Группа Н09

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы определения молочнокислых микроорганизмов

Food products. Methods for determination of the lactic acid bacteria

ГОСТ 10444.11—89

ОКСТУ 9109

Дата введения 01.01.91

Настоящий стандарт распространяется на пищевые и кисломолочные продукты, закваски, бактериальные концентраты и бактериальные препараты молочнокислых бактерий и устанавливает метод определения жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов и их наиболее вероятного числа (НВЧ), а также методы определения в пищевых продуктах (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий) бактерий родов Lactobacillus, Leuconostoc, стрептококков группы N рода Streptococcus, Pediococcus, S. thermophilus и определение наиболее вероятного числа (НВЧ) бактерий рода Lactobacillus.

Метод основан на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в жидкие или агаризованные селективные питательные среды, культивировании посевов при оптимальных условиях и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете.

Метод предназначен для:

установления соответствия микробиологических показателей качества пищевых и кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий требованиям нормативно-технической документации;

установления промышленной стерильности консервов;

выяснения причин возникновения дефектов пищевых продуктов.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов, кроме кисломолочных, — по ГОСТ 26668, 26669.

Отбор проб кисломолочных продуктов (сухих и жидких), заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий и подготовка их к анализу — по ГОСТ 9225.

1.2. 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 количество молочнокислых микроорганизмов, термостатированию не подлежат.

Разведения продуктов готовят на пептонно-солевом растворе по ГОСТ 26669.

Исходные разведения продуктов с массовой долей NaCl более 5 % готовят с использованием пептонной воды; исходные разведения рыбных и мясных продуктов готовят с использованием физиологического раствора.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Для проведения испытания применяют аппаратуру, материалы, реактивы по ГОСТ 10444.1, ГОСТ 9225 и указанные ниже:

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и пределом допускаемой погрешности ±2 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и пределом допускаемой погрешности ±15 мг (для взвешивания продукта);

микроскоп световой биологический с приспособлением для фазово-контрастного микроскопирования или аналогичных марок;

стекла покровные по ГОСТ 6672;

стекла предметные по ГОСТ 9284;

термостат с диапазоном рабочих температур от 28—55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1 °С;

пробки корковые по ГОСТ 5541;

лупа складная карманная, дающая увеличение в 4—10 раз по ГОСТ 25706;

панкреатин для бактериальных и вирусологических препаратов;

хлороформ технический по ГОСТ 20015;

молоко обезжиренное кислотностью не более 19°Т, получаемое из молока коровьего, заготовляемого не ниже 2-го сорта по ГОСТ 13264* или молоко сухое обезжиренное по ГОСТ 10970;

L-аргинин гидрохлорид;

бензидин основной или солянокислый;

калия цитрат;

карбоксилметилцеллюлоза;

твин-80;

натрия ацетат;

аммония цитрат;

магния сульфат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$);

марганца сульфат ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$);

марганца сульфат ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$);

кислота сорбиновая;

нигрозин;

фенол.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление растворов реактивов и индикаторов для испытания пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий)

3.1.1. Бромкрезоловый пурпурный, индикатор, раствор массовой концентрацией 1 г/дм^3: 0,1 г бромкрезолового пурпурного с соблюдением правил асептики переносят, смывая стерильной дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, доводят объем этой же водой до метки. Раствор хранят не более 3 мес при комнатной температуре.

3.1.2. Кальций углекислый, водная суспензия массовой концентрацией 30 г/дм^3: 3 г углекислого кальция, простерилизованного по ГОСТ 10444.1, переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки. Суспензию стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Суспензию хранят не более 3 мес при комнатной температуре.

3.1.3. Карболфуксин, концентрированный раствор: 1 г фуксина смешивают с 10 см^3 96%-ного этилового спирта и 100 см^3 раствора фенола массовой концентрацией 50 г/дм^3.

Для приготовления рабочего раствора карболфуксина к 10 см^3 концентрированного раствора карболфуксина добавляют 90 см^3 дистиллированной воды.

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ 13264—70, кроме требований к молоку — сырью для детского питания.

3.1.4. Кристаллический фиолетовый раствор массовой концентрацией 10 г/дм^3: 1 г кристаллического фиолетового переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, объем доводят до метки. Раствор хранят не более 3 мес при комнатной температуре.

