

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

ISO 21527-2

Первое издание
2008-07-01

Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов.

Часть 2.

Методика подсчета колоний в продуктах, активность воды в которых меньше или равна 0,95

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/iso-21527-2-2008>

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds —

Part 1: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава



Ссылочный номер
ISO 21527-1:2008(R)

© ISO 2008

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21527-2:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2008

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по соответствующему адресу, указанному ниже, или комитета-члена ISO в стране заявителя.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Предисловие

Международная организация по стандартизации ISO является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO осуществляет тесное сотрудничество с международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 21527-2 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 9, *Микробиология*.

ISO 21527 состоит из следующих частей под общим заглавием *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов*:

- *Часть 1. Методика подсчета колоний в продуктах, активность воды в которых больше 0,95*
- *Часть 2. Методика подсчета колоний в продуктах, активность воды в которых меньше или равна 0,95*

Эта часть ISO 21527, вместе с ISO 21527-1, отменяет и заменяет ISO 7698:1990, ISO 7954:1987 и ISO 13681:1995.

Введение

Ввиду большого разнообразия пищевых и кормовых продуктов применение горизонтального метода, установленного в ISO 21527 (все части), может не соответствовать отдельным продуктам. В таком случае можно использовать другие методы, которые соответствуют этим продуктам, если это абсолютно необходимо по обоснованным техническим причинам. Тем не менее, по возможности должны быть опробованы все средства для применения горизонтального метода, установленного в ISO 21527 (все части).

При последующем пересмотре ISO 21527 (все части) будет учтена вся имеющаяся информация относительно применения данного метода и причин отклонения от него для конкретных продуктов.

Гармонизация методов испытания не может быть обеспечена немедленно, и для некоторых групп продуктов уже могут существовать международные стандарты и/или национальные стандарты, которые не соответствуют горизонтальному методу, установленному в ISO 21527 (все части). Выражается надежда, что при пересмотре таких стандартов они будут приведены в соответствие с ISO 21527 (все части), чтобы, в конце концов, единственными остающимися отклонениями от этого горизонтального метода были только те, которые необходимы по хорошо установленным техническим причинам.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21527-2:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008>

Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов.

Часть 2.

Методика подсчета колоний в продуктах, активность воды в которых меньше или равна 0,95

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ. Подсчет плесневых грибов следует проводить с большой осторожностью для обеспечения защиты оператора и предотвращения загрязнения атмосферы плесневыми спорами.

1 Область применения

В этой части ISO 21527 устанавливается горизонтальный метод для определения количества жизнеспособных осмофильных дрожжевых и ксерофильных плесневых грибов в продуктах, активность воды в которых меньше или равна 95 %, предназначенных для потребления человеком или для кормления животных (сухофрукты, торты, джемы, сушеное мясо, соленая рыба, зерно, зерновые культуры и зерновые продукты, мука, орехи, пряности, приправы и др. [Приложение 1], посредством подсчета колоний при $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (Ссылка [3]).

Эта часть ISO 21527 не применяется для дегидратированных продуктов, активность воды в которых меньше или равна 0,60 (обезвоженные зерновые культуры, маслянистые продукты, специи, бобовые растения, семена, порошки для растворимых напитков, сухие продукты для домашних животных и др.) и не устанавливает подсчет плесневых спор (Ссылка [3]). Идентификация грибковой флоры и испытание пищевых продуктов на микотоксины не относятся к области применения настоящей части ISO 21527. Метод, установленный в данной части ISO 21527, не пригоден для подсчета галофильных ксерофильных грибов (т.е., *Polypaecilum pisce*, *Basipetospora halophila*), которые могут быть обнаружены в сушеной рыбе.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 6887 (все части), *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований*

ISO 7218, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство для микробиологических исследований*

ISO 8261, *Молоко и молочные продукты. Общие правила приготовления проб для анализа, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований*

ISO/TS 11133 (все части), *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред*

ISO 21527-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов. Часть 1: Методика подсчета колоний в продуктах, активность воды в которых больше 0,95*

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются термины и определения, данные в ISO 21527-1, и следующие.

