МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 7889— 2015

ЙОГУРТ

Подсчет характерных микроорганизмов. Методика подсчета колоний микроорганизмов после инкубации при температуре 37 °С

(ISO 7889:2003/IDF 117:2003, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 февраля 2015 г. № 75-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 июля 2016 г. № 824-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 7889—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 7889:2003/IDF 117:2003 «Йогурт. Подсчет характеристических микроорганизмов. Метод определения количества колоний при 37 °С» («Yogurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 °C », IDT).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной молочной федерацией (IDF) совместно с Международной ассоциацией химиков-аналитиков (AOAC International).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2003 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 2
5 Питательная среда, разбавители и реактивы 2
6 Оборудование и посуда 4
7 Отбор проб 5
8 Подготовка пробы для испытания 5
9 Проведение испытания 5
10 Расчет и выражение результатов 6
11 Прецизионность 8
12 Протокол испытаний 8
Приложение А (справочное) Примечания к методике 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 10
Библиография 11

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЙОГУРТ

Подсчет характерных микроорганизмов. Методика подсчета колоний микроорганизмов после инкубации при температуре 37 °С

Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms.
Colony-count technique after incubation at 37 °C

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод подсчета характерных микроорганизмов в йогурте посредством подсчета колоний микроорганизмов при температуре 37 °С.

Метод применим к йогуртам, в которых присутствуют жизнеспособные микроорганизмы (видов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophillus*).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений)

ISO 7218, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям)

ISO 8261/IDF 122, Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination (Молоко и молочные продукты. Общее руководство по подготовке образцов для испытания, исходных суспензий и децимолярных растворов для микробиологического исследования)[1)]

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **характерные микроорганизмы в йогурте** (characteristic microorganisms in yogurt): *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophillus*, обнаруживаемые в условиях, описанных в настоящем стандарте.

[1)] Заменен на ISO 6887-5—2010.

Издание официальное

3.2 ***Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus:*** Термофильный микроорганизм, образующий чечевицеобразные часто заостренные колонии диаметром 1—3 мм на подкисленной среде (MRS) в условиях, описанных в настоящем стандарте.

Примечание — Под микроскопом эти микроорганизмы выглядят как палочки, обычно короткие, но иногда имеют удлиненную форму. Они не образуют спор, грамположительные, неподвижные и каталазонегативные.

3.3 ***Streptococcus thermophillus:*** Термофильный микроорганизм, образующий чечевицеобразные колонии диаметром 1—2 мм в среде М17 в условиях, описанных в настоящем стандарте.

Примечание — Под микроскопом эти микроорганизмы выглядят как сферические или овоидные клетки (диаметром 0,7—0,9 мкм), располагаемые парами или длинными цепочками. Грамположительные и каталазонегативные.

4 Сущность метода

4.1 Десятикратное разведение исследуемого образца инокулируют в.

a) подкисленную среду (MRS), далее инкубируют в аэробных условиях при температуре 37 °С ± 1 °С в течение 72 ч, подсчитывают количество *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;

b) полную среду (М17) далее инкубируют в аэробных условиях при температуре 37 °С ± 1 °С в течение 48 ч, подсчитывают количество *Streptococcus thermophillus*.

4.2 Колонии подсчитывают и подтверждают полученные результаты посредством проведения соответствующих испытаний.

4.3 Число характерных микроорганизмов на грамм образца рассчитывают исходя из количества колоний, полученных на чашках, при таких уровнях разведения, которые дают значимый результат.

5 Питательная среда, разбавители и реактивы

Используют только признанные аналитически чистые реактивы, дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты по ISO 6887-1 и ISO 8261/IDF 122.

5.1 Разбавитель

Разбавитель по ISO 6887-1 и ISO 8261/IDF 122.

5.2 Питательная среда

Используют свежеприготовленную питательную среду (MRS и М17), которую нельзя подвергать воздействию прямого солнечного света.