3.1.5. Нигрозина суспензия массовой концентрацией 100 г/дм^3: 10 г нигрозина переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, объем доводят до метки, нагревают до температуры 45—50 °С на водяной бане, затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

3.1.6. Пептонно-солевой раствор готовят по ГОСТ 26669.

3.1.7. Пептонную воду готовят по ГОСТ 26669.

3.1.8. Сорбиновая кислота, щелочной раствор: 1 г сорбиновой кислоты переносят, смывая раствором гидроокиси натрия c NaOH = 1 моль/дм^3, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, объем доводят до метки тем же раствором. Полученный раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

Допускается готовить раствор сорбиновой кислоты без фильтрации с соблюдением правил асептики, при этом раствор гидроокиси натрия готовят на стерильной дистиллированной воде.

3.1.9. Реактив для определения цитохромов: 1 г бензидина основного или солянокислого растворяют в 20 см^3 99,8%-ной ледяной уксусной кислоты, добавляют 30 см^3 дистиллированной воды и медленно нагревают, после охлаждения в раствор вносят 50 см^3 96%-ного этилового спирта. Раствор хранят в холодильнике в течение 1 мес.

3.1.10. Физиологический раствор готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2. Приготовление питательных сред для испытания пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий)

3.2.1. Среду Бликфельдта плотную готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.2. Среда Бликфельдта жидкая: в 950 см^3 дистиллированной воды растворяют 10 г лактозы, 10 г глюкозы, 5 г пептона, кипятят и фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 20 см^3 дрожжевого экстракта, 32 см^3 раствора бромкрезолового пурпурного по п. 3.1.1, устанавливают pH 7,3±0,1, разливают в стерильные пробирки и стерилизуют при температуре (117±1) °С в течение 20 мин.

3.2.3. Среда Бригс, в модификации Шарп:

в 875 см^3 дистиллированной воды вносят 15 г пептона, 20 г глюкозы, 25 см^3 дрожжевого экстракта, 5 г уксуснокислого натрия, 5 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 2 г аммония лимоннокислого, 100 см^3 томатного сока (в расчете на то, что в соке содержится не менее 4,5% растворимых сухих веществ, если в томатном соке содержится другое количество сухих веществ, то делают пересчет на содержание сухих веществ 4,5%), 1 см^3 твина — 80, 5 см^3 раствора солей ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 11,5 г, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — 2,86 г, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,68 г, дистиллированная вода до 100 см^3), 15 г агара.

Смесь кипятят на слабом огне до полного растворения агара. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (6,5±0,1). Среду стерилизуют при температуре (115±1) °С в течение 15 мин.

3.2.4. Среда дрожжевая: в 100 см^3 дрожжевого экстракта, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 900 см^3 дистиллированной воды, 10 г простерилизованного по ГОСТ 10444.1 углекислого кальция и 100 г сахарозы. Смесь нагревают до растворения сахарозы, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,1±0,1), разливают в пробирки по 10 см^3 и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

3.2.5. Среду капустный агар готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.6. Среда МРС жидкая: в мерную колбу вместимостью 1,0 дм^3 помещают 10 г пептона, 20 см^3 дрожжевого экстракта, 20,0 г глюкозы, 1,0 см^3 твин — 80, 2,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного, 5,0 г натрия ацетата, 2,0 г триаммония цитрата, 0,2 г сульфата магния, 0,05 г сульфата марганца ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), доливают до метки мясную воду; растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (6,2±0,1). Среду разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. Пробирки с питательной средой хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

3.2.7. Среду МРС агаризованную готовят по рецептуре, указанной в п. 3.2.6, с добавлением 15—18 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

При необходимости, для повышения селективности, после стерилизации к 1 дм^3 агаризованной или жидкой среды добавляют 1 см^3 щелочного раствора сорбиновой кислоты по п. 3.1.8.

3.2.8. Среда мясо-пептонный бульон с pH 9,6:

в мясо-пептонном бульоне, приготовленном по ГОСТ 10444.1, устанавливают pH с помощью растворов щелочи и кислоты по ГОСТ 10444.1 таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 9,6. Среду стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

3.2.9. Среду мясо-пептонный бульон с содержанием хлористого натрия 6,5% готовят по ГОСТ 10444.1, но при приготовлении увеличивают количество добавляемого хлористого натрия до 65 г на 1 дм^3 среды.

3.2.10. Среда питательный агар с сахарозой:

100,0 г сахарозы, 15,0 г агара добавляют в 1 дм^3 мясо-пептонного бульона, периодически перемешивая, смесь нагревают до кипения и полного растворения всех компонентов.