3.1

осмофильный дрожжевой гриб
ксерофильный плесневый гриб
osmophilic yeast
xerophilic mould

гриб, который способен к росту в воде, активность которой меньше или равна 0,95

4 Принцип

4.1 Приготавливают поверхностно-инокулированные пластины, используя установленную селективную культуральную (питательную) среду. В зависимости от ожидаемого количества колоний используют заданное количество пробы (если продукт жидкий) или исходной суспензии (в случае других продуктов) или десятикратных разведений пробы/суспензии.

Дополнительные пластины можно приготовить при тех же условиях, используя десятикратные разведения испытательного образца или исходной суспензии.

4.2 Затем пластины аэробно инкубируют при $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение от 5 до 7 дней. Если необходимо, пластины оставляют при дневном рассеянном свете на период от 1 до 2 дней.

4.3 Колонии/пропагулы затем подсчитывают и, если необходимо (чтобы различать колонии дрожжевых грибов от бактериальных колоний), идентичность любых сомнительных колоний подтверждают посредством исследования с помощью бинокулярной лупы или микроскопа.

4.4 Количество дрожжевых или плесневых грибов на грамм или миллилитр пробы рассчитывают из количества колоний/пропагул/зародышей, полученных на пластинах при уровнях разбавления, дающих исчисляемые колонии. При необходимости плесневые и дрожжевые грибы подсчитывают по отдельности.

5 Разбавитель и культуральная среда

О современной лабораторной практике см. ISO 6887 (все части) и ISO 8261.

5.1 Разбавитель

5.1.1 Общее положение

См. ISO 6887 (все части), ISO 8261 и конкретный международный стандарт, касающийся исследуемого продукта.

Использование разбавителя, содержащего достаточное количество растворенного вещества [например, раствор от 20 % до 35 % (массовая концентрация) глицерола или D-глюкозы], рекомендуется для минимизации осмотического шока на клетки ксерофильных плесневых и осмофильных дрожжевых грибов, когда перед посевом проводятся последовательные разведения (Ссылки [1], [3]).

ПРИМЕЧАНИЕ К разбавителям можно добавить поверхностно-активные агенты, например натрий поли(оксиэтилен)сорбатанмоноолеат ¹⁾ [0,05 % (массовая концентрация)], для уменьшения скопления плесневых спор и конидий (Ссылка [3]).

Помимо специального приготовления испытательного образца рекомендуется использовать в качестве разбавителя 0,1 %-ную пептонную воду (массовая концентрация) с питательным бульоном.

5.1.2 Состав 0,1 %-ной пептонной воды (массовая концентрация) с питательным бульоном

| | |
|--|----------|
| Ферментный гидролизат животных или растительных тканей | 1,0 г |
| Вода | 1 000 мл |

5.1.3 Приготовление 0,1 %-ной пептонной воды (массовая концентрация) с питательным бульоном

Растворяют компоненты в воде, нагревая при необходимости.

Если необходимо, регулируют рН, так чтобы после стерилизации он был $7,0 \pm 0,2$ при 25 °С.

5.2 Культуральная среда

5.2.1 Дихлоран-глицероловый агар 18 % (массовая концентрация) (DG18) (Ссылки [4], [5], [6])

5.2.1.1 Состав

| | |
|--|---------------------------|
| Казеиновый ферментный гидролизат | 5,0 г |
| D-Глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 10,0 г |
| Дигидрофосфат калия (KH ₂ PO ₄) | 1,0 г |
| Сульфат магния (MgSO ₄ · H ₂ O) | 0,5 г |
| Дихлоран (2,6-дихлор-4-нитроанилин) | 0,002 г |
| Глицерол безводный | 0,025 г |
| Агар | 12 г до 15 г ^a |
| Хлорамфеникол | 0,1 г |
| Вода, дистиллированная или деионизированная | 1 000 мл |
| ^a В зависимости от прочности студня агара. | |

5.2.1.2 Приготовление

5.2.1.2.1 Общие вопросы

Суспендируют в воде все ингредиенты, кроме хлорамфеникола, и доводят до кипения для полного растворения. При необходимости регулируют рН, так чтобы после стерилизации он был $5,6 \pm 0,2$ при 25 °С.

1) Tween 80 является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является поддержкой этого продукта со стороны ISO.

Добавляют 10 мл 1 %-ного раствора хлорамфеникола (массовая концентрация) в этаноле и перемешивают. Распределяют среду в большом количестве в удобные контейнеры (6.5) подходящей емкости. Стерилизуют в автоклаве при 121 °C в течение 15 мин.

Затем среду немедленно охлаждают в водяной бане (6.3), поддерживаемой при температуре от 44 °C до 47 °C. Охлаждают до температуры ниже 50 °C и распределяют в количествах по 15 мл в стерильные чашки Петри (6.6).

Оставляют среду до затвердевания и при необходимости сушат поверхность чашек, как описано в ISO 7218 и ISO/TS 11133 (все части).

Используют немедленно или хранят в темноте согласно ISO/TS 11133 (все части), пока не потребуются.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Следует избегать воздействия света на среду, поскольку цитотоксические продукты распада могут быть образованы в результате недооценки микофлоры в образцах.

5.2.1.2.2 Факультативное добавление гидрохлорида хлортетрациклина

Если возникают сложности из-за чрезмерного бактериального роста (например, при использовании сырого мяса), рекомендуется использовать хлорамфеникол (50 мг/л) и хлортетрациклин (50 мг/л). В этом случае готовят среду, как описано выше, только с использованием 50 мг хлорамфеникола, распределяют ее в количествах по 100 мл и стерилизуют. Готовят также раствор 0,1 % гидрохлорида хлортетрациклина (массовая концентрация) в воде (будучи относительно не устойчив в растворе, он должен быть свежеприготовленным) и стерилизуют фильтрацией. Непосредственно перед использованием добавляют 5 мл этого раствора асептически к 100 мл основной среды и разливают в чашки. Гентамицин не рекомендуется, так как согласно представленным данным он вызывает ингибирование некоторых видов дрожжевых грибов (Ссылка [3]).

5.2.1.2.3 Факультативное добавление микроэлементов

Для того чтобы плесневые грибы проявили свою полную морфологию, в частности пигменты, которые они обычно образуют, они нуждаются в микроэлементах, которые могут не присутствовать в DRBC. Чтобы идентифицировать плесневые грибы на этой среде, перед обработкой в автоклаве добавляют раствор следующих микроэлементов в количестве 1 мл на литр среды: ZnSO₄ · 7H₂O 1 г; CuSO₄ · 5H₂O 0,5 г; вода, дистиллированная или деионизированная, 100 мл (Ссылка [2]).

5.2.1.3 Испытание рабочих характеристик для гарантии качества культуральной среды

5.2.1.3.1 Общие вопросы

DG18 является твердой средой. Продуктивность и селективность испытывают по ISO/TS 11133 (все части) согласно следующим техническим условиям:

5.2.1.3.2 Продуктивность

| | |
|--------------------|---|
| Инкубация: | 5 дней при 25 °C ± 1 °C |
| Штаммы: | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 <i>Wallemia sebi</i> ATCC 42694 <i>Aspergillus restrictus</i> ATCC 42693 <i>Eurotium rubrum</i> ATCC 42690 или штаммы, зарегистрированные как эквивалентные в других грибковых семействах |
| Эталонные среды: | партия сред SDA (D-глюкозный агар Сабуро), уже валидированных |
| Контрольный метод: | количественный |

| | |
|-----------------------------|---|
| Критерии: | коэффициент продуктивности, $P_R \geq 0,5$ |
| Характеристическая реакция: | характеристические колонии/пропагулы/зародыши согласно каждому виду |

5.2.1.3.3 Селективность

| | |
|--------------------|--|
| Инкубация: | 5 дней при $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ |
| Штаммы: | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 или штаммы, зарегистрированные как эквивалентные в других бактериальных семействах |
| Контрольный метод: | качественный |
| Критерии: | полное ингибирование |

6 Аппаратура и стеклянная посуда

Одноразовая аппаратура является приемлемой альтернативой стеклянной посуде многоразового использования, если она обладает подходящими техническими характеристиками.

Обычное микробиологическое оборудование (см. ISO 7218) и, в частности, следующее.

6.1 Инкубатор, способный поддерживать температуру $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.2 Мерные пипетки, стерильные, с номинальной емкостью 1 мл, и градуированные с ценой деления 0,1 мл.

6.3 Водяная баня или аналогичная аппаратура, способная поддерживать температуру от 44 °C до 47 °C .

6.4 рН-метр, с точностью измерения до 0,1 единиц рН при 25 °C .

6.5 Бутылки, колбы и пробирки, для кипячения и хранения культуральной среды и для приготовления разведений.

6.6 Чашки Петри, стерильные, стеклянные или пластмассовые, с диаметром от 90 мм до 100 мм.

6.7 Микроскоп, для отличия дрожжевых грибов от бактериальных клеток (блестящая область, увеличение от 250 до 1 000 раз).

6.8 Шпатели, сделанные из стекла или пластика (диаметром меньше 2 мм и длиной 80 мм). Диаметр не должен превышать 2 мм, чтобы минимизировать количество образца, прилипающего к ним в конце процедуры его распределения.

6.9 Биноклярная лупа, для различения и дифференцирования колоний/клеток дрожжевых и плесневых грибов (увеличение от 6,5 до 50 раз).

7 Отбор проб

В лабораторию следует отправлять представительную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена во время транспортировки или хранения. Лабораторную пробу не замораживают.

Отбор проб не является частью метода, установленного в этой части ISO 21527. Отбор проб следует проводить согласно конкретному международному стандарту, соответствующему рассматриваемому

продукту. Если не существует конкретного международного стандарта, заинтересованным сторонам рекомендуется достичь соглашения по этому вопросу

8 Приготовление испытательного образца

Образец для испытания готовят согласно ISO 6887 (все части), ISO 7218, ISO 8261 и конкретному международному стандарту, относящемуся к рассматриваемому продукту. Если не существует конкретного международного стандарта, заинтересованным сторонам рекомендуется достичь соглашения по этому вопросу.

9 Процедура

9.1 Навеска, исходная суспензия и разведения

Приготавливают навеску, исходную суспензию (первичную суспензию) и последующие разведения согласно ISO 6887 (все части), ISO 7218, ISO 8261 и конкретному международному стандарту, соответствующему рассматриваемому продукту.

Помимо специального приготовления испытательного образца рекомендуется использовать в качестве растворителя 0,1 %-ную (массовая концентрация) пептонную воду с питательным бульоном (5.1.3). Использование перистальтического гомогенизатора предпочтительнее смесителя или шейкера.

По причине быстрого осаждения спор в пипетке (6.2) ее следует держать в горизонтальном (не вертикальном!) положении при заполнении соответствующим объемом исходной суспензии и разведений.

Встряхивают исходную суспензию и разведения для избежания осаждения частиц, содержащих микроорганизмы.

9.2 Инокуляция и инкубация

9.2.1 На одну агаровую пластинку с DG18 (5.2.1) переносят с помощью стерильной пипетки (6.2) 0,1 мл испытательного образца, если это жидкость, или 0,1 мл исходной суспензии в случае других продуктов (Раздел 8).

На вторую агаровую пластинку с DG18 переносят с помощью новой стерильной пипетки 0,1 мл первого десятикратного (10^{-1}) разведения (жидкий продукт) или 0,1 мл разведения 10^{-2} (другие продукты).

Для облегчения подсчета низких популяций дрожжевых и плесневых грибов объемы вплоть до 0,3 мл разведения 10^{-1} пробы или испытательного образца в случае жидкости можно нанести на три пластинки.

Эти операции повторяют с последующими разведениями, используя новую стерильную пипетку для каждого десятикратного разведения.

Для сыпучих частиц или твердых пищевых продуктов, например орехов или зерен, рекомендуется прямой посев на пластины. Образцы продуктов этого типа подвергают поверхностной дезинфекции в растворе 0,35 % (1 000 мкг/г) гипохлорита натрия при времени контакта 2 мин, затем промывают стерильной дистиллированной водой, сушат на стерильной бумаге и помещают на твердые среды (Ссылки [1, 2]).

9.2.2 Жидкость распределяют по поверхности агаровой пластинки стерильным шпателем (6.8), до тех пор пока она не будет полностью абсорбирована в среду.

Для инокуляции пластинок можно также использовать наливной метод, но в этом случае эквивалентность результатов должна быть валидирована при сравнении с поверхностной инокуляцией, и различие и дифференцирование плесневых и дрожжевых грибов не приемлемы. Метод нанесения на поверхность может дать более высокие результаты подсчета. Поверхностный метод обеспечивает максимальное воздействие атмосферного кислорода на клетки и предотвращает