Если приготовленные питательные среды используют не сразу, то их охлаждают и хранят при температуре 2 °С — 4 °С не более 1 недели в условиях, которые не изменяют их состава.

Условия хранения установлены в ISO 7218.

5.2.1 Окисленная среда MRS (см. [7])

5.2.1.1 Состав

Пептон 1 (триптический гидролизат казеина), г	10,0
Мясной экстракт, г	10,0
Дрожжевой экстракт (сухой), г	5,0
Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$), г	20,0
Твин 80 (сорбитан моноолеат), $см^3$	1,0
Двузамещенный фосфорнокислый калий (K_2HPO_4), г	2,0
Натрия ацетат тригидрат ($CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$), г	5,0
Цитрат диаммония [$C_6H_6O_7(NH_4)_2$], г	2,0
Гептагидрат сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), г	0,2
Сульфат марганца тетрагидрат ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$), г	0,05

Агар, г [1)]	9,0—18,0
Вода в объеме до, см^3	1000

5.2.1.2 Приготовление

Каждый компонент растворяют отдельно на водяной бане (6.7) при температуре кипения. Охлаждают на другой водяной бане (6.7) до температуры 50 °С. Используя уксусную кислоту (5.3.3), корректируют уровень pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 5,4 ± 0,1 ед. pH при измерении при помощи pH-метра (6.8) при температуре 25 °С ± 1 °С. Среду переносят по 100 см^3 во флаконы вместимостью 150 см^3 (6.10) или по 200 см^3 во флаконы вместимостью 250 см^3 (6.10). Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре 121 °С ± 1 °С.

Примечания

1 Среда MRS высокочувствительна к тепловой обработке, которая может вызвать различия в зависимости от используемого автоклава.

2 Сличительные испытания показали, что коммерчески доступные среды MRS могут дать число микроорганизмов, которое меньше числа, наблюдаемого в среде MRS, приготовленной согласно настоящему стандарту. Поэтому в случае использования коммерчески доступной среды MRS ее следует проверить в сравнении со средой, приготовленной согласно настоящему стандарту.

До начала проведения бактериологического исследования полностью расплавляют необходимое количество среды на водяной бане (6.7) при температуре кипения или путем обработки паром в закрытом контейнере. Затем охлаждают на другой водяной бане (6.7).

5.2.2 Среда M17 (см. [8])

5.2.2.1 Основная среда

5.2.2.1.1 Состав

Пептон 1 (триптический гидролизат казеина), г	2,5
Пептон 2 (пептический гидролизат мяса), г	2,5
Пептон 3 (папаиновый гидролизат сои), г	5,0
Дрожжевой экстракт (сухой), г	2,5
Мясной экстракт, г	5,0
β-глицерофосфат (динатриевая соль) ($C_3H_7O_6PNa_2$), г	19,0
Гептагидрат сульфата магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), г	0,25
Аскорбиновая кислота ($C_6H_8O_6$), г	0,50
Агар, г [1)]	9,0—18,0
Вода в объеме до, см^3	950

5.2.2.1.2 Приготовление

Отдельно растворяют каждый компонент на водяной бане (6.7) при температуре кипения. Охлаждают на другой водяной бане (6.7) до 50 °С. Корректируют уровень pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 6,8 ± 0,1ед. pH при температуре 25 °С ± 1 °С, используя реактив (5.3) и проверяют уровень pH при помощи pH-метра (6.8). Среду переносят по 95 см^3 во флаконы вместимостью 150 см^3 (6.10). Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре 121 °С ± 1 °С.

5.2.2.2 Раствор лактозы

5.2.2.2.1 Состав

Лактоза ($C_{12}H_{22}O_{11}$), г	10,0
Вода в объеме до, см^3	100

[1)] В зависимости от устойчивости геля в агаре или согласно указаниям изготовителя.

5.2.2.2.2 Приготовление

Растворяют лактозу в воде. Разводят водой до 100 см^3. Стерилизуют в течение 15 мин в автоклаве при температуре 121 °С ± 1 °С.

