
**Молоко и молочные продукты.
Подсчет презумптивных
бифидобактерий. Техника подсчета
колоний при 37 °C**

*Milk products — Enumeration of presumptive bifidobacteria — Colony
count technique at 37 °C*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 29981:2010

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be6f26ba-a8a4-41d8-ba32-
db63b8c1c485/iso-29981-2010](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be6f26ba-a8a4-41d8-ba32-db63b8c1c485/iso-29981-2010)

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



Ссылочные номера
ISO 29981:2010(R)
IDF 220:2010(R)

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 смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, 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 29981:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be6f26ba-a8a4-41d8-ba32-db63b8c1c485/iso-29981-2010>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO и IDF 2010

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 разрешения в письменной форме от ISO или IDF, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному 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
Web 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
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие.....	iv
Предисловие.....	v
1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения.....	2
4 Сущность метода.....	2
5 Питательные среды, разбавители и реактивы	3
5.1 Основные материалы	3
5.2 Разбавитель(и).....	3
5.3 Питательная среда (среда TOS-MUP).....	3
6 Аппаратура	5
7 Отбор проб	6
8 Проведение анализа	6
8.1 Общие положения	6
8.2 Подготовка пробы для анализа и первичное разведение	7
8.3 Исследование под микроскопом.....	8
8.4 Приготовление десятичных разведений.....	8
8.5 Посев.....	8
8.6 Продолжительность опыта.....	9
8.7 Инкубирование	9
8.8 Подсчет колоний.....	9
8.9 Считывание чашек Петри — подтверждение.....	9
9 Расчет и обработка результатов	9
9.1 Расчет.....	9
9.2 Обработка результатов	10
10 Прецизионность.....	11
10.1 Межлабораторное испытание.....	11
10.2 Повторяемость (сходимость)	11
10.3 Воспроизводимость.....	12
10.4 Показатели прецизионности, совместно определенные для молочных продуктов.....	12
11 Квалификация при применении данного метода.....	14
12 Протокол испытания.....	14
Приложение А (информативное) Межлабораторное испытание. Испытания 'бифидо' по круговой системе.....	16
Библиография	18

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 работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные 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.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы данной части ISO 16065 могут быть объектом патентных прав. Организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 29981|IDF 220 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Стандарт публикуется совместно ISO и IDF.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be6f26ba-a8a4-41d8-ba32-db63b8c1c485/iso-29981-2010>

Предисловие

Международная молочная федерация (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей всемирное молочное животноводство. Членами IDF являются Национальные комитеты каждой страны-члена, а также региональные ассоциации по молочному животноводству, которые имеют подписанное официальное соглашение о совместной деятельности с IDF. Каждый член IDF имеет право быть представленным в Постоянных комитетах IDF, осуществляющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO по вопросам разработки стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Основная задача Постоянных комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Постоянными комитетами, рассылаются Национальным комитетам для утверждения до опубликования в качестве международных стандартов. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % Национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. IDF не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 29981|IDF 220 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Стандарт публикуется совместно ISO и IDF.

Вся работа была выполнена совместной рабочей группой ISO-IDF по *Молочнокислым бактериям и стартовым культурам* при Постоянном комитете по *Микробиологическим методам анализа* под руководством лидеров проекта, проф. В. Кнейфеля (W. Kneifel) (Австрия) и д-ра У.Зитца (U. Zitz) (Австрия).

Молоко и молочные продукты. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Техника подсчета колоний при 37 °C

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод селективного подсчета презумптивных бифидобактерий в молочных продуктах, используя технику подсчета колоний при температуре 37 °C в анаэробных условиях.

Этот метод применим к молочным продуктам, например, к ферментированным и неферментированным продуктам, сухому молоку, детским молочным смесям и закваскам, там где рассматриваемые микроорганизмы присутствуют наряду с другими молочнокислыми бактериями и жизнеспособны. (Для предлагаемых критериев качества молочных продуктов, см., например, стандарт Codex Stan 243:2003 [6].)

Бифидобактерии, используемые в молочных продуктах, обычно относятся к следующим видам (например, см. Ссылки [7], [8], [16]):

- a) *Bifidobacterium adolescentis*;
- b) *B. animalis* subsp. *animalis*;
- c) *B. animalis* subsp. *lactis*;
- d) *B. bifidum*;
- e) *B. breve*;
- f) *B. infantis*;
- g) *B. longum*.

