



НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ

ЦУКОР

Методи визначання мікробіологічних показників

ДСТУ 4323:2004

Видання офіційне

БЗ № 5-2004/176

Київ
ДЕРЖСПОЖИВСТАНДАРТ УКРАЇНИ
2005

ПЕРЕДМОВА

1 РОЗРОБЛЕНО: Український науково-дослідний інститут цукрової промисловості, ТК 56 «Цукор і крохмалепатокові продукти»

РОЗРОБНИКИ: **В. Штангєєв, Н. Іволга, К. Євреснко, О. Гриценко, Г. Михальчук**

2 ЗАТВЕРДЖЕНО ТА НАДАНО ЧИННОСТІ: наказ Держспоживстандарту України від 5 липня 2004 р. № 132

3 Національний стандарт відповідає Publication «Methods Book», 1994 of International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis ICUMSA в частині методів GS2/3-43(1998) The Determination of the Total Mesophilic Bacterial Count in Refined Sugar Products by the Pour Plate Method (Визначання загальної кількості бактерій в рафінованих цукрових продуктах методом заливання живильного середовища на чашки Петрі), GS2/3-47(1998) The Determination of Yeasts and Moulds in Refined Sugar Products by the Pour Plate Method or the Membrane Filter Method (Визначання дріжджів і плісені в рафінованих цукрових продуктах методами заливання живильного середовища на чашки Петрі чи мембранного фільтрування)

Ступінь відповідності — модифікований (MOD)

Переклад з англійської — (en)

4 УВЕДЕНО ВПЕРШЕ

Право власності на цей документ належить державі.
Відтворювати, тиражувати і розповсюджувати його повністю чи частково
на будь-яких носіях інформації без офіційного дозволу заборонено.
Стосовно врегулювання прав власності треба звертатися до Держспоживстандарту України

Держспоживстандарт України, 2005

ЗМІСТ

	С.
Національний вступ	IV
1 Сфера застосування	1
2 Терміни та визначення понять	1
3 Суть методу.....	1
4 Розчинники, живильне середовище, реактиви та інші речовини	2
5 Лабораторне приладдя та скляний посуд	3
6 Відбір проби	3
7 Випробовування	4
8 Опрацьовування результатів	4
Додаток НА Бібліографія	6

НАЦІОНАЛЬНИЙ ВСТУП

Розроблення національних стандартів, згармонізованих з європейськими та міжнародними нормами та правилами, зокрема, введення єдиних загальнозовживаних методів аналізування цукру, зумовлено прагненням України увійти до Європейського Союзу (ЄС) як повноправного торгового партнера. Використовування єдиних погоджених критеріїв і методів оцінювання якості продукції, її безпечності та ідентифікації, а також одержування точних порівнювальних даних дає споживачу гарантію якості продукції.

Методи, описані в цьому стандарті, є переклад GS2/3-43(1998) (Визначання загальної кількості мезофільних бактерій в рафінованих цукрових продуктах методом заливання живильного середовища на чашки Петрі) та GS2/3-47(1998) (Визначання дріжджів і плісені в рафінованих цукрових продуктах методами заливання живильного середовища на чашки Петрі чи мембранного фільтрування), які впроваджено Міжнародною комісією з уніфікації методів аналізування цукру з окремими технічними відхилами. Оскільки опублікування методики в Україні трансформується в стандарти, що потребує відповідних змін щодо оформлення тексту, то до тексту додано національний додаток стосовно цитованих нормативних документів (додаток НА)

Технічний комітет, відповідальний за цей стандарт, — ТК 56 «Цукор і крохмалепаточкові продукти».

Цей стандарт розроблено на основі двох методик, ідентичних за способом готування проб, проведення випробовування, обробленням результатів; зміст методики GS2/3-47 посиляється на методику GS2/3-43 без змін, що дасть змогу ефективніше користуватися стандартом.

На сьогодні на методи визначання мікробіологічних показників чинний ГОСТ 26968–86, згідно з якого колонії мезофільних бактерій, дріжджів і плісені визначають методом заливання живильного середовища на чашки Петрі. Цей стандарт, розроблено на основі міжнародної методики ICUMSA, передбачає під час визначання дріжджів і плісені використовувати прогресивніший метод мембранної фільтрації.

Стандарт чинний поряд з ГОСТ 26968–86.

Стандарт містить вимоги, що відповідають чинному законодавству.

До стандарту внесено такі редакційні зміни, спричинені правовими вимогами:

- назву стандарту наведено відповідно до вимог національної стандартизації;
- розділ 1 об'єднано з розділом 2 згідно з вимогами чинного законодавства;
- розділ «Реактиви» доповнено реактивами «ортофосфорна кислота», «λ–нафтол», так як ці реактиви використовують для приготування хроматографічного розпилювального реактиву;
- розділ «Апаратура» доповнено переліком лабораторного приладдя, що використовується для установки для фільтрування;
- структурні елементи стандарту: «Обкладинку», «Передмову», «Зміст», «Національний вступ» — оформлено відповідно до вимог національної стандартизації України;
- позначки одиниць вимірювання відповідають серії стандартів ДСТУ 3651–1997 Метрологія. Одиниці фізичних величин.

НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ

ЦУКОР

Методи визначання мікробіологічних показників

САХАР

Методы определения микробиологических показателей

SUGAR

Methods of microbiological indices determination

Чинний від 2005–10–01

1 СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Цей стандарт поширюється на білий цукор-пісок і установлює методи визначання загальної кількості мезофільних бактерій, дріжджів і плісені.

Під час визначання колоній мезофільних бактерій і значної кількості дріжджів і плісені використовують метод заливання живильного середовища на чашки Петрі, а у разі незначної кількості мікроорганізмів — метод мембранного фільтрування.

2 ТЕРМІНИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ

2.1 кількість колоній бактерій, дріжджів і плісені (*colony counts*)

Кількість колонієутворювальних одиниць (КТО). Результат виражають на 10 г цукру

2.2 мезофільні бактерії, дріжджі і плісені (*mesophilic bacteria*)

Оптимальний ріст мезофільних бактерій спостерігають у діапазоні температури від 20 °C до 45 °C. Вибрана інкубаційна температура являє собою середню температуру, за якої проходить оптимальний ріст бактерій. Умови, що сприяють ростові широкого спектра бактерій, визначають під час використання загального живильного середовища.

Дріжджі і плісень являють собою мікроорганізми, що утворюють колонії за температури 30 °C в селективному середовищі за низького значення рН ($\text{pH} < 5$) чи в присутності антибіотика. Таке середовище забезпечує ріст дріжджів і плісені та пригнічує ріст бактерій

2.3 пластини для заливання (*pour plate*)

Пластини, засіяні змішуванням певної кількості розведеної проби з рідким агаровим середовищем, (47 °C)

2.4 мембранний фільтр (*membrane filter*)

Стерильний фільтр з певним розміром пор, що затримують мікроорганізми на своїй поверхні для подальшого росту.

3 СУТЬ МЕТОДУ

Під час визначання використовують стерильне обладнання і асептичні способи.

3.1 Заливають живильним середовищем чашки Петрі. Це чашки, інокульовані за допомогою суміші певних кількостей розведеної проби і рідкого агарового середовища (47 °C).

3.2 Метод заливання пластин живильним середовищем

Залиті пластини готують, застосовуючи певне вибране живильне середовище. Розведені наважки проби цукру змішують із вибраним рідким середовищем у чашках Петрі і термостатують після затвердіння агарового середовища.

3.3 Метод заливання чашок Петрі живильним середовищем

Розведені наважки проби цукру змішують із невеликою кількістю охолодженого розплавленого агару в чашках Петрі. Потім ці чашки поміщають у термостат і підраховують кількість вирощених колоній.

3.4 Метод мембранного фільтрування (для визначання колоній дріжджів і плісені)

Мікроорганізми фільтрують через мембранний фільтр, а потім термостатують після перенесення мембрани на підготоване живильне середовище.

4 РОЗЧИННИКИ, ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, РЕАКТИВИ ТА ІНШІ РЕЧОВИНИ

4.1 Стерильна здистильована вода, оброблена в автоклаві за температури 121 °C протягом 15 хв.

4.2 Живильне середовище

4.2.1 Щоб визначити загальну кількість мезофільних бактерій, використовують живильний агар чи середовище для пластинчастих розведень:

Живильний агар (1 дм³):

М'ясний екстракт	1 г
Дріжджовий екстракт	2 г
Пептон	5 г
Хлорид натрію	5 г
Агар	15 г
pH	7,5

Середовище для пластинчастих розведень для підраховування мікроорганізмів (1 дм³):

Пептон	5 г
Дріжджовий екстракт	2,5 г
Глюкоза	1 г
Агар	10 г
pH	7,0

4.2.2 Щоб визначити кількість колоній дріжджів і плісені, використовують одне із таких трьох середовищ:

Суловий агар (1 дм³):

Солодовий екстракт	15 г
Пептон	0,78 г
Мальтоза	12,75 г
Декстрин	2,75 г
Гліцерин	2,35 г
Бісульфат калію	1 г
Хлорид амонію	1 г
Агар	15 г
pH	4,8

Дріжджовий екстракт-глюкоза-хлорамфенікол-агар (1 дм³):

Дріжджовий екстракт	5 г
Глюкоза	20 г
Хлорамфенікол	0,1 г
Агар	15 г
pH	6,6

Примітка 1. Замість хлорамфенікола можна застосовувати окситетрациклін. Так як окситетрациклін теплочутливий, його необхідно додавати в середовище безпосередньо перед використанням у вигляді фільтростерилізованого розчину.