5.2.2.3 Полная среда (М17)

5.2.2.3.1 Состав

Основная среда (5.2.2.1), см^3	95,0
Раствор лактозы (5.2.2.2), см^3	5,0

5.2.2.3.2 Приготовление

Непосредственно перед использованием расплавляют основную среду на водяной бане (6.7) при температуре кипения. Охлаждают на другой водяной бане (6.7) до температуры 50 °С. Предварительно нагревают раствор лактозы на водяной бане (6.7), установленной на температуру 50 °С. Добавляют раствор лактозы в основную среду и перемешивают вихревыми движениями. Охлаждают среду на водяной бане до температуры 44 °С — 47 °С.

Примечание — Полная среда М17 доступна в продаже, но может показать результаты, существенно отличающиеся в зависимости от поставщика. Поэтому в случае использования коммерчески доступной среды М17 ее следует проверить в сравнении со средой, приготовленной согласно настоящему стандарту.

5.3 Реактивы для корректировки pH

5.3.1 Раствор гидроокиси натрия, *c*(NaOH) = приблизительно 0,1 моль/дм^3.

5.3.2 Разведенная соляная кислота, *c*(HCl) = приблизительно 0,1 моль/дм^3.

5.3.3 Уксусная кислота (CH_3COOH), 100 % (ледяная).

5.4 Реактив для окрашивания, этиловый раствор метиленового синего, 6 г/дм^3.

5.5 Реактив для очистки поверхности контейнера, этанол 70 % (объемная доля).

6 Оборудование и посуда

Стерилизацию оборудования, контактирующего с исследуемым образцом, разбавителем, разведениями или питательной средой, проводят согласно требованиям ISO 8261/IDF 122. Лабораторная посуда должна быть устойчивой к многократной стерилизации.

Применяют обычное микробиологическое лабораторное оборудование (см. ISO 7218) для приготовления исследуемых образцов и разведений, указанное в ISO 8261/IDF 122, в частности указанное ниже.

6.1 Инкубатор, поддерживающий температуру 37 °С ± 1 °С.

6.2 Камера для анаэробной инкубации или анаэростаты, поддерживающие температуру 37 °С ± 1 °С, обеспечивающие атмосферу с 90 % азота и 10 % углекислого газа.

6.3 Смеситель перистальтический (стомахер) со стерильными пластиковыми пакетами или роторный, работающий при минимальной частоте вращения 20000 об/мин, со стерильными круглодонными центрифужными пробирками из упрочненного стекла вместимостью 200 см^3 или металлическими контейнерами соответствующей емкости.

6.4 Мешалка для пробирок, например вортекс.

6.5 Прибор для подсчета колоний, указанный в ISO 7218.

6.6 Лупа с увеличением от ×8 до ×10.

6.7 Водяные бани, способные поддерживать температуру 44 °С — 47 °С, 45 °С ± 1 °С, 50 °С ± 1 °С и работать в режиме кипения.

6.8 Прибор для измерения pH, способный обеспечивать измерения с точностью до ± 0,1 ед. pH при температуре 25 °С ± 1 °С (см. ISO 7218).

6.9 Флаконы для разведения вместимостью 50—250 см^3 или пробирки для испытаний диаметром и длиной 18 × 180 мм, с подходящими уплотнительными колпачками или пробками из резины или синтетического материала.

6.10 Колбы или флаконы с резиновыми пробками или крышками вместимостью 150—250 см^3.

6.11 Пробирки для испытаний с резиновыми пробками или крышками вместимостью 20 см^3 для питательной среды.

6.12 Градуированные пипетки для бактериологического использования, стерилизованные, с одной меткой (выдувные), с широкими отверстиями, номинальной вместимости (1 ± 0,02) $см^3$ и (10 ± 0,2) $см^3$ (см. ISO 6887-1).

6.13 Чашки Петри из прозрачного бесцветного стекла или пластика диаметром 90—140 мм, с внутренней глубиной не менее 10 мм. Дно не должно иметь неровностей, которые могли бы помешать подсчету колоний.

