рабочей питательной среды СДА для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий

6.2.2.1 (50 ± 5) г сухой среды СДА вносят в 1 дм^3 воды, тщательно перемешивают, нагревают и кипятят 3—5 мин, не допуская пригорания. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют ее 20 %-ным раствором гидроокиси натрия или 20 %-ным раствором молочной или соляной кислоты до значения (7,3 ± 0,1) pH. Готовую среду разливают в пробирки по (12 ± 1) см^3, закрывают ватными или ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Готовая рабочая питательная среда должна иметь интенсивно красный цвет.

Готовую рабочую питательную среду хранят в холодильнике при температуре (8 ± 2) °С не более 1 мес или при температуре от 18 °С до 23 °С не более 7 сут при условии сохранения внешнего вида среды.

6.2.2.2 Допускается приготовление рабочей питательной среды для определения общего количества спор мезофильных анаэробных бактерий из отдельных ингредиентов. Для этого в 1 дм^3 питьевой воды вносят 33,3 г гидролизата белков молока, 15,0 г микробиологического агара, 0,5 г солянокислого цистеина или 1,0 г аскорбиновой кислоты, 1,0 г растворимого крахмала и 5,0 г уксуснокислого натрия. Растворяют добавленные компоненты, нагревая смесь в текучем паре. Добавляют 5,0 г глюкозы и 4,0 г сухого дрожжевого автолизата. Устанавливают pH (7,1 ± 0,1), разливают среду в пробирки по (10 ± 2) см^3, закрывают ватными или ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

При длительном хранении рабочей питательной среды (более 20 сут) после охлаждения пробирок со средой в стерильных условиях ватные пробки заменяют на стерильные резиновые пробки.

Рабочую питательную среду хранят в холодильнике при температуре (8 ± 2) °С не более 1 мес или при температуре от 18 °С до 23 °С не более 7 сут при условии сохранения внешнего вида среды.

6.2.3 Приготовление водного агара

В 1 дм^3 питьевой воды вносят 15 г агара и нагревают до кипения. После расплавления агара раствор в горячем состоянии разливают в пробирки по 15 см^3 или в колбы по 50—100 см^3, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

6.3 Подготовка образцов к анализу

6.3.1 Подготовка образцов сырого молока и жидкой молочной продукции

Пробы жидкой молочной продукции (сырое молоко, восстановленное молоко и другие, аналогичные по консистенции продукты) тщательно перемешивают и отбирают для анализа стерильной пипет-

кой по 15 см^3, переносят в стерильные пробирки, которые закрывают стерильными ватными пробками. При этом необходимо следить, чтобы капельки продукта не попадали на стенки пробирок.

Подготовленные пробирки вместе с контрольной пробиркой, в которой находится 10 см^3 раствора хлористого натрия по 6.2.1 или воды и термометр, помещают в водяную баню. Уровень воды в водяной бане должен быть выше уровня продукта на 10—15 мм. Пробирки выдерживают при температуре (75 ± 1) °С в течение (30 ± 3) мин, затем быстро охлаждают до комнатной температуры, погружая их в холодную воду.

В зависимости от предполагаемой обсемененности исследуемого жидкого молочного продукта спорами мезофильных анаэробных бактерий из прогретых проб готовят десятикратные разведения в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53430.

Допускается приготовление разведений из непрогретых проб продуктов с последующим совместным прогревом проб исходных продуктов и их разведений при температуре (75 ± 1) °С в течение (30 ± 3) мин.

6.3.2 Подготовка проб сыра и аналогичной по консистенции молочной продукции

В зависимости от предполагаемой обсемененности исследуемого сыра или иной молочной продукции спорами мезофильных анаэробных бактерий из отобранных проб готовят десятикратные разведения в соответствии с нормативными документами стран, присоединившихся к стандарту.

Подготовленные пробирки с разведениями проб сыра или иной молочной продукции вместе с контрольной пробиркой, в которой находятся термометр и 10 см^3 раствора хлористого натрия по 6.2.1 или воды, помещают в водяную баню и выдерживают при температуре (75 ± 1) °С в течение (30 ± 3) мин.