Среду охлаждают до 45—55 °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,1±0,1).

Среду разливают в колбы и стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121±1) °С. После стерилизации и проверки pH среду хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри, хранят при температуре (4±1) °С не более 14 сут.

3.2.11. Среда Редди: основа среды — в колбу, содержащую 500 см^3 дистиллированной воды, добавляют 15,0 г агара и нагревают на водяной бане до растворения агара. В другую колбу,содержащую 500 см^3 дистиллированной воды, добавляют 10,0 г цитрата калия и 15,0 г карбоксилметилцеллюлозы и растворяют при нагревании. Содержимое обеих колб смешивают и добавляют 3,0 г пептона, 25 см^3 дрожжевого экстракта, 1,25 г калия фосфорнокислого двузамещенного, 5,0 г L-аргинин гидрохлорида, нагревают на водяной бане до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры 45—55 °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (6,3±0,2). Основу среды стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин и хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

Для приготовления питательной среды к 1 дм^3 расплавленной и охлажденной до 45—55 °С основы добавляют 5,0 см^3 стерильного обезжиренного молока, 100 см^3 суспензии углекислого кальция массовой концентрацией 30 г/дм^3 и 2 см^3 раствора бромкрезолового пурпурного массовой концентрацией 1 г/дм^3.

3.2.12. Среда Рогоза жидкая: в мерную колбу вместимостью 1,0 дм^3 помещают 10,0 г пептона, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 20,0 г глюкозы, 1,0 см^3 твина — 80, 6,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 2,0 г цитрата аммония, 25,0 г ацетата натрия, 1,32 см^3 ледяной уксусной кислоты, 0,575 г сульфата магния, 0,12 г сульфата марганца ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$), 0,034 г сульфата железа, доливают до метки дистиллированную воду, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (5,4±0,1). Среду разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. Пробирки с питательной средой хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

3.2.13. Среду Рогоза агаризованную готовят по рецептуре, описанной в п. 3.2.12, с добавлением 20,0 г агара. После растворения компонентов среду разливают в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

3.2.14. Среду из томатного сока готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.15. Среда для определения псевдокаталазы: в мерную колбу вместимостью 1 дм^3 помещают 5,0 пептона, 25 см^3 дрожжевого экстракта, 0,5 см^3 твина — 80, 0,1 г ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), 0,5 г глюкозы, 15 г агара доливают мясо-пептонным бульоном до метки, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (6,9±0,1). Среду разливают в пробирки по 5—7 см^3 и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин. После стерилизации пробирки укладывают на наклонную поверхность для получения косяков.

3.2.16. Среда Lee:

основа среды — в мерную колбу вместимостью 1 дм^3 помещают 10,0 г пептона, 50 см^3 дрожжевого экстракта, 5,0 г лактозы, 3,0 г углекислого кальция, простерилизованного по ГОСТ 10444.1, 0,5 г Na_2HPO_4, 18 г агара, доливают дистиллированной водой до метки, растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,0±1). Среду стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 20 мин и, при необходимости, хранят при температуре (4±1) °С не более 30 сут.

Для приготовления питательной среды к 1 дм³ основы добавляют 20 см³ стерильного раствора бромкрезолового пурпурного с массовой концентрацией 1 г/дм³, перемешивают и разливают в чашки Петри. Среду хранят при температуре (4±1) °С не более 7 сут.

3.3. Приготовление питательных сред для испытания кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий

3.3.1. *Приготовление гидролизованного молока*

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят или обрабатывают текучим паром в течение 20 мин и охлаждают до температуры (45±2) °С. Доводят активную кислотность до pH (7,7±0,1), добавляя водный раствор с массовой долей $NaOH$ 40%. К 1000 см³ молока добавляют от 0,5 до 1,0 г порошка панкреатина. Затем к молоку добавляют от 5 до 6 см³ хлороформа. Колбу закрывают корковой пробкой и выдерживают при температуре (40±2) °С в течение 18—24 ч. В течение первых 3—5 ч молоко 2—3 раза премешивают (пробку после перемешивания приоткрывают для удаления хлороформа).

Затем гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 1, устанавливают активную кислотность pH (7,1±0,1), добавляя водный раствор с массовой долей $NaOH$ 40% и используют для приготовления агара с гидролизованным молоком. В случае хранения гидролизованное молоко стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

3.3.2. *Приготовление агара с гидролизованным молоком*

Состав:

гидролизованное молоко, см³ — 1000;
агар, г — 15.