6.14 Палочка стеклянная или металлическая, стерилизованная.

7 Отбор проб

В лабораторию должна быть доставлена представительная проба. Во время транспортирования и хранения не допускается какое-либо ее изменение или порча.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в [1].

8 Подготовка пробы для испытания

Пробу для испытания готовят согласно ISO 8261.

Перед открытием упаковки с йогуртом необходимо соблюдение следующих мер предосторожности. Очищают внешнюю поверхность, окружающую ту область, из которой будет взята проба, с целью удаления любого вещества, которое может загрязнить пробу. Этот участок протирают 70 %-ным этанолом (5.5) с целью предотвращения дальнейшего загрязнения. Контейнер открывают в асептических условиях.

9 Проведение испытания

9.1 Приготовление навески

9.1.1 Общие положения

Общие требования приведены в ISO 8261/IDF 122.

9.1.2 Йогурты без фруктовых наполнителей

Тщательно перемешивают содержимое упаковки с йогуртом, используя стерильную палочку (6.14). Взвешивают (10 ± 0,1) г исследуемого образца в соответствующий контейнер (например, в круглодонную центрифужную пробирку из упрочненного стекла вместимостью 200 $см^3$ или в чашу роторного смесителя, или в пластиковый контейнер перистальтического смесителя (6.3)).

9.1.3 Йогурты с фруктовыми наполнителями

Перемешивают содержимое упаковки с йогуртом в течение 1 мин, используя смеситель (6.3). Отвешивают (10 ± 0,1) г исследуемого образца в соответствующий контейнер согласно 9.1.2.

9.2 Микроскопическое исследование

Проводят микроскопическое исследование нескольких полей препарата, приготовленного из исследуемого образца (раздел 8) и предварительно окрашенного метиленовым синим (5.4), с целью определения количества двух видов бактерий (кокков и палочек) и выбора необходимого диапазона разведений, который будет использован для посева каждого вида бактерий.

9.3 Приготовление первого разведения

По ISO 8261/IDF 122.

Операции, описанные в 9.3—9.6.4, не проводят под прямым солнечным светом.

К навеске (9.1.1 или 9.1.2) добавляют разбавитель (5.1) до получения массы навески и разбавителя 50 г. Перемешивают в течение 1 мин на смесителе (6.3). Разводят до 100 г разбавителем до получения степени разведения 10^{-1}.

9.4 Приготовление десятикратных разведений

По ISO 8261/IDF 122.

9.5 Длительность процедуры

См. ISO 8261/IDF 122.

9.6 Инокуляция и инкубация

9.6.1 Стерильной пипеткой (6.12) переносят по 1 см^3 каждого разведения в чашки Петри (6.13) отдельно для определения *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *S. thermophillus* (по две чашки Петри на каждое испытание).

9.6.2 Чашки Петри (6.13) с инокулятом для определения *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* заливают 15 см^3 подкисленной среды MRS (5.2.1), выдержанной на водяной бане (6.7) при температуре 45 °С.

9.6.3 Чашки Петри (6.13) с инокулятом для определения *S. thermophillus* заливают 15 см^3 среды M17 (5.2.2), нагретой на водяной бане (6.7) при температуре 44 °С — 47 °С.

9.6.4 Тщательно перемешивают инокулят со средой, вращая чашки Петри (9.6.2 или 9.6.3). Дают смеси затвердеть, оставив чашки Петри на горизонтальной холодной поверхности.

9.6.5 Инкубируют подготовленные чашки в перевернутом положении. Складывают не более шести в высоту. Стопки чашек должны быть отделены друг от друга, от стенок и от верха инкубатора (6.1).

9.6.6 Инкубируют чашки, которые будут использованы для подсчета *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, в камере для анаэробной инкубации или анаэростате (6.2) в инкубаторе (6.1), установленном на температуру 37 °С, в течение 72 ч.