6.4 Проведение анализа

6.4.1 Техника посева споровых анаэробных бактерий

Для создания условий развития анаэробных микроорганизмов могут быть использованы следующие приемы:

- посев в высокий столбик рабочей питательной среды;
- культивирование посевов в анаэростатах или других устройствах, создающих анаэробные условия;
- применение специальных реагентов для создания анаэробных условий.

6.4.1.1 Посев анаэробных микроорганизмов проводят в пробирки с рабочей питательной средой, разлитой высоким столбиком.

Непосредственно перед посевом для снижения содержания свободного кислорода рабочие питательные среды кипятят в водяной бане в течение 10—20 мин. При кипячении из среды вытесняются газообразные вещества, в том числе кислород.

Пробирки с прокипяченными рабочими питательными средами быстро охлаждают до (40 ± 1) °С и используют для посева.

Засев рабочей питательной среды проводят соответствующим разведением посевного материала пипеткой. Посевной материал при этом должен свободно вытекать из пипетки без принудительного выдувания.

После проведения посева для уменьшения диффузии кислорода из воздуха рабочие питательные среды сверху заливают стерильным вазелиновым маслом или парафином, или водным агаром толщиной слоя (1,5 ± 0,5) см.

При посеве анаэробных микроорганизмов возможно использование анаэробных инкубаторов или настольных анаэробных систем с газогенераторными пакетами.

6.4.2 Посев и культивирование

Для определения количества спор мезофильных анаэробных бактерий проводят посев 1 см^3 подготовленной пробы (для молока — нулевое, первое и второе, для сыра — первое и второе разведения; для других молочных продуктов — в зависимости от предполагаемого уровня обсемененности) в пробирку с 10—12 см^3 рабочей питательной среды, приготовленной по 6.2.2 или 6.2.3, выдержанной перед анализом в кипящей водяной бане в течение 30 мин и охлажденной до температуры (40 ± 1) °С.

Каждое из выбранных разведений исследуемого продукта засевают в две пробирки с рабочей питательной средой, внося посевной материал на дно пробирки, не допуская взбалтывания среды и не выдувая посевной материал.

Сверху посевы заливают слоем вазелинового масла или парафина, или водного агара по 6.2.3, предварительно расплавленного до температуры (45 ± 1) °С. Высота слоя должна быть не менее (1,5 ± 0,5) см.

При использовании для посева пробирок с рабочей питательной средой, разлитой высоким столбиком, допускается не заливать посевы защитным слоем вазелинового масла или парафина, или водного агара.

Пробирки с посевом помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 72 ч.

6.5 Обработка результатов

Наличие спор мезофильных анаэробных бактерий в засеянных объемах исследуемого продукта определяют по изменению окраски среды с красной на желтую и по газообразованию (появлению разрывов агарового столбика).

В посевах без защитного слоя рост мезофильных анаэробных бактерий определяют по пенообразованию, образованию «карманов» в столбике рабочей питательной среды и изменению цвета рабочей питательной среды с красного на желтый. В данном случае основным признаком роста является изменение окраски, так как процесс газообразования может быть не зафиксирован.

Наиболее вероятное число (НВЧ) спор мезофильных анаэробных бактерий при анализе определяют по числу пробирок, в которых они дали рост согласно таблице 1.

Таблица 1

Число пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 $см^3$	Число пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 $см^3$
1 $см^3$	0,1 $см^3$	0,01 $см^3$		1 $см^3$	0,1 $см^3$	0,01 $см^3$	
0	0	0	0	1	1	2	—
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	—	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	—
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	—	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	—
0	2	1	—	2	1	0	6,0
0	2	2	—	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	—	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0
1	1	1	2,0	—	—	—	Более 110,0

Результаты, в которых количество пробирок с видными признаками роста мезофильных анаэробных бактерий при посевах 1; 0,1 и 0,01 $см^3$ молока или сыра соответственно равно 002, 012, 021, 022, 102, 112, 122, не могут быть использованы для расчета, так как в 95 % случаев они вызваны несовер-

шенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. В данных случаях исследования повторяют.

Признаки роста споровых анаэробных бактерий на среде СДА представлены в приложении А.

7 Метод определения количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий

7.1 Сущность метода

Метод основан на способности спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих микроорганизмов (бактерий), сохранившихся после тепловой обработки исследуемого материала или его разведений при температуре (75 ± 1) °С в течение 30 мин, прорастать, размножаться и давать видимые признаки роста в соответствующих дифференциально-диагностических питательных средах.