К 1000 см³ гидролизованного молока прибавляют 15 г агара. Среду нагревают до полного расплавления агара и фильтруют через вату, разливают в пробирки или колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение (10±1) мин.

3.3.3. *Приготовление стерильного обезжиренного молока*

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко разливают по 10 см³ в пробирки и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение (10±1) мин.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Проведение испытания пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий)

4.1.1. Для определения микроорганизмов используют подготовленную пробу продукта или его исходное разведение.

Для определения присутствия и подсчета количества микроорганизмов на чашках Петри из пробы пищевого продукта или из исходного разведения готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта.

Для подсчета НВЧ из пробы пищевого продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений таким образом, чтобы в посевах наибольшего разведения микроорганизмы не были обнаружены. Для посева выбирают не менее трех последовательных разведений. Из каждого разведения засевают три параллельные пробирки.

4.1.2. Для посева в жидкие среды по методу НВЧ и на чашки Петри глубинным методом отбирают по 1,0 см³ подготовленной пробы продукта и (или) его разведения, для посева на чашки Петри поверхностным методом — по 0,1—0,2 см³.

Посевы глубинным или поверхностным методами, а также с применением мембранной фильтрации проводят по ГОСТ 26670.

При применении метода мембранных фильтров фильтруют объем жидкого продукта, который указан в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта.

4.1.3. Для определения присутствия или подсчета НВЧ молочнокислых микроорганизмов проводят посев на одну из жидких сред, указанных в пп. 3.2.2, 3.2.6 или 3.2.12.

Если после внесения продукта в среду Бликфельдта среда изменит цвет, то в нее добавляют несколько капель раствора стерильной щелочи ($NaOH$ или KOH) массовой концентрацией 50 г/дм³ до восстановления первоначальной окраски.

Для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов допускается взамен посева в жидкие среды проводить посев глубинным методом в одну из агаризованных сред, указанных в пп.3.2.1, 3.2.5, 3.2.7, 3.2.13 или 3.2.14.

Для определения присутствия или подсчета НВЧ бактерий рода Lactobacillus проводят посев на одну из жидких сред, указанных в пп. 3.2.6 или 3.2.12.

Для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Lactobacillus взамен посева в жидкие среды проводят посев глубинным методом в одну из агаризованных сред, указанных в пп. 3.2.7 или 3.2.13.

Для определения присутствия бактерий рода Leuconostoc проводят посев на жидкую среду, указанную в п. 3.2.4.

Для определения присутствия взамен использования жидкой среды, а также для подсчета количества бактерий рода Leuconostoc на чашках Петри или с применением метода мембранной фильтрации проводят посев поверхностным методом на агаризованную среду, указанную в п. 3.2.10.

Для определения присутствия или подсчета количества стрептококков группы N рода Streptococcus проводят посев глубинным методом в агаризованную среду, указанную в п. 3.2.11, а для S.thermophilus используют среду по п. 3.2.16.

Для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Pediococcus проводят посев глубинным методом в агаризованную среду, указанную в п. 3.2.3.

4.1.4. Посевы для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов, бактерий родов Lactobacillus стрептококков группы N рода Streptococcus инкубируют не более 5 сут при температуре (30±1) °С или не более 3 сут при температуре (37±1) °С; посевы для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Leuconostoc инкубируют не более 5 сут при температуре (22±1) °С. Посевы для определения присутствия или подсчета количества S.thermophilus инкубируют (48±3) ч при температуре (45±1) °С. Посевы на чашках Петри для определения присутствия или подсчета количества бактерий рода Leuconostoc инкубируют дном вниз.

Инкубирование посевов на жидких средах прекращают при появлении видимых признаков роста.

Предварительный подсчет колоний на агаризованных средах проводят через 48 ч.

4.1.5. В посевах на агаризованных средах для определения присутствия или подсчета количества молочнокислых микроорганизмов, бактерий рода Lactobacillus, Pediococcus стрептококков группы N рода Streptococcus, S.thermophilus, ограничение доступа осуществляют по ГОСТ 30425 или одним из указанных ниже способов:

на застывшую питательную среду в чашках Петри наливают второй слой расплавленной и охлажденной до (45±1) °С агаризованной среды в количестве 5,0 см^3 и оставляют до затвердения;

чашки Петри помещают в газовую среду, состоящую из 95% N_2 и 5% CO_2;

чашки Петри помещают в анаэростат. Аппарат закрывают, с помощью вакуумного насоса создают вакуум 86,6—93,3 кПа;

в каждую пробирку с жидкой средой добавляют стерильный жидкий парафин в количестве, необходимом для получения столба высотой около 2 см.