9.6.7 Инкубируют чашки, которые будут использованы для подсчета *S. thermophillus*, в инкубаторе (6.1), установленном на температуру 37 °С, в течение 48 ч.

9.7 Подсчет колоний

9.7.1 После определенного периода инкубации (9.6.6 и 9.6.7) подсчитывают количество колоний со свойствами, характерными для каждого микроорганизма [*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (3.2) и *Streptococcus thermophillus* (3.3)] в чашках с 15—300 колониями (см. приложение А).

Примечание — В случае проблем с подсчетом *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* при использовании среды MRS можно использовать среду LBA, разработанную в NIZO[1)]; см. также приложение А.

9.7.2 Чашки исследуют при приглушенном свете. Для упрощения подсчета можно использовать соответствующее оборудование для подсчета колоний (6.5). Соблюдают осторожность, чтобы не принять частицы нерастворенного образца или осажденного вещества за обнаруженные колонии. Внимательно исследуют сомнительные объекты, используя линзы (6.6) с бóльшим увеличением, с целью различения колоний и постороннего вещества.

9.8 Подтверждение

Для подсчета выбирают такое количество колоний, чтобы их число равнялось квадратному корню общего количества колоний. Окрашивают колонии по методу Грамма и подтверждают, что палочки не образуют спор, являются грамположительными и каталазонегативными (в случае исследования колоний, выросших на MRS), грамположительными и каталазонегативными цепочками кокков или диплококков (в случае исследования колоний, выросших на M17) (см. ISO 7218).

Подлинность сомнительных штаммов можно проверить согласно [10].

10 Расчет и выражение результатов

10.1 Расчет

10.1.1 Для подсчета используют чашки, на которых выросло от 15 до 300 колоний, описанных в 9.7.1 или 9.7.2.

10.1.2 Рассчитывают количество каждого характерного микроорганизма в исследуемом образце по следующей формуле:

[1)] NIZO Food Research, Kernhemseweg 2, Postbus 20 6710 BA, Ede, The Netherlands (Нидерланды). 1 нм = 10 Å. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этого продукта.

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1n_2)d},$$

где N — количество характерных микроорганизмов на грамм исследуемой пробы;

ΣC — общее количество колоний во всех чашках (10.1.1);

n_1 — количество чашек, подсчитанных в первом разведении,

n_2 — количество чашек, подсчитанных во втором разведении;

d — масса неразведенного исследуемого образца в чашке в первом разведении, г.

Пример — Коэффициент разведения 10^{-2} означает, что в чашку помещено 10^{-2} г или 10^{-2} мл неразведенного исследуемого образца (в разведенном состоянии).

Примечание — Первое разведение представляет собой разведение с бóльшим содержанием исследуемого образца.

В случае трех разведений рассчитывают количество каждого характерного микроорганизма в каждом исследуемом образце по следующей формуле:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)d},$$

где n_3 — количество чашек, подсчитанных в третьем разведении.

10.2 Выражение результатов

10.2.1 Округляют результаты, полученные по 10.1.2, до двух значащих цифр. Что касается трехзначного числа, третью цифру (если она не равна 5) округляют с точностью до нуля. Если третья цифра равняется 5, то число округляют в меньшую сторону, если вторая цифра четная, и в бóльшую сторону, если вторая цифра нечетная.

Пример — Округление ***234 до 230;***
235 до 240;
225 до 220;
245 до 240.

10.2.2 Если все результаты подсчета меньше 10, количество микроорганизмов на грамм отражают как «менее 10 · 1/*d*» (*d* — значение, соответствующее наименьшему разведению).

10.2.3 Если все результаты подсчета больше 300, рассчитывают теоретическое количество в чашках с количеством микроорганизмов около 300 колоний и умножают на величину, обратную величине, соответствующей наивысшему разведению. Результаты представляют как «теоретическое минимальное количество микроорганизмов на грамм».

10.2.4 Результат должен быть выражен как число от 1,0 до 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени.

