

Министерство промышленности, торговли и транспорта
Республика Мали
Один народ – одна цель – одна вера

Нормативный документ Мали M.N.-01-03/003:2000

Злаки, зерновые культуры и продукты их переработки:
Перечень бактерий, дрожжей и плесени

Теги: сельскохозяйственная продукция, зерновая продукция, зерно злаков, пшеница, микробиологический анализ, определение, микроорганизм, бактерия, дрожжи, анализы, грибки
Государственный совет по нормированию и контролю качества
Секретариат: Государственное управление промышленности
BP.278 Бамако. Тел.: (223) 22.57.56 Факс: (223) 22.61.37 Эл. почта: dnind@datatech.toolnet.org

Предисловие

Государственный совет по нормированию и контролю качества (ГСНKK, CNNCQ) Республики Мали, созданный в соответствии с Законом №92-013 P-RM, имеет в качестве руководителя Министра промышленности, который в этом качестве несёт ответственность за все вопросы государственного масштаба, относящиеся к нормированию. Особенности организации и деятельности Совета установлены в Декрете №92-235/P-RM от 1 декабря 1992 г.

Указ №0642/MICT-DNI от 14 февраля 1994 года устанавливает состав Совета. Поимённый список его членов указан в Решении №99-007/MICA-SG от 2 апреля 1999 г.

Государственное управление по сельскому хозяйству обеспечивает работу Секретариата ГСНKK; в связи с этим в его обязанности входит координация работ по нормализации с Техническими комитетами.

Технический комитет «зерно и продукты его переработки» создан Указом №94-0643/MICT-DNI от 14 февраля 1994 г. для проведения всех работ по нормированию в данной области. Руководит комитетом Главное управление по регламентации и контролю; комитет включает в себя 25 членов – представителей Администрации, Университета Мали, учреждений высшего профессионального образования, участников рынка и профессиональными организациями отрасли, исследовательских учреждений, аналитических лабораторий, потребителей и т.д.

В соответствии с программой деятельности, принятой Государственным советом по нормированию и контролю качества в ходе заседания 14 октября 1999 г., Технический комитет, основываясь на международной норме ISO, разработал и принял проект малийской нормы, который был вынесен на общественное обсуждение Государственным управлением промышленности. Полученные в ходе обсуждения замечания и предложения способствовали улучшению проекта нормы, после чего он был подан в Совет для принятия в виде обязательной или добровольной нормы.

Настоящая норма была принята как добровольная и будет выступать ориентиром в вопросах требований по качеству для профессионалов отрасли, потребителей, а также учреждений по анализу и контролю.

О ВВЕДЕНИИ

Перечень бактерий, дрожжей и плесени злаков, зерновых культур и продуктов их переработки позволяет оценить содержание в них микроорганизмов и, в зависимости от поставленной цели, определить свойства этой микрофлоры либо для оценки гигиенических качеств партии, либо для прослеживания развития флоры для оценки эффективности того или иного типа хранения, либо для оценки воздействия физической или химической обработки на микрофлору.

Данный тип анализа, обычно проводящийся после измельчения, учитывает фрагменты слоевища, однако прежде всего анализ рассчитан на споры, что представляется наиболее эффективным по причине обильного спорообразования рассматриваемых видов. Данный метод также принимает

во внимание развитие микроорганизмов (в злаках, зерновых культурах и продуктах их переработки) в соответствии с определённой его последовательностью при условии, что будет определён вид организма, что необходимо для прослеживания этапов развития. В этих условиях, которые являются скорее экспериментальными, чем нацеленными на контроль неизвестных партий, данные вычислений достаточно хорошо коррелируют с другими, скорее технологическими критериями (содержание жирных кислот, всхожесть).

1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая норма Республики Мали описывает метод вычисления количества бактерий, дрожжей и плесени в злаках и зерновых культурах, а также продуктах его первичной переработки (муке, крупе, отрубях и т.д.).

2 ССЫЛКИ НА НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

ISO 7698:1990(F).

3 ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей норме используются следующие термины:

- 3.1. Бактерии – мезофильные, аэробные или анаэробные факультативные организмы, которые при температуре 30 °C развиваются в толще и на поверхности агарной среды в условиях, описанных в настоящей норме.
- 3.2. Дрожжи – аэробные мезофильные микроорганизмы, которые при температуре 25 °C развиваются в агарной среде в условиях, описанных в настоящей норме.
- либо развиваются на поверхности среды, формируя колонии матового или глянцевого оттенка, часто имеющие чёткий контур и более или менее выпуклую поверхность.
 - либо развиваются в толще среды, формируя колонии круглой или лентовидной формы.
- 3.3. Плесень – мезофильные аэробные волокнистые микроорганизмы, которые на поверхности агарной среды и в условиях, описанных в настоящей норме, обычно развиваются в продолговатых, плоских или пушистых колониях, зачастую с окрашенными выделениями и обильным спорообразованием.

4 ПРИНЦИП

- 4.1. Осеменение в толще двух культурных сред (5.3.1 и 5.3.2), выращенных в двух чашках Петри, посредством установленного количества материнской суспензии.
- Осеменение десятикратных разведений в других чашках, полученных из материнской суспензии, в тех же условиях.
- 4.2. Инкубация в аэробной среде в чашках Петри, содержащих агарную среду (5.3.1) в целях подсчёта количества бактерий при 30 °C, в течение 3 суток.
- Инкубация в аэробной среде в чашках Петри с агарной средой (5.3.2) в целях подсчёта количества дрожжей при 25 °C в течение 3, 4 или 5 суток.
- 4.3. Подсчёт количества бактерий на основании количества колоний, образовавшихся в чашках Петри с агарной средой (5.3.2).

5 РАЗБАВИТЕЛЬ, КУЛЬТУРНЫЕ СРЕДЫ И ПРОЧИЕ РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

5.1. Базовые составляющие

В целях улучшения воспроизводимости результатов рекомендуется для приготовления разбавителя и культурных сред использовать базовые составляющие или среды в безводной форме. В тех же целях можно использовать готовые смеси и реактивы. В этом случае необходимо чётко следовать инструкциям производителя.

Используемые химические вещества должны обладать признанным аналитическим качеством. Используемая вода должна быть дистиллированной или деионизированной, не должна содержать веществ, подавляющих рост микроорганизмов (бактерий, дрожжей и плесени) в условиях анализа.

В случае, если разбавитель и среды не используются немедленно, их необходимо хранить в тёмном месте при температуре от 0 до +5 °С не более месяца, в условиях, предотвращающих любое изменение их состава, если в их инструкции не указано обратное.

5.2. Разбавитель

Раствор натрия хлорид-пептона.

ПРИМЕЧАНИЕ 2: С целью гомогенизации суспензии спор можно добавить поверхностное вещество, например, олеиновый эфир сорбитола (Tween 80) в концентрации 0,033 г на литр разбавителя.

5.3. Культурные среды

Состав

Триптон ¹⁾	5 г
Экстракт дрожжей безводный	2,5 г
Декстроза безводная	1,0 г

¹⁾ Данный термин в настоящее время используется только некоторыми производителями сред. Вместо него может быть использован любой дигестат казеина, дающий сравнимые результаты.

Агар-агар	9-18 г ²⁾
Вода	1000 мл

²⁾ Согласно инструкциям производителя

ПРИМЕЧАНИЕ 3: Чтобы не допустить развития дрожжей, на конечных этапах добавить ингибитор, например, актидион (циклогексимид) или натамицин (пимарицин) в культурную среду с концентрацией 0,1 г/л.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

Доведя до кипения, растворить в воде ингредиенты среды или готовую безводную среду. В случае необходимости отрегулировать уровень кислотности, чтобы после стерилизации при 25 °С он составлял 7,0.

Поместить среду в пробирки (6.9) из расчёта 15 мл на пробирку, либо в колбы (6,9) соответствующего объёма, из расчёта приблизительно половина объёма колбы. Стерилизовать среду в автоклаве (6.1) при 121±1 °С в течение 20 минут.

Если среда предназначена для немедленного использования, до применения охладить её на водяной бане (6.7) при 45±0,5 °С.

В противном случае перед началом микробиологического анализа, с целью избежать ожидания в момент заливки агара, полностью растопить среду на кипящей водяной бане, затем остудить на водяной бане (6.7.) при 45±0,5 °С.

5.3.2. Агар для вычисления количества дрожжей и плесени (агар на экстракте дрожжей, дектрозе и хлорамфениколе)

Состав

Экстракт дрожжей	5 г
Дектроза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 г
Хлорамфеникол (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅)	0,1 г
Агар-агар	9-18 г ³⁾
Вода	1000 мл

³⁾ Согласно инструкциям производителя

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

Доведя до кипения, растворить ингредиенты в воде. В случае необходимости отрегулировать уровень кислотности, чтобы после стерилизации при 25 °C он составлял 6,6.

Разлить среду в посуду (6.9) подходящего объёма.

Стерилизовать в автоклаве (6.1) при 121+/-1 °C в течение 15 минут.

Если среда предназначена для немедленного использования, до применения охладить её на водяной бане (6.7) при 45+/-0,5 °C.

В противном случае перед началом микробиологического анализа, с целью избежать ожидания в момент заливки агара, полностью растопить среду на кипящей водяной бане, затем остудить на водяной бане (6.7.) при 45+/-0,5 °C.

ПРИМЕЧАНИЕ 4: Вместо хлорамфеникола можно использовать окситетрациклин (C₂₂H₃₀N₂O₁₁). В этом случае приготовить базовую среду вышеуказанным образом, исключив из рецепта хлорамфеникол. Готовый продукт разлить порциями по 100 мл и стерилизовать. Также приготовить водный раствор 0,1% (об/об) хлоргидрата окситетрациклина и стерилизовать его путём фильтрации. Непосредственно перед использованием асептическим способом добавить 10 мл этого раствора в 100 мл растопленной базовой среды при температуре 45+/-0,5 °C.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И ПОСУДА

ПРИМЕЧАНИЕ 5: Одноразовая посуда допустима наряду с многоразовой, если их свойства аналогичны.

Обычное оборудование микробиологической лаборатории, в частности:

6.1. Оборудование для сухой температурной стерилизации (печь) или влажной температурной стерилизации (автоклав) (автономный или являющийся частью оборудования для приготовления и распределения сред).

Части оборудования, контактирующие с разбавителем, средами и образцами, за тем исключением, если последний доставляется в стерильной упаковке (в особенности, в пластиковой таре), необходимо стерилизовать одним из следующих методов:

- а) либо в печи (6.1) при 170-175 °C не менее 1 часа;
- б) либо в автоклаве (6.1) при 121+/-1 °C не менее 20 минут.

6.2. Оборудование для гомогенизации

В соответствии со стандартами ISO, необходимо использовать один из следующих аппаратов:

- а) роторный гомогенизатор, предпочтительно с загрузкой через верх, с частотой вращения 8000-45000 мин⁻¹, с ёмкостями из стекла или металла, предпочтительно снабжённый крышками, а также пригодный к стерилизации;
- б) перистальтический гомогенизатор (Stomacher) со стерильными пластиковыми пакетами.

ПРИМЕЧАНИЕ 6: Ёмкости и пластиковые пакеты должны быть достаточной вместимости, чтобы в них можно было оптимальным образом смешать образец с необходимым количеством разбавителя. Обычно максимальный объём ёмкости должен быть по крайней мере в два раза больше, чем общий объём образца и разбавителя.

6.3. Воротексная мешалка для гомогенизации содержимого пробирок (разбавлений материнской смеси).

6.4. Инкубаторы, настраиваемые на температуры 30+/-1 °C и 25+/-1 °C.

6.5. Чашки Петри диаметра от 90 до 100 мм.

6.6. Градуированные пипетки, специально предназначенные для работы с бактериями, номинального объёма 10 мл и 1 мл, градуированные по 0,5 мл и 0,1 мл, соответственно, и с номинальным отверстием диаметром 2 и 3 мм.

6.7. Водяная баня или аналогичное оборудование, настраиваемое на температуру 45±0,5°C.

6.8. Измеритель pH с точностью до ±0,1 при 25 °C.

6.9. Пробирки, в частности, 20 мм на 200 мм, колбы или реторты объемом 0,5 л или 1 л.

7. ОТБОР ПРОБ

Отбор проб должен проводиться со строгим соблюдением действующих методик в зависимости от обстоятельств.

Масса лабораторного образца должна быть больше минимальной требуемой массы анализа, указанной в таблице 1 (9.1), чтобы в случае необходимости анализ можно было повторить.

В случае, если анализ нельзя провести сразу по поступлении образца в лабораторию, допустимо его хранение в течение не более 48 часов при температуре около 10°C. В таком случае это необходимо указать в отчете об анализе. Ни при каких обстоятельствах образцы не допускается помещать в холодильник.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО ОБРАЗЦА

Для получения репрезентативного результата перед анализом образец тщательно перемешать.

ПРИМЕЧАНИЕ 7: При работе с продуктами, о которых идет речь в настоящем документе, зачастую имеет место неравномерное распределение микроорганизмов по лабораторному образцу.

Поэтому, когда от результатов анализа требуется высокая точность, рекомендуется проводить отдельный анализ по крайней мере трех, оптимально – пяти образцов, приготовленных из одной пробы.

9. ПРОЦЕДУРА

9.1. Анализируемый образец

Взвесить с точностью до 0,1 г анализируемый образец, указанный в таблице 1, в:

- а) чаше роторного гомогенизатора (6.2. а)) для продуктов категории 1, или
- б) пластиковый пакет гомогенизатора Stomacher (6.2 б)) для продуктов категории 2.

Таблица 1

Категория	Продукт	Масса анализируемого образца	Объем разбавителя, мл
1	Зёрна или семена	40	360
2	Продукты помола (мука, крупа, отруби и т.д.)	20	180

9.2. Приготовление материнской смеси

К анализируемому образцу (9.1) добавить соответствующее количество разбавителя согласно таблице 1. Оставить на 30 минут, затем:

- а) либо запустить роторный гомогенизатор (6.2 а)) на время, достаточное для осуществления 15000-20000 оборотов (однако даже более медленные гомогенизаторы не должны работать дольше 2,5 минут),
- б) либо запустить гомогенизатор Stomacher (6.2 б)) на 2 минуты.

9.3. Приготовление разведений

Приготовить разведения в соответствии с действующими методиками.

Перед забором каждой аликвоты на осеменение гомогенизировать содержимое пробирки при помощи вортেকсной мешалки (6.3).

9.4. Осеменение

9.4.1. Взять четыре стерильных чашки Петри. Поместить в каждую из чашек по 1 мл разведения 10^{-1} (9.2) при помощи новой стерильной пипетки.

9.4.1. Взять четыре стерильных чашки Петри. Поместить в каждую из чашек по 1 мл разведения 10^{-2} (9.3) при помощи новой стерильной пипетки.

Повторять вышеуказанные операции до получения необходимого количества разведений (см. 9.6.1 и 9.6.2).

9.4.3. В две чашки из каждой группы из четырёх чашек добавить приблизительно 15 мл среды (см. 5.3.1), а в две оставшиеся – приблизительно 15 мл другой среды (см. 5.3.2).

Тщательно перемешать посевной материал и срез и оставить на чистой горизонтальной поверхности.

Приготовить бланки в двух чашках с целью проверки стерильности; в одну поместить приблизительно 15 мл агарной среды (см. 5.3.1), в другую приблизительно 15 мл другой агарной среды (см. 5.3.2).

9.5. Инкубация

9.5.1. Бактерии

Перевернуть чашки со средой 5.3.1, поместить их в инкубатор (6.4) и оставить на 3 суток при 30 ± 1 °C.

9.5.2. Дрожжи и плесень

Поместить чашки со средой 5.3.2, перевернутые или нет, в другой инкубатор (6.4) и оставить на 5 суток при температуре 25 ± 1 °C.

9.6. Интерпретация результатов

9.6.1. Подсчёт колоний бактерий

По завершении предписанного периода инкубации (9.5.1) осмотреть чашки Петри.

Подсчитать колонии в каждой чашке со средой 5.3.1, содержащей менее 300 колоний, но не менее 15 колоний.

9.6.2. Подсчёт колоний дрожжей и/или плесени

Подсчитать количество колоний в каждой чашке через 3, 4 и 5 дней инкубации. Через 5 дней оставить чашки, содержащие менее 150 колоний. Если части чашек заросли плесенью или если представляется сложным подсчитать отдельные колонии, использовать результаты подсчёта, полученные через 4 или даже через 3 дня инкубации. В этом случае действительная длительность инкубации должна быть указана в отчёте об анализе.

Различие между колониями дрожжей и слоевищами плесени производится путём макроскопического осмотра. Однако в случае сомнения проводится анализ колоний под микроскопом: колонии дрожжей обычно состоят из яйцевидных или круглых клеток, в то время как слоевища плесени представляют из себя нити мицелия.

В случае необходимости провести осмотр под микроскопом для различия по морфологическому признаку колоний дрожжей и плесени и колоний бактерий.

10. ЗАПИСЬ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Подсчёт

10.1.1. Подсчитать количество микроорганизмов, в частности, бактерий, дрожжей и/или плесени на грамм продукта при помощи следующей формулы:

$$\Sigma C / (n_1 + 0,1n_2)^d$$

где

ΣC - сумма колоний во всех чашках, где проводился подсчёт, в диапазоне двух последовательных разведений.

d – разведение, из которого были получены первые результаты подсчёта (например, 10^{-2})

n_1 – количество посчитанных и убранных из инкубатора чашек в первом разведении;

n_2 – количество посчитанных и убранных из инкубатора чашек во втором разведении.

10.1.2. Округлить полученный в 10.1.1 результат до двух значимых цифр. Если округляемое число составляет 5, округлить так, чтобы число непосредственно слева от него было чётным. Например, 28500 округляется до 28000, а 1500 округляется до 2000.

10.1.3. Выразить результат в виде числа от 1,0 до 9,9, умноженного на 10^x , где x – установленная степень 10.

В случае, если в материнской смеси (9.4.1) колоний не обнаруживается, количество микроорганизмов, а именно бактерий, дрожжей и плесени, указывается как равным менее 10.

10.2. Пример подсчёта:

Подсчёт дрожжей и плесени дал следующие результаты (инкубированы две чашки Петри на разведение):

разведение 10^{-2} : 105 и 97 колоний

разведение 10^{-3} : 18 и 23 колонии

$$\Sigma C / (n_1 + 0,1n_2)^d = (105+97+18+23)/(2+(0,1 \times 2))10^{-2} = 243/0,022 = 11\,045$$

Округление результата согласно пункту 10.1.2 даёт 11 000.

Следовательно, приблизительное количество дрожжей и плесени на грамм составляет $1,1 \times 10^4$.

10.3. Точность

По статистике в 95% случаев степень точности метода варьируется от $\pm 16\%$ до $\pm 52\%$ ⁽³⁾. На практике же могут наблюдаться ещё большие отклонения, в частности, когда анализ проводят разные лабораторные сотрудники.

11. Отчёт об анализе

В отчёте об анализе должны быть указаны используемый метод, длительность инкубации и полученные результаты. Также там должны быть упомянуты все обстоятельства проведения анализа, не упомянутые в настоящем документе, либо факультативные, а также обстоятельства, способные повлиять на результаты.

Отчёт об анализе должен содержать все необходимые данные для полной идентификации образца.

Приложение А
(справочное)

Библиография

(1) ISO 7954:1987, Микробиология – Общие указания по подсчёту количества дрожжей и плесени – Техники подсчёта колоний, инкубируемых при 25 С.

(2) ISO 7218:1985, Микробиология – Общие указания по проведению микробиологических анализов.

(3) COWELL ET MORISETTI, J. Sci. Food Agric, 1969 (Том 20), стр. 573.

(4) ISO 4833:⁻³, Микробиология – Общие указания по подсчёту микроорганизмов – Метод подсчёта колоний, инкубируемых при 30 С.