4.1.6. Посевы на жидких средах ежедневно просматривают и отбирают пробирки с видимыми признаками роста. Характер роста на жидких средах приведен в приложении 2. Из пробирок с признаками роста проводят пересев на агаризованные среды (см. п. 4.1.3) бактериологической петлей так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют по п. 4.1.4.

4.1.7. Посевы на агаризованных средах после инкубирования просматривают и для подсчета отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

При определении количества микроорганизмов методом мембранных фильтров допускается проводить отбор чашек Петри для подсчета, если на фильтрах выросло менее 15 характерных колоний.

Характеристика характерных колоний приведена в приложении 2.

4.1.8. Для подтверждения принадлежности характерных колоний к молочнокислым микроорганизмам или бактериям одного из родов Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus стрептококкам группы N рода Streptococcus, S.thermophilus, отбирают из посевов по п. 4.1.7 или 4.1.6 не менее 5 характерных колоний. Принадлежность каждой отобранной колонии к определенным микроорганизмам устанавливают по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы, дополнительно при идентификации бактерий рода Leuconostos определяют наличие капсул, при идентификации стрептококков вида S.thermophilus и стрептококков группы N рода Streptococcus — наличие роста в мясопептонном бульоне с pH 9,6 и в мясопептонном бульоне с 6,5% NaCl.

4.1.8.1. Для определения отношения микроорганизмов к окраске по Граму из колоний приготавливают мазки, окрашивают их по ГОСТ 30425 и микроскопируют.

4.1.8.2. Для изучения подвижности микроорганизмов из колоний приготавливают препараты методом висячей или раздавленной капли и микроскопируют. Результаты микроскопирования оценивают в соответствии с приложением 1.

4.1.8.3. Каталазную активность культур определяют по ГОСТ 30425.

Результаты определения каталазной активности оценивают в соответствии с приложением 1.

Разложение перекиси водорода у бактерий рода Pediococcus возможно за счет фермента псевдокаталазы. Поэтому при определении молочнокислых микроорганизмов или бактерий рода Pediococcus в случае, если в характерных колониях обнаружены грамположительные, неподвижные микроорганизмы, дающие положительную каталазную реакцию, контролируют отсутствие цитохромов путем постановки бензидинового теста. Для этого выросшие на чашках Петри колонии бактерий 24—48-часового возраста заливают раствором бензидина, указанным в п. 3.1.9. После того, как раствор пропитает колонии, прибавляют в чашку приблизительно такой же объем 5%-ной перекиси водорода. Молочнокислые микроорганизмы, в том числе бактерии рода Pediococcus, не содержат цитохромов. В случае присутствия цитохромов колонии окрашиваются в голубовато-зеленый или ярко-голубой цвет.

При отсутствии бензидина допускается проводить определение наличия псевдокаталазы на среде п. 3.2.15 с низкой концентрацией глюкозы — 0,05%.

Посевы инкубируют по п. 4.1.4, определение псевдокаталазы проводят также как и каталазы по ГОСТ 30425.

Культуры, образующие псевдокаталазу, относят к роду Pediococcus.

4.1.8.4. При идентификации бактерий рода Leuconostoc готовят препараты и окрашивают их по Бури для выявления бактериальных капсул. Для этого на хорошо обезжиренном и обожженном предметном стекле смешивают каплю бактериальной культуры с мелким порошком черной туши или суспензией нигрозина.

С помощью другого стекла со шлифованными краями быстро готовят тонкий мазок, который фиксируют, несколько раз проводя его через пламя горелки. Мазок докрашивают раствором кристаллического фиолетового или рабочим раствором карболфуксина. Осторожно промывают в сосуде с водой, оставляют на воздухе для высыхания и микроскопируют. Не допускается сушить мазок между листами фильтровальной бумаги. Фон препарата окрашивается тонкой суспензией черной туши или нигрозина. Тела бактерий окрашиваются монохроматично, капсулы остаются неокрашенными.

4.1.8.5. При идентификации стрептококков группы N рода Streptococcus, стрептококков вида S. thermophilus определяют отсутствие роста на мясопептонном бульоне с pH 9,6 и на мясо-пептонном бульоне с содержанием хлористого натрия 6,5%.