Метод предназначен для оценки сыропригодности сырого молока или выявления источника микробиологической порчи молочной продукции, в том числе сыров.

7.2 Подготовка к анализу

7.2.1 Растворы хлористого натрия и водного агара готовят по 6.2.1,6.2.3.

7.2.2 Приготовление мясопептонного бульона

Говяжье мясо, освобожденное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, взвешивают, складывают в кастрюлю; заливают двойным количеством питьевой воды, отмечают первоначальный объем и оставляют на 18—24 ч при температуре (5 ± 1) °С. После этого для ускорения процесса экстракции питательных веществ из мяса содержимое кастрюли подогревают до температуры (50 ± 5) °С, выдерживают в течение 60 мин и затем кипятят 30—40 мин. После кипячения бульон в горячем состоянии фильтруют через двойной бумажный фильтр. Фильтрат доводят питьевой водой до первоначального объема, добавляют к нему (1,0 ± 0,1) % бактериологического пептона и (0,5 ± 0,1) % хлористого натрия и устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия массовой долей 20 % активную кислотность (7,3 ± 0,1) pH. Подготовленный бульон стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

7.2.3 Приготовление рабочей питательной среды ЛАССА для определения количества спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий

7.2.3.1 (50 ± 5) г сухой среды ЛАССА вносят в 1 $дм^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, нагревают и кипятят 3—5 мин, не допуская пригорания. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют ее 20—30 %-ным раствором гидроокиси натрия или 20 %-ным раствором молочной кислоты до значения (5,7 ± 0,1). Полученную рабочую питательную среду разливают в пробирки по (12 ± 1) $см^3$, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

7.2.3.2 Допускается приготовление рабочей питательной среды для определения количества спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий из отдельных ингредиентов.

Для этого к 900 $см^3$ мясопептонного бульона, приготовленного по 7.2.2, добавляют 5,0 г молочнокислого кальция, 5,0 г уксуснокислого натрия, 0,8 г солянокислого цистеина или 1,0 г аскорбиновой кислоты, 4 г сухого дрожжевого автолизата и 20,0 г агара.

Смесь нагревают до температуры (95 ± 2) °С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агара и добавляют 10 $см^3$ 0,01 %-ного раствора трехлористого железа, 10 $см^3$ 0,01 %-ного раствора тетраборнокислого натрия, 10 $см^3$ 1 %-ного раствора кислого углекислого натрия и 1 $см^3$ 0,4 %-ного раствора индикатора нейтрального красного. С помощью раствора 20 %-ной молочной кислоты доводят активную кислотность до (5,70 ± 0,05) pH. Приготовленную смесь разливают в пробирки по 10—12 $см^3$, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Затем в стерильных условиях ватные пробки заменяют на стерильные резиновые.

Готовая рабочая питательная среда должна иметь интенсивный малиново-красный цвет.

Допускается замена мясопептонного бульона гидролизатом казеина и пептоном. Для этого к 1 $дм^3$ гидролизата казеина добавляют 10 г пептона, устанавливают pH (7,0 ± 0,1), нагревают до кипения, фильтруют через бумажный фильтр в чистые колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

7.3 Проведение анализа

7.3.1 Подготовку образцов проводят по 6.3.

7.3.2 Посев образцов проводят по 6.4.1 и 6.4.2, используя рабочую питательную среду для определения лактатсбраживающих анаэробных бактерий.

Культивирование посевов проводят в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 72 ч.

7.4 Обработка результатов

7.4.1 Рост мезофильных лактатсбраживающих анаэробных спорообразующих бактерий в посевах определяют по изменению цвета рабочей питательной среды с малиново-красного до соломенно-желтого и по газообразованию (образованию разрывов столбика агара).

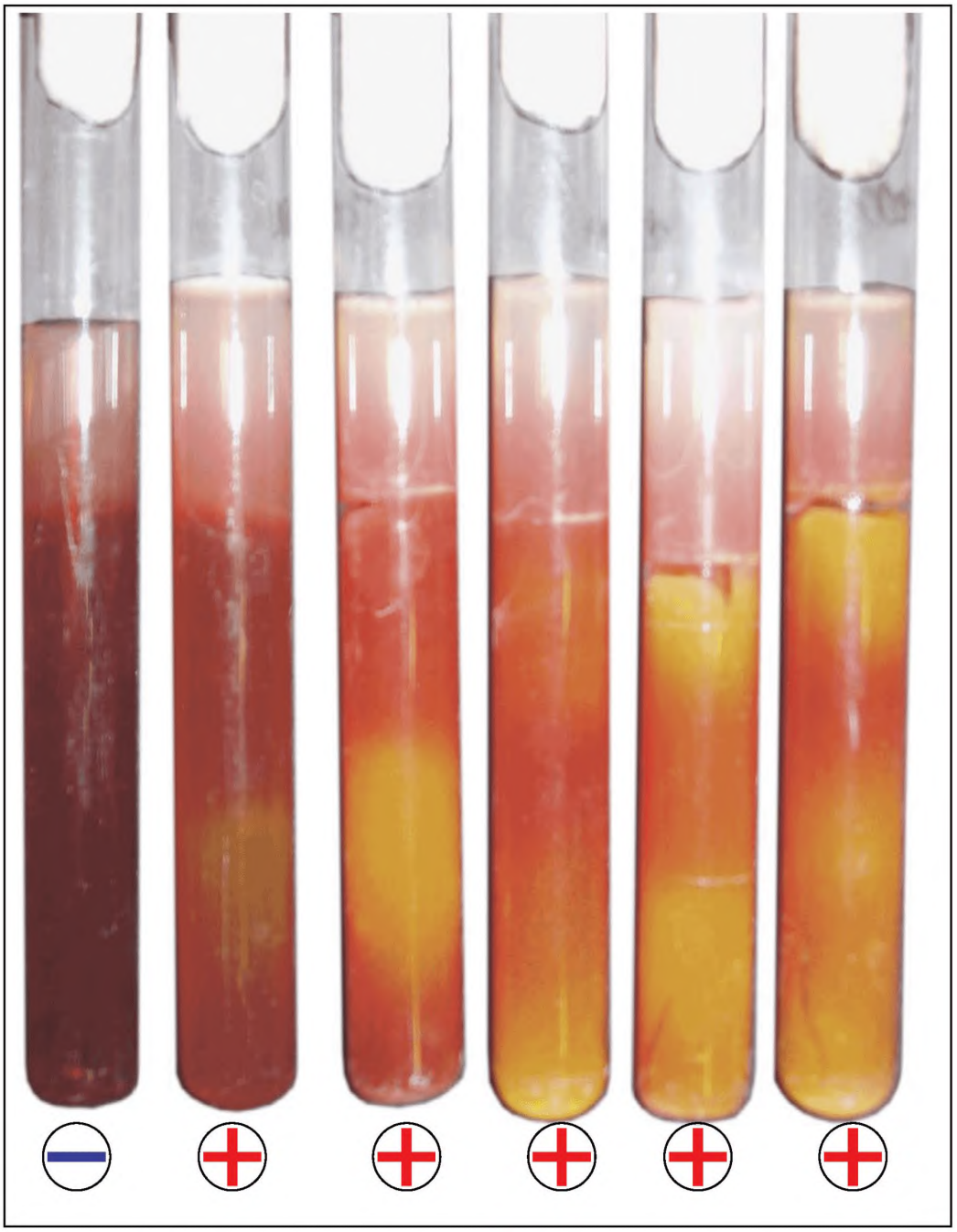
7.4.2 Определение наиболее вероятного числа спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий проводят по 6.5.

Признаки роста споровых анаэробных лактатсбраживающих бактерий на среде ЛАССА представлены в приложении Б.

Приложение А
(обязательное)

Рост споровых анаэробных бактерий на среде СДА

А.1 Признаки роста споровых анаэробных бактерий представлены на рисунке А.1.



