

ТЕХНИЧЕСКИЕ  
УСЛОВИЯ

ISO/TS  
27265

IDF/RM  
228

Первое издание  
2009-08-01

---

---

**Молоко сухое. Подсчет особо  
теплостойких спор термофильных  
бактерий**

*Dried milk — Enumeration of the specially thermoresistant spores of the  
thermophilic bacteria*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.itech.ai)

ISO/TS 27265:2009

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/de90b569-514c-4c8b-adee-6cb60afb603a/iso-ts-27265-2009>

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



Ссылочные номера  
ISO/TS 27265:2009(R)  
IDF/RM 228:2009(R)

© ISO и IDF 2009

**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. Ни Центральный секретариат ISO, ни IDF не несут 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 и национальными комитетами IDF. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 27265:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de90b569-514c-4c8b-adee-6cb60afb603a/iso-ts-27265-2009>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO и IDF 2009

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 или IDF по соответствующему адресу, указанному ниже.

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

International Dairy Federation  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.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. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

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

При других обстоятельствах, особенно когда существует срочная потребность рынка в таких документах, технический комитет может принять решение о публикации других типов нормативного документа:

- общедоступные технические условия ISO (ISO/PAS) представляют собой соглашение между техническими экспертами в рабочей группе ISO и принимаются к публикации после одобрения более чем 50 % членов основного комитета, участвующих в голосовании;
- технические условия ISO (ISO/TS) представляют собой соглашение между членами технического комитета и принимаются к публикации после одобрения 2/3 членов комитета, участвующих в голосовании.

ISO/PAS или ISO/TS пересматриваются каждые три года для принятия решения либо о продлении их действия на следующие три года, либо о переработке для придания им статуса международного стандарта, либо о прекращении срока действия. Если принимается решение о продлении действия ISO/PAS или ISO/TS, они снова пересматриваются через следующие три года и тогда должны быть или преобразованы в международный стандарт или отменены.

Обращается внимание на то, что некоторые элементы данного документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO/TS 27265 | IDF/RM 228 были разработаны Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Они издаются совместно ISO и IDF.

## Предисловие

**Международная молочная федерация (IDF)** является некоммерческой организацией, представляющей мировой молочный сектор. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Главной задачей постоянных комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами рассылаются национальным комитетам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50% национальных комитетов, принимающих участие в голосовании.

При других обстоятельствах, особенно когда существует срочная потребность рынка в таких документах, Постоянный комитет может принять решение о публикации другого типа нормативного документа, называемого IDF: *Пересмотренный метод*. Такой метод представляет соглашение между членами Постоянного комитета и принимается для публикации при одобрении не менее 50 % членов комитета, принимающих участие в голосовании. *Пересмотренный метод* аналогичен ISO/PAS или ISO/TS и поэтому также будет опубликован совместно на условиях ISO.

Обращается внимание на то, что некоторые элементы данного документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO/TS 27265|IDF/RM 228 были подготовлены Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/ТС 34 *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5 *Молоко и молочные продукты*. Этот документ публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была проделана Совместной инициативной группой ISO-IDF по *Гармонизации* Постоянного комитета по *Микробиологическим методам анализа* под руководством руководителей проекта S. Miller (Новая Зеландия) и V. Hill (Новая Зеландия).

# Молоко сухое. Подсчет особо термостойких спор термофильных бактерий

## 1 Область применения

Настоящие технические условия устанавливают метод для подсчета колониеобразующих единиц (CFU) особо термостойких спор термофильных бактерий в продуктах из сухого молока, используя метод определения количества колоний при 55 °С после нагрева пробы при 106 °С.

Применение этих технических условий ограничено сухим цельным молоком, обезжиренным молоком и пахтой, которые предназначены для рекомбинирования и использования в производстве стерилизованных (например, путем пастеризации (УНТ) или автоклавирования) молочных продуктов.

## 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 7218, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям*

ISO 6887-5, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для анализа, первоначальных суспензий и десятичных разведений для микробиологического исследования. Часть 5. Специальные правила для приготовления молока и молочных продуктов*<sup>1)</sup>

ISO/TS 11133-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Правила приготовления и производства питательных сред. Часть 1. Общие правила по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории*

## 3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются следующие термины и определения.

### 3.1

#### **особо термостойкие споры термофильных бактерий** **specialy thermoresistant spores of thermophilic bacteria**

бактериальные споры, выживающие после термообработки при 106 °С в течение 30 мин, аэробно образуя колонии при 55 °С в неселективной среде при условиях, установленных в этих технических условиях

1) Заменяет ISO 8261|IDF 122.

## 4 Сущность метода

Установленное количество исходной суспензии анализируемой пробы подвергают тепловой обработке при 106 °C в течение 30 мин.

Залитые чашки Петри готовят, используя установленную неселективную питательную среду и установленное количество термообработанной исходной суспензии.

Другие чашки можно готовить в таких же условиях, используя десятичные разведения термообработанной исходной суспензии.

Чашки инкубируют аэробно при 55 °C в течение 48 ч.

Количество CFU особо терmostойких спор термофильных бактерий на грамм продукта вычисляют из числа колоний на чашках, выбранных при уровнях разведения, позволяющих получить значимый результат.

Особо терmostойкие споры термофильных бактерий, вычисленные данным методом, способны выживать в промышленных процессах стерилизации (например, УНТ или автоклавирование).

## 5 Чашечный подсчет бактерий с использованием агара ВСП (бромкрезоловый пурпурный) с массовой долей крахмала 0,2 % и обезжиренного молока

Общее руководство см. в ISO 7218.

Для анализа, если нет других указаний, используются реактивы только признанной аналитической чистоты и дистиллированная или деминерализованная вода или вода аналогичной чистоты.

### 5.1 Бромкрезоловый пурпурный

#### 5.1.1 Компоненты

Бромкрезоловый пурпурный	4 г
Объемная доля этанола 95 %	100 мл

#### 5.1.2 Приготовление

Бромкрезоловый пурпурный растворяют в этаноле. Хранят раствор в надежно закупоренной бутылке для предотвращения испарения.

### 5.2 Полная среда

#### 5.2.1 Компоненты

Триптон	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Моногидрат глюкозы	1,0 г
Обезжиренное сухое молоко <sup>a</sup>	1,0 г
Агар	8 г до 15 г <sup>b</sup>
Крахмал, растворимый <sup>c</sup>	2,0 г
Бромкрезоловый пурпурный <sup>c</sup> (5.1)	1 мл 1 000 мл
Вода	

<sup>a</sup> Обезжиренное сухое молоко должно быть свободно от ингибиторов.

<sup>b</sup> В зависимости от желирующей способности агара (прочность геля).

<sup>c</sup> Дополнительные компоненты, добавляемые к молочному агару для чашечного подсчета микроорганизмов.

### 5.2.2 Приготовление

Растворяют каждый компонент в воде, нагревая до кипения при частом перемешивании до полного растворения.

Если необходимо, регулируют pH, так чтобы после стерилизации он был  $7,0 \pm 0,2$  при  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Стерилизуют в автоклаве при  $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 15 мин.

Питательную среду можно также приготовить из подходящего промышленного дегидрированного агара с обезжиренным молоком для чашечного подсчета, к которому добавляются дополнительные компоненты.

## 6 Оборудование

Используется обычное микробиологическое лабораторное оборудование, в том числе требуемое для приготовления испытательных образцов и разведений по ISO 7218 и ISO 6887-5, и, в частности, следующее.

Вместо многоразовой стеклянной посуды можно использовать оборудование одноразового использования, если это соответствует техническим условиям.

**6.1 Инкубатор**, обеспечивающий поддержание температуры при  $55\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.2 Водяные бани**, обеспечивающие поддержание температур от  $15\text{ }^\circ\text{C}$  до  $25\text{ }^\circ\text{C}$  и при  $45\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.3 pH-метр**, с температурной компенсацией, обеспечивающий считывание до  $\pm 0,1$  pH единиц при  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.4 Оборудование для подогрева пробы**, резервуар высокого давления или небольшой автоклав, обеспечивающий повышение температуры пробы от  $100\text{ }^\circ\text{C}$  до  $105,5\text{ }^\circ\text{C}$  через  $< 6$  мин и поддержание температуры контрольной пробирки при  $106\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$  в течение всего периода обработки. Резервуар высокого давления должен обеспечивать быстрое охлаждение до  $100\text{ }^\circ\text{C}$  после завершения термообработки. Обычно для этого требуется наличие парового клапана в резервуаре.

Для резервуара высокого давления требуется модификация, если она уже не проведена, (например, путем прикрепления к крышке уплотняющего фитинга с резиновыми прокладками), обеспечивающая прохождение температурного датчика через крышку в резервуар.

В Приложении А в качестве примера дается детальное описание подходящего резервуара высокого давления.

**6.5 Цифровой термометр**, оснащенный узким измерительным температурным датчиком, который обладает точностью до  $106\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$  и может проходить через уплотняющий фитинг в крышку резервуара высокого давления.

**6.6 Источник нагрева**, газовое или электрическое оборудование.

**6.7 Пробирки**, с завинчивающейся пробкой и достаточной вместимостью, чтобы обеспечить адекватное свободное пространство для смешивания 10 мл испытательного образца. Завинчивающаяся пробка контрольной пробирки (см. 8.2.2) должна быть сконструирована таким образом, чтобы через неё проходил герметически вставляемый температурный датчик (6.5).

**6.8 Штатив для пробирок**, вставляемый в резервуар высокого давления, как показано в Приложении А.

**6.9 Таймеры** ( $\times 2$ ).

**6.10 Градуированные пипетки**, закупоренные ватным тампоном, калиброванные и обеспечивающие подачу  $1 \text{ мл} \pm 0,02 \text{ мл}$  и  $10 \text{ мл} \pm 0,2 \text{ мл}$  соответственно.

**6.11 Чашки Петри**, диаметром от 85 мм до 100 мм.

**6.12 Оборудование для подсчета колоний**, состоящее из освещенного основания с темным фоном, оснащенное увеличительной линзой с увеличением не менее 1,5 раза и механическим или электронным цифровым счетчиком.

## 7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в этом международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707 | IDF 50 [1].

В лабораторию должна быть отправлена репрезентативная проба. Она не должна быть повреждена или изменена во время транспортировки или хранения.

## 8 Процедура

### 8.1 Приготовление пробы для анализа и первичного разведения

Первичное разведение ( $10^{-1}$ ) готовят по ISO 6887-5.

### 8.2 Тепловая обработка пробы

**8.2.1** С помощью стерильной пипетки (6.10) переносят 10 мл первичного разведения ( $10^{-1}$ ) каждого испытательного образца в пробирку (6.7). Пробирку закрывают, но пробку туго не закручивают.

**8.2.2** Готовят контрольную пробирку, содержащую 10 мл первичного разведения ( $10^{-1}$ ) одного из испытательных образцов, используя такую же процедуру, как в 8.2.1.

**8.2.3** Помещают резервуар высокого давления (6.4), содержащий подходящий объем воды, на источник нагрева (6.6) и нагревают воду до кипения.

**8.2.4** Устанавливают пробирки с образцами и контрольную пробирку в штатив для пробирок (6.8). Вставляют температурный датчик (6.5) в завинчивающуюся пробку контрольной пробирки и полностью погружают в образец. Закрывают пробирку

**8.2.5** Когда вода закипает, помещают штатив с пробирками в резервуар высокого давления и включают один из таймеров (6.9). Нужно проследить, чтобы температурный датчик контрольной пробирки был погружен в образец, а температурный датчик резервуара находился внутри резервуара. Закрывают крышку резервуара высокого давления, оставляя паровой клапан открытым.

**8.2.6** Когда температура контрольной пробирки достигает  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , паровой клапан закрывают.

**8.2.7** Когда температура контрольной пробирки достигает  $105,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , останавливают таймер и записывают время. Время не должно превышать 6 мин.

**8.2.8** Когда температура контрольной пробирки достигает  $105,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , включают второй таймер (6.9).

**8.2.9** Дают температуре подняться, так чтобы в контрольной пробирке она достигла  $106 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Стабилизируют при этой температуре для продолжения испытания, уменьшая доступ тепла от источника нагрева, чтобы поддерживать правильную температуру и предотвращать ненужное испарение воды.

**8.2.10** Через 30 мин после включения второго таймера (8.2.8) отключают источник нагрева. Убирают резервуар высокого давления от источника нагрева и немедленно сбрасывают давление, осторожно открывая паровой клапан, чтобы достигнуть быстрого падения температуры. Открывают резервуар высокого давления, как только температура контрольной пробирки упадет ниже 100 °С. Сразу же переносят штатив с образцами в водяную баню (6.2), поддерживаемую при температуре от 15 °С до 25 °С для охлаждения образцов.

### 8.3 Инокуляция и инкубация

**8.3.1** После охлаждения образцов готовят шесть стерильных чашек Петри (6.11). С помощью стерильной пипетки (6.10) переносят 1 мл нагретого испытательного образца ( $10^{-1}$  разведение) в три из шести чашек, используя приблизительно по трети образца для каждой чашки.

NOTE Этот метод уменьшает мутность агара и тем самым обеспечивает хорошую видимость всех колоний.

Эту процедуру повторяют для остальных чашек.

**8.3.2** Готовят  $10^{-2}$  разведение для нагретого испытательного образца. Берут следующие две стерильные чашки Петри (6.11). Используя другую стерильную пипетку, переносят 1 мл  $10^{-2}$  разведения в каждую из двух чашек.

**8.3.3** При необходимости эту операцию повторяют, используя дальнейшие десятичные разведения по ISO 6887-5.

**8.3.4** Разливают 15 мл питательной среды (раздел 5), предварительно расплавленной и поддерживаемой в водяной бане (6.2) при 45 °С, в каждую из приготовленных чашек Петри.

**8.3.5** Тщательно перемешивают инокулят (посевной материал) со средой, переворачивая чашки Петри. Оставляют смесь затвердевать в чашках Петри, стоящих на холодной горизонтальной поверхности.

**8.3.6** Время между приготовлением первого разведения и смешиванием инокулята с питательной средой не должно превышать 15 мин.

**8.3.7** Следует готовить достаточное количество контрольных пластин, чтобы контролировать стерильность.

**8.3.8** Приготовленные таким образом чашки переворачивают и помещают в инкубатор (6.1) при 55 °С на  $48 \text{ ч} \pm 2 \text{ ч}$ . Чтобы свести к минимуму испарение, чашки помещают в герметичный пластиковый пакет.

### 8.4 Подсчет колоний

**8.4.1** После установленного периода инкубации (8.3.8) определяют количество колоний на каждой чашке Петри при ослабленном освещении, используя оборудование для подсчета колоний (6.12). Точечные колонии должны быть включены.

Бромкрезоловый пурпурный, добавленный к питательной среде (Clause 5), улучшает видимость колоний. Однако колонии могут быть пурпурными или желтыми в зависимости от того, образовалась ли кислота. Поэтому нужно считать все колонии на чашке.

**8.4.2** Оператор должен стараться избежать ошибки, принимая частицы нерастворенного или осажденного вещества в чашках за точечные колонии.

Нужно тщательно исследовать объекты, при необходимости используя более высокое разрешение, так чтобы отличать колонии от постороннего вещества.

**8.4.3** Распространяющиеся колонии следует рассматривать как единичные. Если меньше четверти чашки заросло распространяющимися колониями, нужно считать колонии не на заросшей части чашки. Вычисляют соответствующее число на всей чашке.

Если больше четверти чашки заросло распространяющимися колониями, отбрасывают счет.

**8.4.4** Когда 1 мл пробы ( $10^{-1}$  разведение) было распределено по трем чашкам, записывают общее число колоний на отдельных чашках как число для этого конкретного разведения.

**8.4.5** Задерживают чашки и записывают результаты, где количества CFU для одной чашки (или совокупные суммы для трех чашек) меньше 300. Также должно быть обеспечено, чтобы были записаны все подсчеты в рассматриваемом диапазоне (включая подсчеты вне статистически обоснованного диапазона).

## 8.5 Вычисление и выражение результатов испытания

См. ISO 7218 для вычисления и выражения результатов испытания.

## 9 Повторяемость

Абсолютная разность между результатами двух независимых единичных испытаний, полученными с использованием одного и того же метода на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором в течение короткого интервала времени, не более чем в 5 % случаев может превышать  $0,4 \lg n^2$ , где  $n$  есть число CFU.

ПРИМЕЧАНИЕ Определения повторяемости см. в ISO 5725-1 [2].

Если требования повторяемости не удовлетворены, исследуют возможные причины ошибки.

## 10 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать как минимум следующую информацию:

- a) всю информацию, требуемую для полной идентификации пробы;
- b) используемый метод отбора проб, если известно;
- c) используемый метод испытания со ссылкой на эти технические условия;
- d) все рабочие детали, не установленные в этих технических условиях или рассматриваемые как факультативные, с деталями любых инцидентов, которые могли повлиять на результаты испытания;
- e) полученные результаты испытания с четким упоминанием используемого метода выражения.

---

2)  $\lg n = \log_{10} n$