Для этого культуры по п. 4.1.8 пересевают на среды, указанные в пп. 3.2.8 и 3.2.9.

Посевы инкубируют при температуре (30±1) °С в течение 3 сут, а при идентификации S. thermophilus посевы инкубируют при (45±1) °С в течение 3 сут.

4.2. Проведение испытания кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий

4.2.1. Приготовление разведений кисломолочных продуктов (сухих и жидких) по ГОСТ 9225.

Для приготовления разведений заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий края флакона и пакета протирают спиртом, край флакона обжигают и вынимают пробку, край пакета надрезают профламбированными ножницами, отвешивают 1 г испытуемого материала в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую крышкой от чашки Петри или стерильной бумагой, тщательно растирают, добавляя небольшое количество раствора хлористого натрия или фосфатного буфера из колбы, содержащей 99 см^3 раствора или буфера. Суспензированный материал переливают в колбу с оставшимся раствором хлористого натрия или фосфатного буфера и получают второе разведение 1 : 100.

И вторых разведений кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочно-кислых бактерий готовят следующие разведения в соответствии с количеством молочнокислых бактерий, указанным в нормативно-технической документации, пользуясь табл. 1.

Таблица 1

Наименование продукта	Разведения, используемые для посева
Кисломолочные напитки, закваски жидкие и сухие, творог, сметана	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9}
Бактериальные концентраты, бактериальные препараты молочнокислых бактерий	10^{-9}; 10^{-10}; 10^{-11}
Сухие кисломолочные продукты	10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}

4.2.2. Посев для подсчета количества молочнокислых стрептококков проводят в агаризованную или жидкую питательную среду, приготовленную в соответствии с пп. 3.3.2 и 3.3.3, а посев для подсчета количества молочнокислых палочек — в жидкую среду, приготовленную в соответствии с п. 3.3.3.

Для посева в агаризованную питательную среду выбирают те разведения, при посеве которых на чашках вырастает от 15 до 150 колоний.

Из каждой пробы делают посев по ГОСТ 9225 1 см^3 соответствующих разведений продукта (см. табл. 1) на чашки Петри.

При посеве в жидкую питательную среду из трех-четырех последних разведений (см. табл. 1) вносят по 1 см^3 каждого разведения в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком.

4.2.3. Пробирки или чашки Петри с посевами помещают в термостат и инкубируют при температуре (30±1) °С для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий, при температуре (40±1) °С для подсчета термофильных молочнокислых бактерий и при (32±1) °С для совместного подсчета мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий. Посевы инкубируют в течение 72 ч.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Обработка результатов анализа пищевых продуктов (кроме кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов, бактериальных препаратов молочнокислых бактерий)

5.1.1. Результаты анализа пищевого продукта оценивают по каждой пробе отдельно.

5.1.2. Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств при определении:

молочнокислых микроорганизмов обнаружены грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки или неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к молочнокислым;

бактерий рода Lactobacillus обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Lactobacillus;

бактерий рода Leuconostoc обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные, окруженные капсулой кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Leuconostoc;

бактерий рода Streptococcus группы N обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с pH 9,6 и 6,5% NaCl, кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Streptococcus группы N;

бактерий рода Pediococcus обнаружены неспорообразующие,грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные (или каталазоположительные, но дающие отрицательный бензидиновый тест) или псевдокаталазоположительные кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду Pediococcus;

бактерий вида S.thermophilus обнаружены неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные, термофильные кокки, не дающие роста в питательных средах с pH 9,6 и

6,5% NaCl, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к виду Streptococcus thermophilus.

5.1.3. Если при подтверждении характерных колоний в 80% случаев, то есть не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост определенных групп или родов микроорганизмов, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке, принадлежат к этой группе, роду или виду. В остальных случаях количество микроорганизмов определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения.

5.1.4. При определении НВЧ или при посеве продукта на жидкие среды пробирки считаются положительными, если при последующем пересеве на агаризованные среды и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной характерной колонии обнаружены микроорганизмы определяемых групп, родов или видов.

5.1.5. Наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов определяют по количеству положительных пробирок по ГОСТ 30425.

Если десятикратные разведения, выбранные для посева были более высокими, например 10^{-3}, 10^{-4} и 10^{-5}, то табличное значение НВЧ умножают на разницу между выбранными и табличными десятикратными разведениями, то есть на 100.

Если десятикратные разведения, выбранные для посева, были более низкими, например 10^{0} (1 г), 10^{-1}, 10^{-2}, то табличное значение НВЧ делят на разницу между выбранными и табличными десятикратными разведениями, то есть на 10.

5.1.6. Результаты определения количества микроорганизмов методом посева в чашки Петри или методом НВЧ или с применением метода мембранной фильтрации пересчитывают на 1 г или 1 см^3 продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670.

5.1.7. Результаты определения присутствия микроорганизмов в определенной навеске продукта выражают следующим образом: молочнокислые микроорганизмы (при необходимости указывается род или вид) обнаружены или не обнаружены в навеске продукта.

5.2. Обработка результатов анализа кисломолочных продуктов, заквасок, бактериальных концентратов и бактериальных препаратов молочнокислых бактерий.

5.2.1. При развитии молочнокислых бактерий на жидкой среде-молоке оно свертывается.

Для подсчета общего количества молочнокислых бактерий (стрептококков и палочек) отмечают три последних разведения, в которых молоко свернулось.

Составляют числовую характеристику. Она состоит из трех цифр,указывающих число пробирок со свернувшимся молоком в трех последних разведениях. Первая цифра числовой характеристики соответствует тому разведению, при котором в двух пробирках молоко свернулось. Следующие цифры обозначают число пробирок со свернувшимся молоком в двух последующих разведениях.

По числовой характеристике по табл. 2 находят наиболее вероятное число молочнокислых микроорганизмов, которое умножают на то разведение, с которого начинается первая цифра числовой характеристики.

Таблица 2

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при заражении двух параллельных пробирок	Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при заражении двух параллельных пробирок
001	0,5	200	2,5
010	0,5	201	5,0
011	0,9	210	6,0
020	0,9	211	13,0
101	1,2	212	20,0
110	1,3	220	25,0
120	2,0	221	70,0
121	3,0	222	110,0

В таблицу не включены неприемлемые комбинации.

Полученное число соответствует количеству клеток молочнокислых бактерий в 1 г или 1 см^3 продукта.

Пример расчета наиболее вероятного числа микроорганизмов при заражении двух параллельных пробирок приведен в приложении 3.

Если необходимо определить дифференцированно количество стрептококков и палочек,то из пробирок, в которых молоко свернулось, делают микроскопический препарат по ГОСТ 9225, просматривают его и отдельно отмечают пробирки, в которых есть палочки и стрептококки.

Подсчет количества молочнокислых стрептококков или палочек проводят, как указано выше.

5.2.2. Подсчет количества выросших колоний молочнокислых бактерий на агаризованной среде и пересчет их содержания в 1 г или 1 $см^3$ продукта проводят по ГОСТ 9225.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
Справочное

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Наименование микроорганизмов	Характеристика
Молочнокислые микроорганизмы (за исключением рода Sporolactobacillus идентифицируемого по ГОСТ 30425)	Неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки или неспорообразующие, грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки
Бактерии рода Lactobacillus	Грамположительные, неспорообразующие короткие или длинные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки
Слизеобразующие бактерии рода Leuconostoc	Грамположительные, неспорообразующие, имеющие сферическую или овальную форму, располагающиеся попарно или в цепочках, окруженные капсулой, которая по Граму не окрашивается, неподвижные каталазоотрицательные кокки
Стрептококки группы N рода Streptococcus	Грамположительные, неспорообразующие, располагающиеся в виде коротких и длинных цепочек, неподвижные, каталазоотрицательные, не дающие роста в питательных средах с pH 9,6 и 6,5% NaCl кокки
Бактерии рода Pediococcus	Грамположительные, неспорообразующие, располагающиеся парами и тетрадами, неподвижные, каталазоотрицательные или образующие псевдокаталазу кокки
Стрептококки вида S.thermophilus	Грамположительные, располагающиеся парами или в виде коротких или длинных цепочек, неподвижные, каталазоотрицательные, термофильные, не дающие роста в питательных средах с pH 9,6 и 6,5% NaCl кокки

ПРИЛОЖЕНИЕ 2
Справочное

ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОНИЙ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА АГАРИЗОВАННЫХ И ХАРАКТЕР РОСТА НА ЖИДКИХ СРЕДАХ

Микроорганизмы	Питательная среда	Характеристика колоний или характер роста на жидкой среде
Молочнокислые микроорганизмы	Бликфельдта жидкая	Изменение цвета среды от фиолетового до желтого, помутнение среды или образование осадка, возможно выделение газа
	Бликфельдта агаризованная, среда из томатного сока	Колонии мелкие гладкие или шероховатые
	Капустный агар	Колонии окружены прозрачной зоной
Молочнокислые бактерии рода Lactobacillus или молочнокислые микроорганизмы	Рогоза и МРС агаризованные	Колонии бесцветные диаметром от 1 до 3 мм линзовидной или звездообразной формы
	Рогоза и МРС жидкие	Помутнение среды
Молочнокислые бактерии рода Leuconostoc	Агар питательный с сахарозой	Колонии выпуклые, округлые, слизистые. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи
Молочнокислые бактерии рода Streptococcus группы N	Редди	S.lactis образует колонии белые, мелкие, круглые, вокруг колоний могут быть зоны просветления
		S.cremoris колонии мелкие, желтые, эллипсовидные
Молочнокислые бактерии рода Pediococcus	Среда Бригс в модификации Шарп	Колонии мелкие, гладкие или шероховатые
Молочнокислые стрептококки вида S.thermophilus	Среда Lee	Колонии желтые, круглые или эллипсовидные, вокруг которых наблюдаются зоны просветления

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
Справочное

ПРИМЕР РАСЧЕТА НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНОГО ЧИСЛА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ПРЕДЕЛЬНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ

Пример 1.

Взяты разведения	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Число пробирок с посевами	2	2	2	2
Число пробирок со свернувшимся молоком	2	2	1	1

Составляют числовую характеристику. Она состоит из трех цифр, указывающих число пробирок со свернувшимся обезжиренным молоком в трех последних разведениях. Первая цифра (слева) числовой характеристики — 2 (свернулись 2 пробирки разведения 1 : 100), вторая — 1 и третья — 1.

Следовательно, числовая характеристика будет 211. Она соответствует по табл. 2 числу 13,0. Это число надо умножить на то разведение, с которого начиналась первая цифра числовой характеристики (в примере это разведение равно 1 :100).

Таким образом в 1 см^3 содержится 1300 молочнокислых бактерий ($13{,}0 \cdot 100 = 1300$).

Пример 2.

Взяты разведения	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000
Число пробирок с посевами	2	2	2	2
Число пробирок со свернувшимся молоком	2	2	2	1
Стрептококки обнаружены в микроскопических препаратах следующих разведений	+ +	+ +	+ +	+ —
Молочнокислые палочки обнаружены в микроскопических препаратах следующих разведений	+ +	+ +	— —	— —

Числовая характеристика равна для: стрептококков 221
палочек 220
Вероятное число микробов равно для стрептококков 70
палочек 25

Умножая на разведение, получаем количество стрептококков в 1 см^3 — 7000, палочек — 250.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР**

РАЗРАБОТЧИКИ

В. И. Рогачев, д-р техн. наук; **Н. Н. Мазохина,** канд. биол. наук; **Б. И. Голод,** канд. биол. наук; **Р. А. Волкова; Г. Н. Дронова; Я. И. Костин,** канд. техн. наук; **В. Ф. Семенихина,** канд. биол. наук; **И. В. Рожкова,** канд. техн. наук; **М. Б. Сундукова,** канд. техн. наук

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 28.11.89 № 3502**

3. **Срок первой проверки — III кв. 1994 г.**
Периодичность проверки — 5 лет

4. **ВЗАМЕН ГОСТ 10444.11—75**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 5541—76	2	ГОСТ 13264—88	2
ГОСТ 6672—75	2	ГОСТ 20015—88	2
ГОСТ 8756.18—70	1.2	ГОСТ 24104—88	2
ГОСТ 9225—84	1.1, 2, 4.2.1, 4.2.2, 5.2.1, 5.2.2	ГОСТ 25706—83	2
ГОСТ 9284—75	2	ГОСТ 26668—85	1.1
ГОСТ 10444.1—84	2, 3.1.2, 3.1.10, 3.2.1, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.8, 3.2.9, 3.2.14, 3.2.16	ГОСТ 26669—85	1.1, 1.2, 3.1.6, 3.1.7
ГОСТ 10970—87	2	ГОСТ 26670—91	3.1.8, 4.1.2, 5.1.6
		ГОСТ 30425—97	4.1.5, 4.1.8.1, 4.1.8.3, 5.1.5, приложение 1

6. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 5—94 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12—94)**

7. **ПЕРЕИЗДАНИЕ**