10.2.5 Общее количество характерных микроорганизмов N на грамм образца равняется:

$$N = N_L + N_S,$$

где N_L — количество *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* на грамм, рассчитанное по 10.1.2;

N_S — количество *S. thermophillus* на грамм, рассчитанное по 10.1.2.

10.3 Примеры расчетов

10.3.1 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Предположим, что получены следующие результаты для *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (инкубировали две чашки Петри на разведение):

- разведение 10^{-5}: 295 и 245 колоний;
- разведение 10^{-6}: 33 и 40 колоний;

тогда

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{285 + 245 + 33 + 40}{(2 + 0{,}1 \cdot 2)10^{-5}} = \frac{613}{2{,}2 \cdot 10^{-5}} = 278{,}6 \cdot 10^5.$$

Согласно 10.2.1 количество равняется $280 \cdot 10^5$ на грамм. Теоретическое количество *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, выраженное согласно 10.2.4, составляет 2,8 10^7 на грамм.

10.3.2 *S. thermophillus*

Аналогичным образом теоретическое количество *S. thermophillus* на грамм йогурта составило $4{,}9 \cdot 10^8$.

Таким образом, количество характерных микроорганизмов составляет:

$$N = (2{,}8 \cdot 10^7) + (4{,}9 \cdot 10^8) = 5{,}18 \quad 10^8 \text{ на грамм,}$$

в результате округления согласно 10.2.4 получается:

$$N = 5{,}2 \cdot 10^8 \text{ на грамм пробы.}$$

11 Прецизионность

11.1 Общие положения

Учитывая пуассоновское распределение микроорганизмов в субстрате, доверительные интервалы этого метода варьируются в зависимости от количества колоний от ±16 % до ± 52 %. На практике могут наблюдаться даже бóльшие вариации. В различных совместных исследованиях согласно IDF 135 стандартное отклонение повторяемости (s_r) составило 0,20 логарифмической единицы, а стандартное отклонение воспроизводимости (s_R) — 0,35 логарифмической единицы по [2] и [3] .

В ISO 7218 приведена более подробная информация о доверительных интервалах расчета низких значений микроорганизмов.

Примечание — IDF 135 основан на ISO 5725.

11.2 Повторяемость

Как показывает опыт, если наибольшее значение двух независимых испытаний одной пробы превышает наименьшее значение на 30 %, необходимо пересмотреть методики с целью обнаружения источника погрешностей.

12 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие данные:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) метод отбора проб, если он известен;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все операции, не оговоренные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, а также детали любых инцидентов, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) результат(ы) испытания или, если проводилась проверка повторяемости, то окончательный полученный результат.

Приложение А
(справочное)

Примечания к методике

Ни одна из двух рекомендованных питательных сред (окисленная MRS и M17) не является полностью селективной.

Большинство штаммов *S. thermophillus* не образует видимых колоний в окисленной среде MRS в разведениях, которые обычно используются для подсчета *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Но, когда количество молочнокислых бактерий в образце йогурта существенно ниже количества стрептококков, для подсчета *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* следует использовать слабые разведения.

В этих условиях некоторые *S. thermophillus* могут образовывать незначительные или мелкие колонии в окисленной среде MRS. Эти колонии можно легко отличить невооруженным глазом от колоний *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (последние большего размера) и дополнительно проверить под микроскопом. В дополнение некоторые штаммы *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* проявляют слабый рост или не проявляют его вообще в MRS, и иногда их трудно отличить от *S. thermophillus*.

Если штаммы *S. thermophillus* растут медленно или не способны к росту, рекомендуется использование следующих условий:

- более высокая температура инкубации (39 °С — 42 °С и 45 °С в течение 24 ч в аэробных условиях);
- снижение содержания β-глицерофосфата;
- изменение pH;
- особая осторожность при перемешивании.

Если штаммы *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* растут медленно или не способны к росту, рекомендуется использование следующих условий:

- инкубация в течение более 3 дней, до 5 или 6 дней;
- более высокая температура инкубации (40 °С — 42 °С и 45 °С в течение 48 ч в анаэробных условиях);
- изменение pH;
- особая осторожность при перемешивании;
- газовая среда (насыщение CO_2, только CO_2 и т. д.).

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* при культивировании в анаэробных условиях в йогурте невозможно подсчитать в MRS. Этой проблемы не возникает при использовании среды LBA (см. примечание к 9.7.1) в анаэробных условиях при температуре 50 °С ± 0,5 °С в течение 72 ч.

С другой стороны, большинство штаммов *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не образует видимых колоний в среде M17 в разведениях, которые обычно используются для подсчета *S. thermophillus*. Это подтверждает ранее полученные результаты (см. [9]).

Однако некоторые штаммы *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* могут образовывать мелкие колонии в среде M17, особенно если речь идет об образцах йогурта с большим количеством молочнокислых бактерий, по сравнению с количеством стрептококков. Эти небольшие неравномерные колонии обычно имеют хлопьевидный или ворсистый внешний вид. Их легко можно отличить невооруженным глазом (или при помощи увеличительных стекол), дополнительно проверив под микроскопом, от равномерных чечевицеобразных колоний *S. thermophillus*, которые больше по размеру.

Выбор питательной среды, приготовление образца, методики инкубации и подсчета являются наиболее важными составляющими количественного анализа. После ознакомления технических специалистов с методами сразу же повышается точность.

Кроме того, нет ни одного исследуемого штамма, который можно было бы использовать для проверки селективности штаммов, так как штаммов, используемых в йогуртах, бесчисленное множество, которые отличаются от используемых при испытаниях, поэтому некоторые штаммы определенных видов (например, *S. thermophillus*) могут расти даже в средах, селективных к другим видам (например, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 6887-1	—	*
ISO 7218	IDT	ГОСТ ISO 7218—2015 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям»
ISO 8261/IDF 122	—	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичный стандарт.

Библиография

[1] ISO 707:2008 — Milk and milk products — Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[2] ISO 5725-1:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения]

[3] ISO 5725-2:1994 — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений]

[4] ISO 9232:2003/IDF 146:2003 — Yogurt — Identification of characteristic microorganisms *(Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*)
[Йогурт. Идентификация характерных микроорганизмов (лактобацил *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и стрептококк *Streptococcusm thermophilus*)]

[5] ISO/TS 11133-1:2009 — Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
(Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по подготовке и приготовлению культуральных сред. Часть 1. Общее руководство по обеспечению качества подготовки культуральных сред в лаборатории)

[6] IDF 135B:1991 — Milk and milk products — Precision characteristics of analytical methods — Outline of collaborative study procedure
(Молоко и молочные продукты. Точные характеристики методов расчета. Схема совместного исследования)

[7] De Man J. K., Rogosa M. and Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23, 1960, pp. 130–135
(Среда для культивации молочнокислых бактерий)

[8] Terzaghi B. E. and Sandine W. E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. J. Appl. Microbiol., 29, 1975, pp. 807–813
(Улучшение среды для молочнокислых стрептококков и их бактериофагов)

[9] Shankar P. A. and Davies F. L. Recent developments in yoghurt starters. II. A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing β-glycerophosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. J. Soc. Dairy Technol., 30(1), 1977, pp. 28–30 (Annex B)
(Последние разработки йогуртовых заквасочных культур. II. Примечание о подавлении *Lactobacillus bulgaricus* в среде с содержанием β-глицерофосфата и применение такой среды для селективного выделения *Streptococcus thermophillus* в йогурте)

УДК 637.146.34.075(083.74)(476):006.354 МКС 67.100.99; 07.100.30

Ключевые слова: йогурт, микроорганизмы, подсчет колоний, оборудование, реактивы, отбор проб, разведение, навеска

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 11.11.2019. Подписано в печать 27.11.2019. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31. к. 2.
gost.e-ecolog.ru stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru