

Standard krajowy Chińskiej Republiki Ludowej

GB 4789.26-2013

Krajowy standard bezpieczeństwa żywności Badanie mikrobiologiczne żywności Badanie sterylności komercyjnej

食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验

- Ogłoszony 2013-11-29
- Wdrożony 2014-06-01
- Wystawiony przez NHFPC

ZASTRZEŻENIE: Wersja angielska stanowi nieoficjalne tłumaczenie oryginału w języku chińskim wyłącznie dla celów informacyjnych i referencyjnych. W przypadku rozbieżności pierwszeństwo ma oryginalny standard w języku chińskim.

Przedmowa

Standard zastępuje GB/T 4789.26---2003 Badanie mikrobiologiczne higieny żywności
Badanie sterylności komercyjnej puszkowanych produktów spożywczych.

W porównaniu z GB/T 4789.26--2003 wprowadzono następujące zmiany:

- Skorygowanie chińskiej nazwy standardu;
- Skorygowanie zakresu;
- Wykreślenie odniesień normatywnych;
- Przegląd terminów i definicji;
- Przegląd sprzętu i materiałów;
- Przegląd pożywek hodowlanych i odczynników;
- Dodanie kart procedur kontroli;
- Skorygowanie etapów testów;
- Skorygowanie określania wyników;
- Skorygowanie Załączników A i B.

Krajowy standard bezpieczeństwa żywności

Badanie mikrobiologiczne żywności **Badanie sterylności komercyjnej**

1. Zakres

Niniejszy standard określa podstawowe wymagania, procedury operacyjne i określenie wyników badania sterylności komercyjnej produktów spożywczych.

Niniejszy standard ma zastosowanie do badania sterylności komercyjnej produktów spożywczych.

2. Terminy i definicje

Do standardu mają zastosowanie następujące terminy i ich definicje.

2.1 Produkty puszkowane o niskiej kwasowości

Oprócz napojów alkoholowych, zakwaszane produkty puszkowane o niskiej kwasowości wytwarzane z owoców, warzyw lub przetworów warzywnych, których wartość pH zostaje obniżona poprzez dodanie kwasu dla celów sterylizacji cieplnej, których wartość pH po sterylizacji powinna przekroczyć 4,6, a aktywność wody powinna przekroczyć 0,85 zaliczają się do produktów puszkowanych o niskiej kwasowości.

2.2 Kwaśne produkty puszkowane

Produkty puszkowane, których wartości pH po sterylizacji są równe lub niższe niż 4,6, należą do kwaśnych produktów puszkowanych. Pomidory, gruszki, ananasy i wytworzone z nich soki, których wartości pH są niższe niż 4,7, a także figi o wartości pH poniżej 4,9, to kwaśne produkty puszkowane.

3. Sprzęt i materiały

Oprócz zwykłego sprzętu do sterylizacji i hodowli w laboratorium mikrobiologicznym, wymagany jest następujący inny sprzęt i materiały:

- a) Lodówka: $2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$;
- b) Inkubator o stałej temperaturze: $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- c) Łaźnia wodnej o stałej temperaturze: $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- d) Homogenizator, worek do homogenizacji, pojemnik i rozcieracz do homogenizacji;
- e) Ewentualnie pH-metr (dokładność: 0,05 jednostki pH);
- f) Mikroskop (10 ~ 100-krotne powiększenie);
- g) Otwieracz do puszek i przebijak do puszek;
- h) Waga elektroniczna lub stołowa;
- i) Super czysty stół roboczy lub czyste laboratorium klasy 100 .

4. Pożywki hodowlane i odczynniki

4.1 Jałowy roztwór soli fizjologicznej: zob. A.1 w Załączniku A.

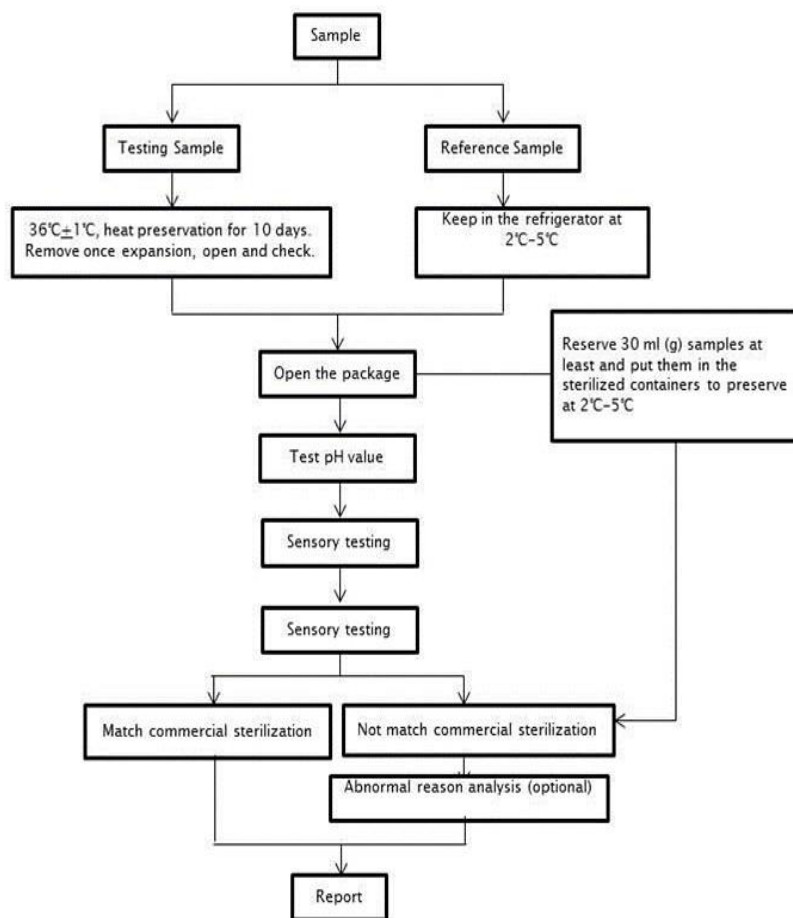
4.2 Roztwór barwiący fioletu krystalicznego: zob. A.2

4.3 Dimetylobenzen

4.4 Roztwór etanolu zawierający 4% jodu: rozpuścić 4 g jodu w 100 ml 70% roztworu etanolu.

5. Procedury kontroli

Procedury kontroli sterylności komercyjnej przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1 Procedury kontroli sterylności komercyjnej

en	pl
sample	próbka
testing sample	próbka do badania
reference sample	próbka referencyjna
36°C±1°C, heat preservation for 10 days. Remove once expansion, open and check	36°C±1°C, utrwalanie cieplne przez 10 dni. Usunąć po wystąpieniu bobażu, otworzyć i sprawdzić
Keep in the refrigerator at 2°C-5°C	Przechowywać w lodówce w temperaturze 2°C-5°C
Open the package	Otworzyć opakowanie
Reserve 30 ml (g) samples at least and put them in the sterilized containers to preserve at 2°C-5°C	Zachować przynajmniej 30 ml (g) próbek i włożyć je do jałowych pojemników w celu przechowywania w temperaturze 2°C-5°C
Test pH value	Zbadać wartość pH
Sensory testing	Badanie sensoryczne
Match commercial sterilization	Spełnia wymogi sterylności komercyjnej
Not match commercial sterilization	Nie spełnia wymogów sterylności komercyjnej
Abnormal reason analysis (optional)	Analiza nietypowych wyników (opcjonalna)
Report	Złożyć raport

6. Kroki operacyjne

6.1 Przygotowanie próbek

Usunąć etykiety zewnętrzne i użyć wodoodpornego markera permanentnego do zaznaczania na powierzchni pojemnika. Udokumentować pojemnik, numer seryjny, cechy produktu i wycieki, a także nietypowe warunki, takie jak otwory w pojemniku lub rdza, wgniecenia i

bombaż itd.

6.2 Waga

Zapakowane przedmioty o wadze 1 kg lub mniejszej należy zważyć z dokładnością do 1 g, przedmioty o wadze powyżej 1 kg należy zważyć z dokładnością do 2 g, a te powyżej 10 kg należy zważyć z dokładnością do 10 g. Jednocześnie należy je dokumentować.

6.3 Przechowywanie w cieple

6.3.1 Pobrać jedną próbkę z każdej partii, przechowywać ją w lodówce w temperaturze 2°C-5°C jako próbkę referencyjną, a pozostałe próbki przechowywać przez 10 dni w temperaturze 36°C±1°C. Podczas przechowywania w cieple należy codziennie przeprowadzać kontrole, a pojemniki z bombażem lub wyciekami należy natychmiast usunąć w celu kontroli po wykryciu.

6.3.2 Zważyć ponownie i udokumentować po zakończeniu przechowywania w cieple i porównać wagi przed i po przechowywaniu w cieple, aby sprawdzić wszelkie zmiany. Mniejsza waga próbek wskazuje, że w próbkach występuje wyciek. W takim przypadku wszystkie zapakowane przedmioty należy przechowywać w temperaturze pokojowej, dopóki nie zostaną rozpakowane w celu kontroli.

6.4 Rozpakowanie

6.4.1 Probki zbombażowane należy przechowywać w lodówce w temperaturze 2°C-5°C przez kilka godzin przed otwarciem.

6.4.2 Jeśli wystąpi bombaż, oczyścić gładką powierzchnię badanych próbek zimną wodą z detergentem. Po umyciu wodą osuszyć gładką powierzchnię jałowymi ręcznikami. Na 15 minut zanurzyć gładką powierzchnię w roztworze etanolu zawierającym 4% jodu w celu dezynfekcji, a następnie osuszyć jałowymi ręcznikami i poddać działaniu płomienia w hermetycznej pokrywie, dopóki pozostały na powierzchni roztwór etanolu zawierający jod nie zostanie spalony. Nie poddawać zbombażowanych próbek i próbek wypełnionych palnymi materiałami opakowaniowemu działaniu płomienia, a jedynie na 30 minut zanurzyć gładką powierzchnię w roztworze etanolu zawierającym 4% jodu i osuszyć jałowymi ręcznikami.

6.4.3 Rozpakować próbki na czystym stole lub w czystym laboratorium klasy 100. We wcześniej próbki z zupą należy odpowiednio wstrząsnąć. Wykonać odpowiedniej wielkości otwór na gładkiej powierzchni sterylizowanej puszkii za pomocą jałowego otwieracza, a podczas tego procesu nie można uszkodzić karbowanej struktury. Jeden otwieracz można wykorzystać tylko do jednej puszkii, wielokrotne używanie jest zabronione. Jeśli próbki są wypełnione miękkimi materiałami, można je otworzyć za pomocą jałowych nożyczek, a szwy muszą pozostać nienaruszone. Powąchać natychmiast po otwarciu i udokumentować ten fakt. Uwaga: Mocno zbombażowane próbki mogą wybuchnąć i może nastąpić rozpylenie toksycznych substancji. Można zapobiegać takim niebezpiecznym zdarzeniom, przykrywając zbombażowane próbki jałowymi ręcznikami lub jałowym lejkem.

6.5 Przechowywanie próbek

Po rozpakowaniu pobrać co najmniej 30 ml (g) zawartości za pomocą jałowych rurek lub innych odpowiednich narzędzi i w sterylny sposób umieścić w jałowych pojemnikach. Przechowywać zawartość w lodówce w temperaturze 2°C-5°C, gdyby zaszła konieczność dalszych badań. Po uzyskaniu wyników badania partii próbek zawartość można wyrzucić. Rozpakowane próbki należy odpowiednio przechowywać dla potrzeb przyszłych badań pojemników.

6.6 Badanie sensoryczne

W pomieszczeniu do badań z wystarczającą ilością światła, czystym powietrzem i bez nieprzyjemnego zapachu, wlać zawartość próbek do białego emaliowanego naczynia, a następnie obejrzeć strukturę, kształt i kolor, powąchać i nacisnąć produkt, aby sprawdzić jego właściwości i móc ocenić, czy żywność uległa zepsuciu. Jednocześnie obejrzeć pojemniki opakowaniowe z zewnątrz i wewnątrz i udokumentować ten fakt.

6.7 Oznaczanie wartości pH

6.7.1 Przetwarzanie próbek

6.7.1.1 Wymieszać płynne produkty w celu dalszego użycia. Jeśli chodzi o produkty zarówno w fazie stałej jak i ciekłej, wybrać w celu użycia odpowiednio wymieszaną część fazy ciekłej.

6.7.1.2 W przypadku produktów gęstych lub półgęstych lub takich, z których trudno jest wycisnąć sok (takich jak syrop, dżem, galaretka, tłuszcz itp.), wziąć część z nich i zmielić w homogenizatorze lub utrzeć w moździerzu. Jeżeli po zmieleniu próbki nadal są zbyt gęste, dodać do nich taką samą ilość jałowej wody destylowanej i dobrze wymieszać w celu użycia.

6.7.2 Oznaczenie

6.7.2.1 Gdy roztwory mają zostać zbadane, włożyć elektrody do roztworów próbek, które mają zostać zbadane i wyregulować korektor temperatury pH-metru do tej samej temperatury. Wyregulować temperaturę roztworów, które mają zostać zbadane, do $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i przeprowadzić oznaczenie zgodnie z etapami mającymi zastosowanie do wszystkich pH-metrów, jeżeli system korekcji temperatury nie jest dostępny. Po ustabilizowaniu odczytów numerycznych bezpośrednio odczytać wartości pH z wagi, z dokładnością do 0,05 jednostki pH.

6.7.2.2 Tę samą przygotowaną próbkę należy oznaczyć co najmniej dwa razy, a różnice między obydwojema wynikami nie powinny przekraczać 0,1 jednostki pH. Jako wynik przyjąć średnią arytmetyczną z obydwu badań, a dokładność wyniku dla potrzeb raportu powinna wynosić do 0,05 jednostki pH.

6.7.3 Analiza wyników

Porównać wyniki ze schłodzonymi próbkami kontrolnymi tej samej partii, aby sprawdzić oczywiste różnice między nimi. Różnice między wartościami pH wynoszące 0,5 lub powyżej można określić jako oczywiste.

6.8 Badanie mikroskopowe rozmazu z barwieniem

6.8.1 Rozmaz

Pobrać zawartość próbek, aby wykonać rozmazy. W przypadku próbek z zupą wyjąć nieco zupy za pomocą ezy bakteriologicznej i rozsmarować na szkiełkach. Produkty stałe można wykorzystywać do bezpośredniego wytwarzania rozmazów lub rozcieńczyć je niewielką ilością roztworu soli fizjologicznej (SPSS), a potem wykonać rozmazy. Następnie należy je utrwalić płomieniem po wyschnięciu. W przypadku żywności zawierającej tłuszcz jej rozmazy należy suszyć naturalnie i utrwać płomieniem, a następnie przemyć płynnym dimetylobenzenem i naturalnie wysuszyć.

6.8.2 Badanie mikroskopowe z barwieniem

Rozmazy określone w ppkt 6.8.1 należy zabarwić roztworem barwiącym fioleto krystalicznego i po wysuszeniu przeprowadzić badanie mikroskopowe. Obejrzeć co najmniej pięć pól mikroskopu i udokumentować morfologię grzybni oraz liczbę bakterii w każdym polu. Porównać je ze schłodzonymi próbkami z tej samej partii, aby sprawdzić, czy występuje ewidentne namnażanie się mikroorganizmów. Ewidentne namnażanie się ma miejsce wtedy, gdy liczba bakterii wzrasta stukrotnie lub więcej.

7. Interpretacja wyników

Produkt można zgłosić jako sterylne komercyjnie, jeśli brak jest wycieku w próbkach po

badaniu z przechowywaniem w cieple, a podczas badania sensorycznego, oznaczania wartości pH i badania mikroskopowego rozmazu nie obserwuje się namnażania się mikroorganizmów. Produkt można zgłosić jako niesterylny komercyjnie, jeśli po badaniu z przechowywaniem w cieple mają miejsce wycieki w próbkach, a podczas badania sensorycznego, oznaczania wartości pH i badania mikroskopowego rozmazu można zaobserwować namnażanie się mikroorganizmów.

Jeśli konieczne jest ustalenie przyczyn bombażu, nietypowych wartości pH lub wrażeń sensorycznych i namnażania się mikroorganizmów, należy pobrać przechowane próbki w celu zaszczerpienia i hodowli i sporządzić raport zgodnie z Załącznikiem B. Jeżeli konieczne jest ustalenie, czy w pojemnikach z próbkami występuje wyciek, należy przeprowadzić badanie szczelności rozpakowanych próbek i sporządzić raport z tej czynności.

Załącznik A

Pożywka hodowlana i odczynnik

A.1 Roztwór soli fizjologicznej

A.1.1 Składniki

Chlorek sodu	8,5g
Woda destylowana	1 000,0mL

A.1.2 Metoda przygotowania

Odważyć 8,5 g chlorku sodu i rozpuścić w 1 000 ml wody destylowanej. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

A.2 Roztwór barwiący fioletu krystalicznego

A.2.1 Składniki

Fiolet krystaliczny	1.0g
Etanol 95%	20,0 ml
Roztwór 1% szczawianu amonu	80,0 ml

A.2.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić 1,0 g fioletu krystalicznego w etanolu 95%, a następnie wymieszać z roztworem 1% szczawianu amonu.

A.2.3 Metoda barwienia

Utrwalić rozmaz płomieniem z palnika alkoholowego. Dodać fiolet krystaliczny do rozmazu, kropla po kropli, i barwić przez 1 minutę, a następnie spłukać wodą.

Załącznik B

Analiza nieprawidłowej przyczyny (element opcjonalny)

B.1 Pożywka hodowlana i odczynniki

B.1.1 Bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą

B.1.1.1 Składniki

Pepton	10,0g
Ekstrakt wołowy	3.0g
Glukoza	10.0g
Chlorek sodu	5.0g
Purpura bromokrezolowa	0,04 g (lub roztwór etanolu 1,6%, 2,0 ml)
Woda destylowana	1 000,0 ml

B.1.1.2 Metoda przygotowania

Podgrzać, wymieszać i rozpuścić wszystkie składniki z wyjątkiem purpury bromokrezolowej. Wyregulować wartość pH do poziomu $7,0\pm 0,2$, a następnie do wymieszanego roztworu dodać purpurę bromokrezolową. Rozdzielić go do probówek za pomocą małych odwróconych probówek. Każdą probówkę należy napełnić 10 ml wymieszanego roztworu i sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 10 minut.

B.1.2 Pożywka z gotowanego mięsa

B.1.2.1 Składniki

Bulion wołowy	1 000,0mL
Pepton	30,0g
Ekstrakt drożdżowy	5,0g
Glukoza	3,0g
Diwodorofosforan sodu	5,0g
Skrobia rozpuszczalna	2,0g
Resztki mięsa	odpowiednia ilość

B.1.2.2 Metoda przygotowania

B.1.2.2.1 Odważyć 500 g świeżej mielonej wołowiny bez tłuszczu i powięzi, a następnie wymieszać z 1 000 ml wody destylowanej i 25,0 ml roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 1 mol/l. Wymieszać roztwór, gotować przez 15 minut, a następnie ostudzić. Usunąć tłuszcz z powierzchni, sklarować i przefiltrować roztwór. Dodać 1 000 ml wody, aby uzyskać bulion wołowy. Dodać wszystkie składniki z wyjątkiem resztek mięsa, o których mowa w B.1.2.1, a następnie wyregulować wartość pH do poziomu 7.8 ± 0.2 .

B.1.2.2.2 Umyć resztki mięsa wodą i zostawić do obeschnięcia. Odpowiednio napełnić nimi probówki (15 mm×150 mm) do wysokości około 2 cm do 3 cm. Do każdej probówki dodać 0,1 g do 0,2 g zredukowanego sproszkowanego żelaza lub kilka opiłków żelaza. Napełnić każdą probówkę przygotowaną płynną pożywką hodowlaną opisaną w pkt B.1.2.2.1, tak aby płyn znajdował się około 1 cm wyżej niż powierzchnia resztek mięsa. Następnie zakorkować za pomocą rozpuszczonej wazeliny lub ciekłej parafiny (na wysokość od 0,3 cm do 0,4 cm). Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.3 Agar odżywczy

B.1.3.1 Składniki

Pepton	10,0g
Ekstrakt wołowy	3.0g
Chlorek sodu	5.0g
Agar	15,0 g - 20,0 g
Woda destylowana	1 000.0mL

B.1.3.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić wszystkie składniki z wyjątkiem agaru w wodzie destylowanej, a następnie dodać około 2 ml roztworu wodorotlenku sodu 15%. Wyregulować wartość pH do poziomu od 7,2 do 7,4. Następnie dodać agar i podgrzać do wrzenia, aby go rozpuścić. Rozdzielić otrzymany roztwór odpowiednio do kolb lub probówek (13 mm×130 mm). Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.4 Kwaśny bulion

B.1.4.1 Składniki

Polipepton	5,0g
Ekstrakt drożdżowy	5.0g
Głukoza	5.0g
Diwodorofosforan potasu	5.0g
Woda destylowana	1 000.0mL

B.1.4.2 Metoda przygotowania

Podgrzać, wymieszać i rozpuścić wszystkie składniki określone w pkt B.1.4.1. Wyregulować wartość pH do $5,0 \pm 0,2$. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.5 Bulion z ekstraktu słodowego

B.1.5.1 Składniki

Ekstrakt słodowy	15.0g
Woda destylowana	1 000.0mL

B.1.5.2 Metoda przygotowania

Całkowicie rozpuścić ekstrakt słodowy w wodzie destylowanej, a następnie przefiltrować za pomocą bibuły filtracyjnej. Wyregulować wartość pH do $4,7 \pm 0,2$ i rozdzielić do kilku pojemników. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.6 Agar Sabouraud z dekstrozą

B.1.6.1 Składniki

Pepton	10,0g
Agar	15,0g
Głukoza	40.0g
Woda destylowana	1 000.0mL

B.1.6.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić wszystkie składniki w wodzie destylowanej i podgrzać do wrzenia. Wyregulować

wartość pH do $5,6 \pm 0,2$. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.7 Agar z wątrobą cielęcą

B.1.7.1 Składniki

Ekstrakt z wątroby	50.0g
Ekstrakt cielęciny	500.0g
Pepton proteozy	20.0g
Neopepton	1,3 g
Trypton	1,3g
Głukoza	5,0g
Skrobia rozpuszczalna	10,0g
Kazeina z osocza	2,0g
Chlorek sodu	5,0g
Azotan sodu	2,0g
Żelatyna	20,0 g
Agar	15,0g
Woda destylowana	1 000.0mL

B.1.7.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić wszystkie składniki w wodzie destylowanej. Wyregulować wartość pH do $7,3 \pm 0,2$. Sterylizować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

B.1.8 Roztwór barwiący Grama

B.1.8.1 Roztwór barwiący fioletu krystalicznego

B.1.8.1.1 Składniki

Fiolet krystaliczny	1,0g
Etanol 95%	20,0 ml
Roztwór 1% szczawianu amonu	80,0 ml

B.1.8.1.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić całkowicie 1,0 g fioletu krystalicznego w etanolu 95%, a następnie wymieszać z roztworem 1% szczawianu amonu.

B.1.8.2 Roztwór jodu Grama

B.1.8.2.1 Składniki

Jod	1.0g
Jodek potasu	2.0g
Woda destylowana	300mL

B.1.8.2.2 Metoda przygotowania

Najpierw wymieszać 1,0 g jodu z 2,0 g jodku potasu. Następnie dodać do mieszaniny trochę wody destylowanej i dobrze wstrząsnąć. Po całkowitym rozpuszczeniu dopełnić wodą destylowaną do 300 ml.

B.1.8.3 Safranina (barwienie kontrastowe)

B.1.8.3.1 Składniki

Safranina	0.25g
Etanol 95%	10,0 ml
Woda destylowana	90.0mL

B.1.8.3.2 Metoda przygotowania

Rozpuścić 0,25 g safraniny w etanolu, a następnie rozcieńczyć wodą destylowaną.

B.1.8.4 Metoda barwienia

B.1.8.4.1 Utrwalić rozmaz płomieniem z palnika alkoholowego. Dodać fiolet krystaliczny do rozmazu, kropla po kropli, i barwić przez 1 minutę, a następnie spłukać wodą.

B.1.8.4.2 Dodać jod Grama, kropla po kropli, odczekać 1 minutę, a następnie spłukać wodą.

B.1.8.4.3 Dodać etanol 95%, kropla po kropli, odbarwiać przez około 15~30s, aż do zmycia roztworu barwiącego. Zbyt duże odbarwienie jest niedozwolone. Następnie spłukać wodą.

B.1.8.4.4 Dodać płyn do barwienia kontrastowego, kropla po kropli, powtórnie barwić przez 1 minutę i spłukać wodą. Po wyschnięciu przeprowadzić badania mikroskopowe.

B.2 Zaszczepiona hodowla próbek puszkowanych produktów spożywczych o niskiej kwasowości (pH>4,6)

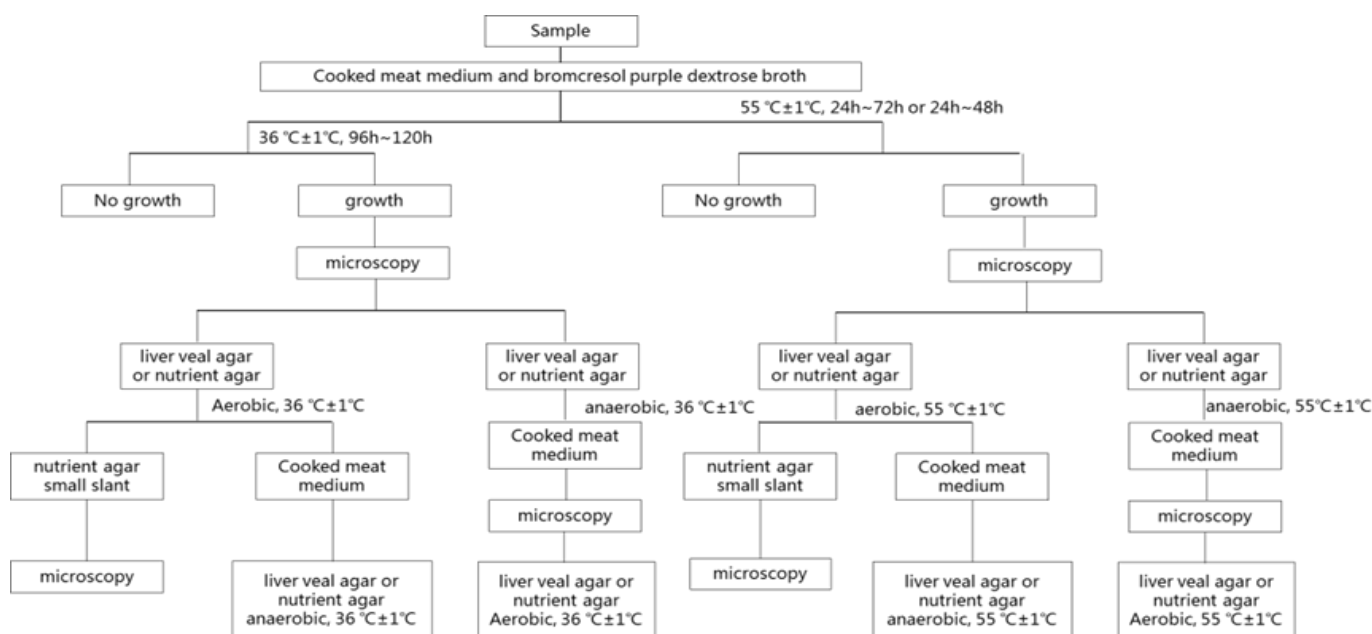
B.2.1 W przypadku puszkowanych produktów spożywczych o niskiej kwasowości zaszczepić każdą próbkę w 4 probówkach z pożywką z gotowanego mięsa podgrzaną do temperatury 100°C i szybko schłodzoną do temperatury pokojowej; W międzyczasie zaszczepić w 4 probówkach bulionu z purpurą bromokrezolową i dekstrozą. Zaszczepić 1 ml (g)~2 ml (g) próbek (1 ml~2 ml w przypadku próbek płynnych, 1 g~2 g w przypadku próbek stałych, jeśli istnieją obydwa rodzaje, po połowie w przypadku obydwu) w każdej próbce. Warunki hodowli przedstawiono w tabeli B.1.

Tabela B.1 Pożywka z gotowanego mięsa i bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą do zaszczepienia próbek puszkowanych produktów spożywczych o niskiej kwasowości (pH>4,6)

Pożywka hodowlana	Liczba próbek	Temperatura hodowli/°C	Czas hodowli/h
Pożywka z gotowanego mięsa	2	36±1	96~120
Pożywka z gotowanego mięsa	2	55±1	24~72
Bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą	2	55±1	24~48
Bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą	2	36±1	96~120

B.2.2 Po przeprowadzeniu hodowli zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli B.1 należy udokumentować stany wzrostu mikroorganizmów w każdej próbce. Jeśli w próbce nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów, należy ją wyrzucić po udokumentowaniu.

B.2.3 Jeśli w próbówce występuje wzrost mikroorganizmów, pobrać płyn za pomocą ezy bakteriologicznej, aby wykonać rozmaz i przeprowadzić badania mikroskopowe metodą barwienia Grama. Jeśli w próbówce zawierającej bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą zaobserwowane zostaną różne morfologie mikroorganizmów lub pojedyncza morfologia ziarniakowa lub grzybowa, należy ją wyrzucić po udokumentowaniu. Jeśli w próbówce zawierającej pożywkę z gotowanego mięsa brak jest pałeczek, a zaobserwowane zostaną drożdże, grzyby i ich mieszaniny, należy ją wyrzucić po udokumentowaniu. Zaszczepić pozostałe dodatnie próbówki zawierające bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą i pożywkę z gotowanego mięsa, w których obserwuje się wzrost mikroorganizmów na dwóch płytkach do posiewu z agarem z wątrołą cielęcą lub agarem odżywczym, jedną do hodowli tlenowej, drugą do hodowli beztlenowej. Hodowlę pokazano na Rys. B.1.



Rys. B.1 Procedury zaszczepienia i hodowli próbek puszkowanych produktów spożywczych o niskiej kwasowości

en	pl
sample	próbka
cooked meat medium and bromocresol purple dextrose broth	pożywka z gotowanego mięsa i bulion z purpurą bromokrezolową i dekstrozą
no growth	brak wzrostu
growth	wzrost
microscopy	badanie mikroskopowe
liver veal agar or nutrient agar	agar z wątrołą cielęcą lub agar odżywczy
aerobic	warunki tlenowe
anaerobic	warunki beztlenowe
nutrient agar small slant	mała próbówka z ukośnym agarem odżywczym

B.2.4 Pobrać pojedynczą kolonię z hodowli tlenowej i zaszczepić ją w próbówce z ukośnym agarem odżywczym, która zostanie wykorzystana do późniejszego badania mikroskopowego metodą barwienia Grama. Pobrać pojedynczą kolonię z hodowli beztlenowej, aby wykonać rozmaz i przeprowadzić badanie mikroskopowe metodą barwienia Grama. Zaszczepić pojedyncze kolonie pobrane odpowiednio z hodowli tlenowej i beztlenowej na pożywkę z gotowanego mięsa, aby przeprowadzić czystą hodowlę.

B.2.5 Pobrać hodowle z próbówki z ukośnym agarem odżywczym i z hodowanej

beztlenowo pożywki z gotowanego mięsa, aby wykonać rozmaz i przeprowadzić badanie mikroskopowe.

B.2.6 Pobrać hodowle tlenowe z czystej hodowli i zaszczerpić na płytce z agarem z wątrobą cielęcą lub z agarem odżywcym, aby przeprowadzić dla nich hodowlę beztlenową; Pobrać hodowle beztlenowe z czystej hodowli i zaszczerpić na płytce z agarem z wątrobą cielęcą lub z agarem odżywcym, aby przeprowadzić dla nich hodowlę tlenową, w celu określenia, czy hodowle to beztlenowce względne.

B.2.7 Jeśli wymagane jest badanie toksyny botulinowej *clostridium*, należy pobrać typowe kolonie dla potrzeb czystej hodowli na pożywce z gotowanego mięsa. Hodować w temperaturze 36°C przez 5 dni. Następnie przeprowadzić badanie toksyny botulinowej zgodnie z GB / T 4789.12.

B.3 Zaszczepienie i hodowla próbek kwaśnych puszkowanych produktów spożywczych (pH≤4.6)

B.3.1 Zaszczepić każdą próbkę w czterech probówkach z kwaśnym bulionem i dwóch probówkach z bulionem z ekstraktu słodowego. Zaszczepić 1 ml (g)~2 ml (g) próbek (1 ml~2 ml w przypadku próbek płynnych, 1 g~2 g w przypadku próbek stałych, jeśli istnieją obydwa rodzaje, po połowie w przypadku obydwu) w każdej probówce. Warunki hodowli przedstawiono w tabeli B.2.

Tabela B.2 Kwaśny bulion i bulion z ekstraktu słodowego do zaszczepienia próbek kwaśnych puszkowanych produktów spożywczych (pH≤4.6)

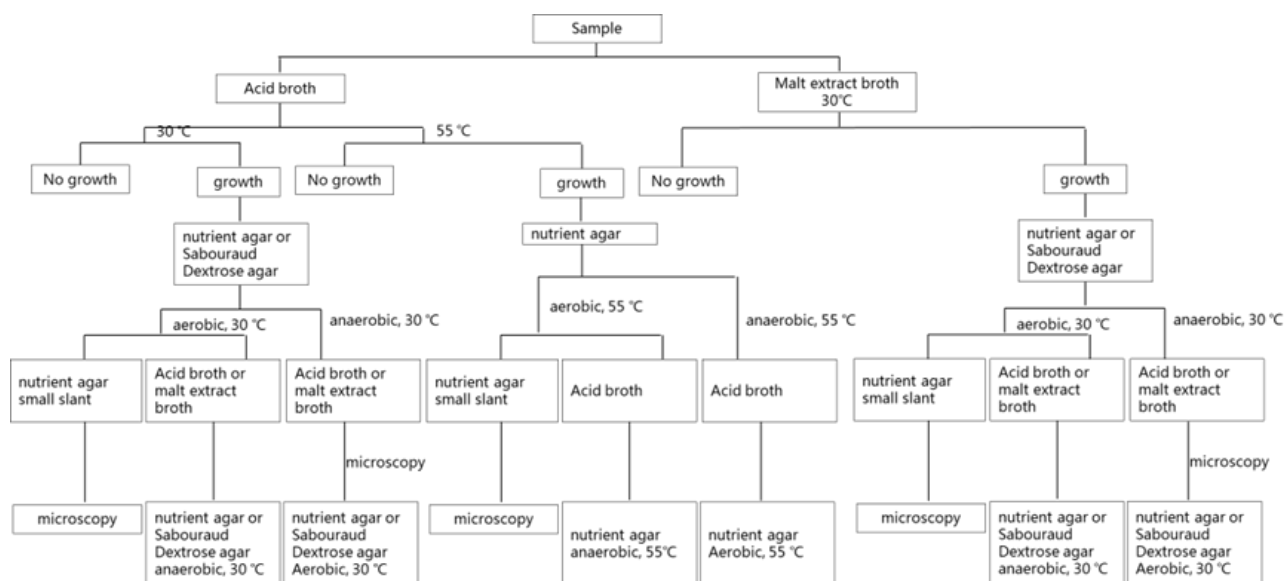
Pożywka hodowlana	Liczba próbek	Temperatura hodowli/°C	Czas hodowli/h
Kwaśny bulion	2	55±1	48
Kwaśny bulion	2	30±1	96
Bulion z ekstraktu słodowego	2	30±1	96

B.3.2 Po hodowli zgodnie z warunkami przedstawionymi w tabeli B.2 należy udokumentować stany wzrostu mikroorganizmów w każdej probówce. Jeśli w probówce nie zaobserwowano wzrostu mikroorganizmów, należy ją wyrzucić po udokumentowaniu.

B.3.3 Jeśli w probówce hodowlanej występuje wzrost mikroorganizmów, pobrać hodowaną zawartość, aby wykonać rozmaz i przeprowadzić badanie mikroskopowe metodą barwienia Grama i udokumentować zaobserwowane mikroorganizmy.

B.3.4 Jeśli w kwaśnym bulionie lub bulionie z ekstraktu słodowego w warunkach hodowli w temperaturze 30°C stwierdzono wzrost mikroorganizmów, zaszczerpić zawartość każdej dodatkowej próbki odpowiednio na 2 płytkach z agarem odżywcym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą, jedną do hodowli tlenowej, drugą do hodowli beztlenowej.

B.3.5 Jeśli w kwaśnym bulionie stwierdzono wzrost mikroorganizmów w warunkach hodowli w temperaturze 55°C, zaszczerpić zawartość każdej dodatkowej próbki odpowiednio w 2 płytkach z agarem odżywcym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą, jedną do hodowli tlenowej, drugą do hodowli beztlenowej. Przeprowadzić badanie mikroskopowe metodą barwienia rozmazu w przypadku płytki, na której występuje wzrost mikroorganizmów i sporządzić raport na temat rodzajów mikroorganizmów zaobserwowanych podczas badania mikroskopowego. Procedury hodowli przedstawiono na Rys. B.2.



Rys. B.2 Procedury zaszczepienia i hodowli próbek kwaśnych puszkowanych produktów spożywczych

en	pl
sample	próbka
acid broth	kwaśny bulion
malt extract broth	bulion z ekstraktu słodowego
no growth	brak wzrostu
growth	wzrost
nutrient agar or Sabouraud dextrose agar	agar odżywczy lub agar Sabouraud z dekstrozą
aerobic	warunki tlenowe
anaerobic	warunki beztlenowe
nutrient agar small slant	mała próbówka z ukośnym agarem odżywczym
microscopy	badanie mikroskopowe

B.3.6 Pobrać pojedyncze kolonie z płytek z agarem odżywczym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą hodowanych tlenowo w temperaturze 30°C i zaszczepić je w próbówce z ukośnym agarem odżywczym, który zostanie wykorzystany do późniejszego badania mikroskopowego metodą barwienia Grama. W międzyczasie zaszczepić w kwaśnym bulionie lub bulionie z ekstraktu słodowego i przeprowadzić czystą hodowlę.

Pobrać pojedyncze kolonie z płytek z agarem odżywczym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą hodowanych beztlenowo w temperaturze 30°C, zaszczepić je w kwaśnym bulionie lub bulionie z ekstraktu słodowego i przeprowadzić czystą hodowlę.

Pobrać pojedyncze kolonie z płytek z agarem odżywczym hodowanych tlenowo w temperaturze 55°C i zaszczepić je w próbówce z ukośnym agarem odżywczym, który zostanie wykorzystany do późniejszego badania mikroskopowego metodą barwienia Grama. W międzyczasie zaszczepić w kwaśnym bulionie dla potrzeb czystej hodowli.

Pobrać pojedyncze kolonie z płytek z agarem odżywczym hodowanych beztlenowo w temperaturze 55°C i zaszczepić je w kwaśnym bulionie dla potrzeb czystej hodowli.

B.3.7 Pobrać hodowle z próbówki z ukośnym agarem odżywczym, aby wykonać rozmaz i obejrzeć pod mikroskopem. Pobrać hodowle z kwaśnego bulionu lub ekstraktu słodowego hodowanego beztlenowo w temperaturze 30°C i z kwaśnego bulionu hodowanego beztlenowo w temperaturze 55°C, wykonać dla nich rozmaz i obejrzeć pod mikroskopem.

B.3.8 Zaszczepić czyste hodowle hodowane tlenowo w temperaturze 30°C na płytce z

agarem odżywczym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą i przeprowadzić hodowlę beztlenową. Zaszczepić czyste hodowle hodowane beztlenowo w temperaturze 30°C na płytce z agarem odżywczym lub z agarem Sabouraud z dekstrozą i przeprowadzić hodowlę tlenową. Zaszczepić czyste hodowle hodowane tlenowo w temperaturze 55°C na agarze odżywczym i przeprowadzić hodowlę beztlenową. Zaszczepić czyste hodowle hodowane beztlenowo w temperaturze 30°C na agarze odżywczym i przeprowadzić hodowlę tlenową. Każdy krok służy do określenia, czy czyste hodowle to beztlenowce względne.

B.3.9 Analiza wyników

B.3.9.1 Jeśli w zbombażowanych próbkach nie można stwierdzić wzrostu mikroorganizmów, bombaż może być spowodowany przez wodór wytwarzany w drodze reakcji między zawartością a opakowaniem. Ilość wytwarzanego wodoru ulega zmianie w zależności od czasu i warunków przechowywania. Nadmierne wypełnianie opakowań może również spowodować nieznaczny bombaż, który można ustalić za pomocą ważenia.

Jeśli w bezpośrednim badaniu rozmazu zaobserwowana zostanie mieszanina dużej liczby mikroorganizmów, a mikroorganizmy te nie mogą się rozwijać po hodowli, oznacza to, że przed sterylizacją nastąpiło gnicie. Wartość pH, zapach i struktura morfologiczna produktów są nieprawidłowe ze względu na wzrost mikroorganizmów przed uszczelnieniem.

B.3.9.2 Jedynie wzrost pałeczek stwierdzonych w warunkach hodowli w temperaturze 36°C przy idealnie uszczelnionych pojemnikach opakowaniowych i odporność takich pałeczek na ciepło nie są lepsze niż w przypadku *Clostridium botulinum*, co wskazuje, że podczas procesu produkcyjnego występuje niedostateczna sterylizacja.

B.3.9.3 Jeśli po hodowli pojawiają się mieszane kolonie pałeczek, ziarniaków i grzybów, oznacza to, że w pojemnikach opakowaniowych występuje wyciek. Może to również wynikać z niedostatecznej sterylizacji, ale w tym stanie tempo bombażu tej samej partii produktów byłoby dość wysokie.

B.3.9.4 Obserwować sytuacje wytwarzania kwasu i gazu w bulionie z purpurą bromokrezolową i dekstrozą hodowanym w temperaturze 36°C lub 55°C. Jeśli wytworzy się kwas, wskazuje to na wzrost liczby mikroorganizmów mezofilnych (np. odpornych na kwas bakterii mezofilnych) lub mikroorganizmów ciepłolubnych (np. *Bacillus stearothermophilus*). Wzrost liczby bakterii i wytwarzanie gazów o zgniłym zapachu w pożywce z gotowanego mięsa w temperaturze 55°C wskazują, że gnicie próbek spowodowane jest przez ciepłolubne beztlenowe *clostridium*.

Wzrost liczby bakterii i wytwarzanie gazów o zgniłym zapachu w pożywce z gotowanego mięsa w temperaturze 36°C oraz zarodniki obserwowane podczas badania mikroskopowego wskazują, że gnicie może być spowodowane przez *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes* i *Clostridium perfringens*. Toksynę botulinową można w razie potrzeby dalej zbadać.

B.3.9.5 Psucie się kwaśnych puszkowanych produktów spożywczych jest zwykle spowodowane przez *Lactobacillus* bez zarodników i drożdży.

Zasadniczo, jeśli wartość pH jest niższa niż 4,6, nie występuje pogorszenie stanu spowodowane przez pałeczki. Zepsuty ketchup lub puszkowany sos pomidorowy nie ulegnie bombażowi, ale może wystąpić zgniły zapach przy jednoczesnym obniżeniu wartości pH lub bez niego. Zwykle jest to spowodowane przez pałeczki tlenowe.

B.3.9.6 Bakterie ciepłolubne występują w wielu puszkowanych produktach spożywczych. Nie rozwijają się w normalnych warunkach przechowywania, ale będą się rozwijać i powodować gnicie, gdy produkty wystawione są na działanie wysokiej temperatury (50°C~55°C). Ciepłolubne kwasoodporne *Bacillus* i *Bacillus stearothermophilus* mogą powodować gnicie odpowiednio kwaśnych produktów spożywczych i produktów

spożywczych o niskiej kwasowości, ale pojemniki opakowaniowe nie ulegną bombażowi. Hodowla w temperaturze 55°C nie spowoduje zmiany wyglądu pojemników opakowaniowych, lecz wytwarza zgniły zapach przy jednoczesnym obniżeniu wartości pH lub bez niego. Psucie się pomidorów, gruszek, fig i ananasów jest czasami spowodowane przez *Clostridium pasteurianum*. Jako rodzaj ciepłolubnych bakterii beztlenowych, *Clostridium thermosaccharolyticum* może powodować bombaż i zgniły zapach produktów. Ciepłolubne bakterie beztlenowe mogą również wytwarzać gaz, ponieważ szybko się namnażają po tym, jak zaczną rosnąć. To, czy bombaż spowodowany jest przez wodór czy przez gaz wytwarzany przez ciepłolubne bakterie beztlenowe może być mylące. Rozkład chemiczny powoduje wytwarzanie dwutlenku węgla, który powszechnie występuje zwłaszcza w słodkich i kwaśnych potrawach, na przykład w sosie pomidorowym, melasie, mięsie mielonym i słodkich puszkowanych owocach. Rozkład przyspiesza wraz ze wzrostem temperatury.

B.3.9.7 Jeżeli jakikolwiek mikroorganizm zostanie wyizolowany na podstawie bezpośrednich rozmazów sterylnej opakowania próżniowego i zwykłych produktów należy wziąć pod uwagę zanieczyszczenie laboratoryjne. Aby potwierdzić, czy jest to zanieczyszczenie laboratoryjne, należy zaszczerpić wyizolowany żywy mikroorganizm w warunkach aseptycznych do innej normalnej próbki kontrolnej, a następnie zaplombować i hodować w temperaturze 36°C przez 14 dni. Istnieje prawdopodobieństwo, że mikroorganizmy te nie pochodzą z oryginalnych próbek, jeśli występuje bombaż lub pogorszenie jakości produktów. Otworzyć opakowania z próbkami w warunkach aseptycznych i ponownie hodować zgodnie z wyżej wymienionymi procedurami, jeżeli próbki są nadal płaskie. Jeśli ponownie zostanie stwierdzony ten sam rodzaj mikroorganizmu, a produkty wyglądają normalnie, zostaną one uznane za sterylne komercyjnie, ponieważ tego rodzaju mikroorganizmy nie rozwijają się podczas normalnego przechowywania i transportu.

B.3.9.8 Wniosków dotyczących oznaczania nie można wyciągać za pośrednictwem hodowli bulionowej, jeśli sam produkt spożywczy jest zepsuty. W tej sytuacji konieczna jest dalsza hodowla, aby potwierdzić, czy występuje wzrost mikroorganizmu.

B.4 Metoda badania szczelności pustej puszki na produkty spożywcze wykonanej z blachy stalowej

B.4.1 Test szczelności przy zmniejszonym ciśnieniu

Puszki opakowaniowe służące jako próbki należy dokładnie umyć i wysuszyć w temperaturze 36°C. Napęlić wysuszone puszki czystą wodą, która ma stanowić 80%~90% zawartości każdej puszki. Umieścić arkusz akrylowy z gumowym pierścieniem na otwartym, zawiniętym końcu puszek, aby go zamknąć. Uruchomić pompę próżniową i zamknąć bramkę w celu uwolnienia gazu. Przycisnąć pokrywę rękami i kontrolować odpowietrzanie. Upewnić się, że wzrost wartości na próżniomierzu z 0 Pa do $6,8 \times 10^4$ Pa (510 mmHg) trwa dłużej niż 1 minutę, a stopień próżni $6,8 \times 10^4$ Pa (510 mmHg) trwa dłużej niż 1 minutę. Przechylić puszkę i uważnie ją obserwować, aby sprawdzić, czy nie tworzy się bańka, zwłaszcza przy obrzeżu i spoinie. Można ją uznać za nieszczelną, jeśli bańki stale powstają w tym samym miejscu. Udokumentować czas wycieku i stopień próżni i zaznaczyć miejsce, w którym występuje wyciek.

B.4.2 Test szczelności przy zwiększonym ciśnieniu

Wyczyścić puszkę służącą jako próbka i wysuszyć w temperaturze 36°C. Zatkać wylot pustej puszki gumowym korkiem, zanurzyć pustą puszkę w szklanym słoju pełnym wody, uruchomić sprężarkę powietrza i powoli otworzyć zawory, aby stopniowo zwiększać ciśnienie w puszcze do $6,8 \times 10^4$ Pa i utrzymywać ciśnienie przez dwie minuty. Należy uważnie

obserwować puszkę, zwłaszcza obrzeże i spoinę, aby sprawdzić, czy powstają bańki. Można ją uznać za nieszczelną, jeśli bańki stale powstają w tym samym miejscu. Udokumentować czas wycieku i stopień próżni i zaznaczyć miejsce, w którym występuje wyciek.