2 Нормативные ссылки

Следующие нормативные документы являются обязательными для применения с настоящим международным стандартом. Для жестких ссылок применяются только указанное по тексту издание. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 6887-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений*

ISO 6887-5, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 5. Специальные правила для приготовления молока и молочных продуктов*

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

ISO 7889|IDF 117, *Йогурт. Подсчет характеристических микроорганизмов. Метод определения количества колоний при 37 °C*

ISO/TS 11133-1, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории*

ISO 14461-1|IDF 169-1, *Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка работы аналитика при подсчете числа колоний*

ISO 14461-2|IDF 169-2, *Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчета числа колоний при посеве на параллельных чашках Петри с последующими стадиями разведений*

3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

3.1 бифидобактерии
bifidobacteria
анаэробные микроорганизмы, которые образуют колонии двояковыпуклой или круглой формы белесого цвета, частично в форме звездочки или трехлопастной формы диаметром от 1 мм до 4 мм на питательной среде, приготовленной на основе олигосахаридов, обработанных трансгалактозой с добавлением литиевой соли мупироцина (TOS-MUP), в условиях, установленных в данном международном стандарте

iTeh STANDARD PREVIEW

ISO 29981:2010

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/be6f26ba-a8a4-41d8-ba32-db63b8c1c485/iso-29981-2010>

4 Сущность метода

4.1 Антибиотик, литиевая соль мупироцина (MUP), подавляет рост большинства молочнокислых бактерий, обычно используемых в ферментированных и неферментированных молочных продуктах.

Благодаря доказанной избирательности антибиотика MUP при добавлении его в питательную среду обычно не происходит роста типичных йогуртовых бактерий (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), мезофильных культур (например, *Lactococcus lactis*), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus rhamnosus* на установленной среде.

Это свойство протестировано на репрезентативном количестве контрольных штаммов и выделенных культур.

Кроме того, среда TOS-на агаре способствует росту бифидобактерий, используемых в молочных продуктах (см. Ссылку [17]).

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Фазово-контрастная микроскопия с применением 100-кратного увеличения и масляной иммерсии показывает палочки очень разнообразных форм, обычно искривленные и с утолщениями, зачастую ветвистые, растущие по отдельности, парами, группами, располагающимися клином (V-образная форма расположения колоний), цепочками, столбиками из параллельно расположенных клеток, или розетками, порою демонстрирующими форму набухшей сферы (кокка).

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Бифидобактерии не являются кислотоустойчивыми, спорообразующими микроорганизмами, они – грамм-положительные, немобильные и каталаза-отрицательные хемоорганотрофы, которые выделяют уксусную кислоту и молочную кислоту. Глюкоза разлагается полностью и характерным образом посредством фруктоза-6-фосфатного шунта, в котором фруктоза-6-фосфат-фосфокетолаза (F6PPK, EC 4.1.2.22) расщепляет фруктоза-6-фосфат на ацетилфосфат и эритроза-4 фосфат.

ПРИМЕЧАНИЕ 3 Температура оптимального роста находится в интервале от 37 °C до 41 °C. Для дополнительной информации см. Ссылку [9].

4.2 Посев десятичных разведений гомогенизированной пробы в TOS-агар с добавлением MUP, пользуясь чашечным методом, с последующей анаэробной инкубацией при температуре 37 °C в течение 72 ч.

4.3 Подсчет колоний.

ПРИМЕЧАНИЕ Как вариант, выбранные культуры из чашек можно подтвердить соответствующими тестами (например, анализом F6РРК, см. Ссылки [14][15]).

4.4 Количество бифидобактерий в грамме пробы рассчитывают по числу колоний, полученных в чашках с разведениями такой концентрации, чтобы получить значимый результат.

5 Питательные среды, разбавители и реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний, и дистиллированную или деминерализованную воду или воду равноценной чистоты.

5.1 Основные материалы

См. ISO 6887-5 и ISO/TS 11133-1 в отношении основных материалов.

5.2 Разбавитель(и)

См. ISO 6887-5 в отношении приготовления разбавителей.

Чтобы обеспечить сопоставимость результатов в установленных колониеобразующих единицах (КОЕ = CFU), соблюдают следующие правила.

- Используют раствор Рингера (Ringer's) с ¼ концентрации или любой другой подходящий разбавитель, установленный в ISO 6887-5 и подтвержденный как эквивалентный.
- Стерилизуют в массе и используют подходящий стерильный дозатор.
- Доводят разбавитель до комнатной температуры. Переносят разбавитель стеканием каплями, не захватывая воздух.
- Неопределенность измерения используемых объемов должна соответствовать требованиям ISO 6887-1.

5.3 Питательная среда (среда TOS-MUP)

Используют свежеприготовленную среду на основе обработанных трансгалактозой олигосахаридов с добавлением литиевой соли мупироцина (TOS-MUP), защищенную от прямого солнечного света.

5.3.1 Основная среда (среда TOS-пропионат на агаре, см. Ссылку [10])

5.3.1.1 Состав

Пептон триптиказа	10,0 г
Дрожжевой экстракт	1,0 г
KH_2PO_4	3,0 г
K_2HPO_4	4,8 г
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
(R)-Цистеин·HCl·H ₂ O	0,5 г
Пропионат натрия	15,0 г
TOS (см. 5.3.1.2)	10,0 г
Агар-агар	15,0 г
Вода	950 мл

5.3.1.2 Смесь олигосахаридов-- трансгалактозы

Смесь TOS получают ферментативным гидролизом лактозы, используя β -галактозидазу *Aspergillus oryzae*. Смесь TOS содержит галактозу (Gal) и глюкозу (Glc), вычисляемых по формулам

$$[\text{Gal}^x(\text{Gal})_n\frac{y}{n}\text{Glc}]$$

где

$$n = 1 \dots 4;$$

$$x = \beta\text{-}1,6 > \beta\text{-}1,4 \text{ and } \beta\text{-}1,3;$$

$$y = \beta\text{-}1,4 \gg \beta\text{-}1,3 \text{ and } \beta\text{-}1,6.$$

Смесь TOS очищают с помощью хроматографии в определенных условиях (см. Ссылки [18][19]Общее содержание сахара (> 97 % по массе) включает определенную часть три-, тетра-, пента- и гексасахаридов. (Изменение соотношения олигосахаридов не имеет заметного влияния на потенциал среды.)

5.3.1.3 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в 950 мл воды при осторожном нагревании (например, на нагревательной плитке или водяной бане) при частом помешивании до полного растворения.

Распределяют по склянкам вместимостью 250 мл по 190 мл в каждую. Регулируют pH (6.6), при необходимости, так чтобы после обработки в автоклаве установился pH на уровне $6,3 \pm 0,2$ единиц при температуре 25 °C.

Обрабатывают в автоклаве основную среду при температуре 115 °C в течение 15 мин.

Если среду не используют сразу, то ее охлаждают, если нет иных указаний. Хранят среду при температуре от 2 °C до 4 °C не более 1 недели в условиях, не вызывающих изменений состава среды.

Среда TOS чувствительна к теплу, поэтому избыточная тепловая обработка может отрицательно сказаться на свойствах среды. Полные среды TOS-пропионат имеются в продаже и имеют состав, соответствующий данному международному стандарту. Однако, если среду готовят в лаборатории, то результаты могут существенно отличаться для сред, приготовленных в разное время. Поэтому среды рекомендуется подтверждать, чтобы убедиться, что рост бифидобактерий, указанный в единицах КОЕ, остается на сопоставимом уровне (см. также ISO/TS 11133-1).

5.3.2 Вспомогательный раствор MUP (см. Ссылку [11])

Непосредственно перед применением, растворяют, например, 50 мг MUP в 50 мл воды, или другие количества в тех же пропорциях. Стерилизуют полученный раствор фильтрацией через мембрану (размер пор 0,22 мкм) в соответствии с 5.3.3.

5.3.3 Полная среда

Непосредственно перед применением расплавляют порции по 190 мл приготовленной основной среды (5.3.1) с помощью пара или аналогичным способом. Охлаждают на водяной бане (6.5) до температуры 48 °C ± 1 °C. Добавляют 10 мл вспомогательного раствора MUP (5.3.2) в каждую склянку шприцем, оснащенным стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм (6.11) незадолго до разлива. Тщательно перемешивают, без образования пузырьков воздуха.

Снова помещают полную среду на водяную баню (6.5) при температуре 48 °C и держат, пока она не будет готова к разливу.

Полная среда TOS-MUP должна иметь конечную концентрацию MUP равную 50 мг/л.

6 Аппаратура

Стерилизация оборудования, которое контактирует с анализируемой пробой, разбавителем, разведениями или питательной средой, должна осуществляться в соответствии с требованиями ISO 6887-5, а также ISO/TS 11133-1. Стеклопосуда должна выдерживать многократную стерилизацию.

Используют обычное оборудование микробиологических лабораторий (см. ISO 7218) для приготовления проб для анализа и разведений, в соответствии с требованиями ISO 6887-5. В частности, требуется следующее оборудование.

6.1 Оборудование для инкубирования (термостатирования), обычно применяемые сосуды, или, как вариант, анаэробный инкубатор.

6.1.1 Инкубатор (термостат), обеспечивающий поддержание температуры 37 °C ± 1 °C.

6.1.2 Анаэробные культуральные склянки, обеспечивающие поддержание анаэробной атмосферы, содержащей от 10 % до 20 % диоксида углерода по массе; приблизительно от 70 % до 90 % азота по объему и приблизительно 10 % водорода по объему (необязательно). Газовая смесь не должна содержать более 1 % кислорода по объему.

Можно использовать другие подходящие и безопасные низкотемпературные каталитические системы.

6.1.3 Анаэробный инкубатор, поддерживающий температуру на уровне 37 °C ± 1 °C, обеспечивая анаэробную атмосферу (см. 6.1.2).

6.2 Механическая мешалка, обеспечивающая перемешивание содержимого пробирок, например, вихревой смеситель.