Мікофіл агар (1 дм³):

Фітон пептон	10 г
Глюкоза	10 г
Агар	16 г
pH	4,0

Примітка 2. Величину pH доводять до 4,0, додавши на кожен кубічний дециметр розплавленого середовища 15 см³ стерильної молочної кислоти масовою часткою 10 % до проведення висівання на чашки.

4.3 Дезінфікувальний засіб для робочого місця.

4.4 Спирт для стерилізації полум'ям пристрою фільтрувальної лійки (5.13).

5 ЛАБОРАТОРНЕ ПРИЛАДДЯ ТА СКЛЯНИЙ ПОСУД

5.1 Лабораторне приладдя для сухої стерилізації скляного посуду за температури від 170 °C до 180 °C.

5.2 Автоклав для стерилізації води і живильного середовища, (121 ± 1) °C.

5.3 Чашки Петрі діаметром (90–100) мм, виготовлені зі стерильних відходів пластмаси чи скла.

5.4 Піпетки загальної призначеності місткістю 1 см³, поградуйовані піпетки місткістю від 1 см³ до 5 см³ і 10 см³.

5.5 Баня водяна чи подібний пристрій для підтримування температури (47 ± 1) °C.

5.6 Прилад для підраховування колоній.

5.7 pH-метр з похибкою вимірювання ± 0,1 pH за температури 25 °C.

5.8 Пробірки для приготування розведень.

5.9 Колби Ерленмейєра місткістю 200 см³ з відміткою 100 см³.

5.10 Пальник Бунзена.

5.11 Термостат, що працює за температури (30 ± 1) °C.

5.12 Склянки для середовища.

Для роботи за методом мембранного фільтрування необхідно використовувати допоміжне лабораторне приладдя, зокрема таке:

5.13 Лійка фільтрувальна, основа з опорою і затискачем. Їх можна виготовляти із неіржавіючої сталі, пластмаси, що витримує автоклавування, скла чи зі стерильних відходів пластмаси, діаметром 50 мм, місткістю 100 см³.

5.14 Колба місткістю 2 дм³ з боковим відводом для з'єднання з вакуум-насосом.

5.15 Вакуум-насос.

5.16 Пінцети для роботи з мембранами.

5.17 Мембрани стерильні з розміром пор 0,6 мкм, діаметром 45 мм.

6 ВІДБІР ПРОБ

У стерильний посуд відбирають представлені проби, мінімальна маса яких для цукру становить 200 г або 200 см³ для рідкого цукру. Проби зберігають доти, доки не буде закінчено аналізування.

7 ВИПРОБОВУВАННЯ

7.1 Готування до випробовування

Перед початком випробовування очищають та дезінфікують робоче місце. Стерильні чашки Петрі маркують датою, видом проби і типом середовища.

7.2 Готування середовища

7.2.1 Агарове середовище

Строго дотримуючись інструкції виготівника, проводять повторну гідратацію живильного середовища здистильованою чи zdeіонізованою водою. Розливають середовище в склянки і стерилізують за температури 121 °C протягом 15 хв.

Середовище, використовуване одразу, необхідно охолодити до 47 °C на водяній бані. У іншому разі його залишають для затвердіння і зберігають у темному місці за температури (0–5) °C протягом до 1 міс. Середовище можна розплавляти.

7.3 Готування скляного посуду

Скляний посуд повинен підлягати сухій стерилізації за температури від 170 °C до 180 °C протягом 1 год.

7.4 Готування проби

Поміщають 10 г кристалічного цукру (чи рідкого цукру в перерахунку на 10 г сухої речовини), дотримуючись асептичних способів, у колбу Ерленмейєра місткістю 200 см³. Додають стерильну воду до мітки 100 см³, добре струшують для розчинення і перемішування цукрового розчину.

7.5 Інокулювання і інкубування

Беруть дві стерильні чашки Петрі і в кожену з них поміщають піпеткою 1 см³ вихідного розчину проби цукру, підготованої відповідно до 7.4.

Наступні розведення готують із вихідного розчину (10⁻¹), додавши 1 см³ до 9 см³ стерильної води в пробірку для одержання ряду розчинів 10⁻², 10⁻³ тощо і висівають на чашки як описано вище.

У кожену чашку Петрі додають приблизно 15 см³ живильного середовища, призначеного для перевіряння його на стерильність.

Перевертають чашки і термостатують за температури 30 °C протягом (48–72) год для визначання кількості мезофільних бактерій і протягом 72 год для визначання кількості колоній дріжджів і плісєні.

Під час роботи за методом мембранного фільтрування колбу приєднують до вакуум-насоса. Стерилізують фільтрувальну лійку і основу полум'ям за допомогою спирту, якщо вони не були простерилізовані раніше. Після охолодження стерильним пінцетом мембрану поміщають на основу по центру лійки. Лійку установлюють на колбу.

Пробу цукру, приготовану відповідно до 7.4, заливають в лійку, вмикають вакуум-насос і фільтрують. Промивають лійку стерильною водою. Знімають лійку і за допомогою стерильного пінцета, обробленого полум'ям, поміщають мембрану на живильне середовище в чашку Петрі. У цьому разі стежать, щоб між ними не потрапили бульбашки повітря.

Перевертають чашки і термостатують за температури 30 °C протягом 72 год.

8 ОПРАЦЬОВУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Кількість колоній на кожній чашці, якщо їх не більше ніж 150, підраховують за допомогою приладу для підраховування колоній. Для чашок із вмістом колоній більше ніж 200 потрібно проводити розведення. Для кількості колоній менше ніж 10 рекомендовано застосовувати метод мембранного фільтрування.

Дріжджі непрозорі, білого, жовтого чи рожевого кольору, а плісєні утворюють міцелій, частише білого кольору з чорними, коричневими чи зеленими спорами.

Величина КТО в 10 г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на 10 г сухої речовини обчислюється за формулами:

8.1 Метод заливання живильного середовища на чашки Петрі

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \text{КТО/г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на суху речовину},$$

де $\sum c$ — сума колоній, підрахованих на всіх чашках;

n_1 — кількість чашок, підрахованих під час першого розведення;

n_2 — кількість чашок, підрахованих під час другого розведення;

d — розведення, за якого були одержані перші підраховування (10^{-1}).

Приклади:

1 Інкубування було проведено в 2 чашках Петрі для одного розведення.

Розведення 10^{-1} 1 чашка = 99 КТО

2 чашка = 114 КТО

$$\frac{99 + 114}{2 \cdot 10^{-1}} = \frac{213}{0,2} = 1065 \text{ КТО/г}$$

Для 10 г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на суху речовину результат матиме вигляд:

$$1,065 \cdot 10^4 \text{ КТО/10 г}$$

Результат округлюють до $1,1 \cdot 10^4$ КТО/10 г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на суху речовину.

2 Інкубування було проведено в 2 чашках Петрі для кожного розведення.

Розведення 10^{-1} 1 чашка = 97 КТО

2 чашка = 110 КТО

Розведення 10^{-2} 1 чашка = 35 КТО

2 чашка = 46 КТО

$$\frac{97 + 110 + 35 + 46}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-1}} = \frac{288}{0,22} = 1309 \text{ КТО/г}$$

Для 10 г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на суху речовину результат матиме вигляд:

$$1,309 \cdot 10^4 \text{ КТО/10 г}$$

Результат округлюють до $1,3 \cdot 10^4$ КТО/10 г цукру чи рідкого цукру в перерахунку на суху речовину.

8.2 Мембранне фільтрування

$$\frac{\sum c}{n} \text{ КТО/10 г цукру чи в перерахунку на суху речовину},$$

де $\sum c$ — сума колоній на всіх пластинах;

n — кількість пластин.

ДОДАТОК НА

(довідковий)

БІБЛІОГРАФІЯ

- 1 Proc. 15th Session ICUMSA, 1970, 222—223
- 2 Proc. 16th Session ICUMSA, 1974, 274—289
- 3 Proc. 19th Session ICUMSA, 1986, 356—376
- 4 Proc. 20th Session ICUMSA, 1990, 291—309
- 5 Schneider F, ed, (1979): Sugar Analysis, ICUMSA Methods, 154—158
- 6 ISO 4833, 1991, Microbiology — General guidance for the enumeration of microorganism colony count technique at 30 °C
- 7 Proc. 17th Session ICUMSA, 1978, 329—340
- 8 ISO 7218 (1996): Microbiology of food and animal feedingstuffs — General rules for microbiological examinations
- 9 Alcohol-free Soft Drinks Handbook, Vol 1, 1993, 39—83, Sudzucker, Mannheim/Ochsenfurt (in German)
- 10 ISO 4833 (1991): Microbiology — General guidance for the enumeration of microorganism colony count technique
- 11 Baumgart I (1990): Microbiology Research in Food Technology, Behr Press, Hamburg (in German).

УКНД 67.180.10

Ключові слова: цукор-пісок, дріжджі, плісень, мезофільні бактерії, чашки Петрі, мембрани, живильне середовище.

Редактор **Ю. Грек**
Технічний редактор **О. Касіч**
Коректор **Т. Нагорна**
Верстальник **Н. Ковальова**

Підписано до друку 20.06.2005 Формат 60 × 84 1/8.
Ум. друк. арк. 0,93. Зам. Ціна договірна.

Науково-редакційний відділ ДП «УкрНДНЦ»
03115, Київ, вул. Святошинська, 2