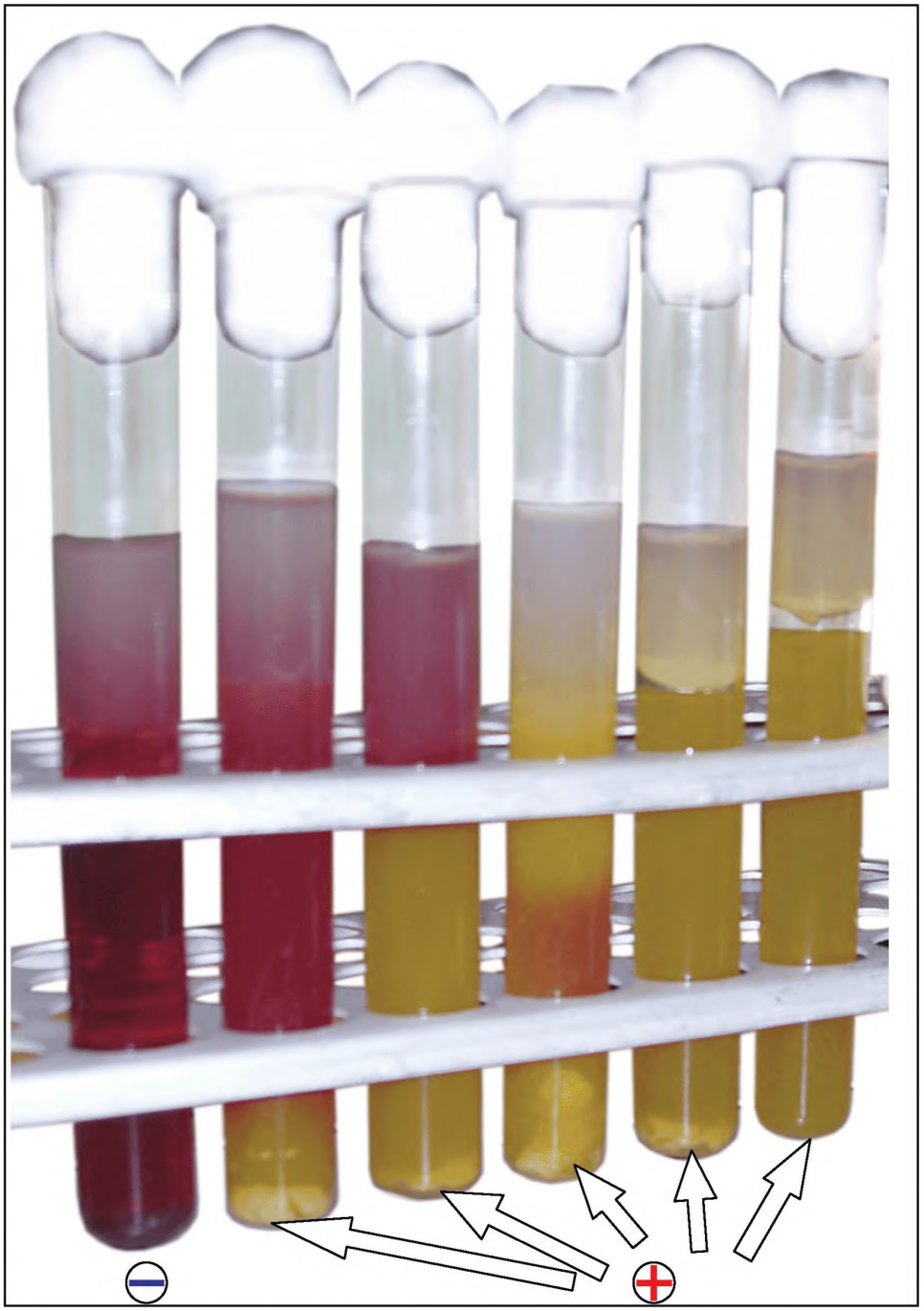
– среда без признаков роста; – среда с признаками роста

Рисунок А.1

Приложение Б
(обязательное)

Рост споровых анаэробных лактатсбраживающих бактерий на среде ЛАССА

Б.1 Признаки роста споровых анаэробных бактерий представлены на рисунке Б.1.



– среда без признаков роста; – среда с признаками роста

Рисунок Б.1

УДК 576.8:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, сыр, молочные продукты, методы микробиологического анализа, мезофильные анаэробные и мезофильные лактатсбраживающие анаэробные микроорганизмы

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 15.11.2019. Подписано в печать 02.12.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru