ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесени Метод подсчета колоний при 25 °С

СТ РК ИСО 6611-2009

ISO 6611:2004 Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds – Colony-count technique at 25 °C (IDT)

Издание официальное

Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан (Госстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации», техническим комитетом по стандартизации № 44 «Технолог» (товарищество с ограниченной ответственностью «Эксперт - Консалтинг»)

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 17 августа 2009 года № 418-од

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 6111:2004 Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds – Colony-count technique at 25°C (Молоко и молочные продукты. Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесени. Метод подсчета колоний при 25°С), с дополнительными требованиями, которые по тексту выделены курсивом

4 В настоящем стандарте реализованы нормы Закона Республики Казахстан «О техническом регулировании»

5 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ **2014 год**
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **5 лет**

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Государственные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Государственные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесени Метод подсчета колоний при 25 °С

Дата введения 2010-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения и подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) жизнеспособных дрожжей и/или плесени в молоке и молочных продуктах посредством методов подсчета колоний при температуре 25 °С.

Настоящий стандарт распространяется на:

- молоко, жидкие молочные продукты;
- сухое молоко, сыворотку сухих сливок, сухую пахту, лактозу;
- сыр;
- кислотный казеин, молочный казеин, ренниновый казеин;
- казеинат, порошок кислотной сыворотки;
- масло;
- замороженные молочные продукты (включая съедобный лед),
- заварной крем, десерты, сброженное молоко и крем.

ПРИМЕЧАНИЕ Данный метод не подходит для большого числа термолабильных (не устойчивых к температурным воздействиям) дрожжей (в свежем сыре). В таких случаях рекомендуется метод поверхностно агарового покрытия.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

СТ РК 1.9-2007 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов иностранных государств, других нормативных документов по стандартизации в Республике Казахстан.

ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.

ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.

Издание официальное

ИСО 6887-1:1999 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.*

ИСО 7218:2007 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и руководство по микробиологическим исследованиям.*

ИСО 8261:2001 Молоко и молочные продукты. Общие правила приготовления проб для анализа, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований.*

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Указатель нормативных документов по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяется следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **Дрожжи и плесень:** Микроорганизмы6 которые при температуре 25 °С формируют колонии в элективной среде в условиях, установленных в настоящем стандарте.

4 Сущность метода

4.1 В чашки заливаются приготовленная для применения определенная селективная питательная среда и определенное количество испытательного образца, если исходный продукт жидкий, или исходной суспензии в случае других продуктов.

Применяя десятикратное разбавление испытательных образцов или исходной суспензии, готовятся чашки по 4.1.

4.2 Блюдца аэробно культивируются при температуре 25 °С в течение 5 дней.

4.3 Число колониеобразующих единиц (КОЕ) дрожжей и/или плесени на грамм или на $см^3$ продукта вычисляется из числа колоний, полученных на блюдце, выбранных при степени разжижения, для того чтобы получить соответствующий результат.

* Применяется в соответствии с СТ РК 1.9.

5 Разбавители и питательная среда

Общие положения согласно ИСО 7218.

5.1 Основные материалы по ИСО 8261.

5.1.1 Разбавители для общего пользования и разбавителей для специального предназначения по ИСО 8261.

5.1.2 Распределение, стерилизация и хранение разбавителя по ИСО 8261.

5.2 Среда экстракта дрожжей/декстрозы/окситетрациклина/агара

5.2.1 Основная среда

5.2.1.1 Компоненты:

а) порошок экстракта дрожжей -.5,0 г;

б) декстроза ($C_6H_{12}O_6$) - 20,0 г;

в) агар - от 10 г до 15 г*;

г) вода - 900 см³.

5.2.1.2 Приготовление

В воде растворяются компоненты или полная сухая среда, допускается применение теплой воды.

После стерилизации pH равняется 6,6 при температуре 25 °С. Компоненты стерилизуются в автоклаве (см. 6.2) при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

5.2.2 Раствор окситетрациклина гидрохлорида

5.2.2.1 Компоненты

а) окситетрациклин гидрохлорид ($C_{22}H_{30}O_{11}HCl$) - 50 мг;

б) вода - 50 см³.

5.2.2.2 Приготовление

Окситетрациклин гидрохлорид растворяется в воде, стерилизуется раствор методом фильтрации. Раствор должен быть свежеприготовленным до применения.

5.2.3 Полная среда

5.2.3.1 Компоненты

а) раствор окситетрациклина гидрохлорида - 10 см³;

б) основная среда - 90 см³.

5.2.3.2 Приготовление

Стерилизованную основную среду по 5.2.1 охлаждают до 45 °С. К 90 см³ основной среды добавляют 10 см³ раствора окситетракциклина гидрохлорида по 5.2.2, разогретого до 45 °С.

5.3 2 Среда экстракта дрожжей/декстрозы/окситетрациклина/агара

а) порошок экстракта дрожжей - 5,0 г;

б) декстроза ($C_6H_{12}O_6$) -.20,0 г;

*В зависимости от прочности геля из агара.

в) хлорамфеникол ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) - 0,1 г*;

г) агар - от 10 г до 15 г;

д) вода - 1000 см³.

5.3.2 Приготовление

Компоненты растворяют в воде. Допускается растворение в теплой воде. После стерилизации компонентов pH должен быть 6,6 при температуре 25 °С. Агаровую среду разделяют и помещают в соответствующие контейнеры по 6.9. Стерилизуют в автоклаве по 6.2 при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 минут.

6 Аппаратура и стеклянная посуда

ПРИМЕЧАНИЕ Аппаратура, используемая в данном методе, стерилизуется согласно ИСО 8261.

6.1 Одноразовые приборы являются приемлемой альтернативой стеклянных изделий многоразового пользования, если имеются соответствующие инструкции. Применяют микробиологическое лабораторное оборудование, приборы по ИСО 8261.

6.2 Аппаратура для сухой стерилизации (печь) или стерилизации паром (автоклав) по ИСО 7218.

6.3 Инкубатор, функционирующий при температуре (25 ± 1) °С.

6.4 Чашки Петри, диаметром от 90 до 100 мм.

6.5 Градуированные пипетки, затрамбованные ватой вместимостью (1 ± 0,02) см³, или (10 ± 0,2) см³ или (11 ± 0,02) см³.

6.6 Водяная баня, поддерживающая температуру (45 ± 1) °С.

6.7 Оборудование подсчета колоний, состоящее из освещенного основания с темным фоном, оборудованное увеличивающими линзами, применяемые для увеличения в 1,5 раза, и механического или электронного цифрового счетчика.

6.8 pH-метр термокомпенсированный, с точностью измерения до ± 0,1 pH единиц при температуре 25 °С.

6.9 Сосуды для питательной среды или колбы. Допускается применение сосудов или колб с нетоксичными металлическими винтовыми крышками.

6.10 Часы с точностью ± 1 мин.

7 Отбор образцов

Проба должна быть представительной, а также без повреждений и изменений качества продукта при транспортировании и хранении.

* Для того чтобы получить конечную концентрацию 100 мкг/см^3 среды.

Отбор образцов - по ГОСТ 26809.

В сырах с дрожжами или плесенью, допускается удалять слой с образца для анализа. Слой сыра с дрожжами или плесенью удаляется при помощи стерильного скальпеля или ножа до момента начала отбора образцов.

8 Порядок проведения

8.1 Общие положения

Для повышения точности метода, приготовление разбавителей должно быть стандартизировано. Факторы, воздействующие на точность:

- тип смешивающего оборудования;
- время смешивания;
- разбавитель;
- допустимое время для посева большей части колоний;
- допустимое время смешивания при подготовке десятикратного разбавления.

ПРИМЕЧАНИЕ Принимаются обычные асептические меры предосторожности. Действия согласно 8.2 и 8.3 не должны выполняться при попадании солнечных лучей.

8.2 Приготовление испытательных образцов и первичное разбавление согласно ИСО 8261.

8.3 Дополнительное десятикратное разбавление согласно ИСО 8261.

8.4 Продолжительность процедуры согласно ИСО 6887-1.

8.5 Инокуляция и инкубация

8.5.1 В две стерильные чашки Петри по 6.4 при помощи стерильной пипетки по 6.5 добавляют 1 см³ испытательного образца, если образец жидкий, или 1 см³ исходной суспензии в случае других продуктов.

8.5.2 В две дополнительные стерильные чашки Петри добавляют при помощи стерильной пипетки $1 \cdot 10^{-1}$ см³ разбавленного раствора (жидкий продукт) или $1 \cdot 10^{-2}$ см³ разбавленного раствора (другие продукты).

8.5.3 При необходимости, повторяют данную операцию, применяя дополнительные десятикратные разбавления.

8.5.4 В каждую чашку Петри добавляют 15 см³ среды, содержащей окситетрациклин гидрохлорид по 5.2 или содержащей хлорамфеникол по 5.3, предварительно нагретой при температуре 45 °С в водяной бане по 6.6.

8.5.5 Вращая чашки Петри, перемешивают инокулят со средой и ставят чашки Петри на холодную горизонтальную поверхность для того, чтобы смесь затвердела.

8.5.6 Время между приготовлением первого разбавленного раствора и смешиванием инокулята со средой не должно превышать 15 минут.

8.5.7 Подготовить соответствующее число контрольных чашек для проверки стерильности.

8.5.8 Подготовленные чашки по 8.5.5 переворачивают, помещают (в вертикальном положении) в инкубатор по 6.3 и оставляют на 5 дней при температуре 25 °С.

Для предотвращения распространения, должны быть предприняты следующие меры предосторожности:

- после затвердения смеси по 8.5.5 добавляют сверхслойную питательную среду или
- добавляют на фильтровальную бумагу установленную на крышке чашки каплю глицерола.

8.5.9 Чашки складывают стопками высотой не более шести чашек. Стопки чашек разделяют друг от друга, от стенок и верхней части инкубатора.

8.6 Интерпретация

8.6.1 Подсчитывают колонии в каждой чашке. Избегают, включая случайную бактериальную колонию, которая может произрастать. Допускается при необходимости проводить различия между колониями дрожжей и колониями плесени на основе морфологических характеристик согласно 8.7.

8.6.2 Сохраняются чашки, содержащие от 10 до 150 колоний. Если часть чашек разрослись плесенью, или если подсчитывание затруднено изолированностью колонии, тогда подсчитывание колоний ведется на чашках при следующем высоком разбавлении, даже если их число может быть меньше 10. В этом случае подсчитывание ведется по 9.2.

8.7 Подтверждение

Идентификация точных и сомнительных колоний должна исследоваться проверкой под микроскопом.

При необходимости подтверждается, по крайней мере, $\sqrt{n}$ колоний под микроскопом, где n - число подсчитанных колоний.

9 Обработка результатов

9.1 Сохраняются чашки, содержащие от 10 до 150 колоний.

Рассчитывается число КОЕ дрожжей и/или плесени, N, на грамм или на кубический сантиметр продукта по Формуле 1:

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

где $\sum C$ - сумма подсчитанных колоний на сохраненных чашках;

n_1 - число сохраненных чашек в первом разбавлении с результатом между 10 и 150 колониями;

n_2 - число сохраненных чашек во втором разбавлении с результатом между 10 и 150 колониями;

d - коэффициент разбавления, соответствующий первому разбавлению.

Если есть более чем два исчисляемых разбавления с результатом между 10 и 150 колониями, то формула должна быть изменена с принятием во внимание дополнительного разбавления. Для трех разбавлений применяется Формула 2:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)d}, \qquad (2)$$

где n_3 является числом сохраненных чашек в третьем разбавлении с результатом между 10 и 150 колониями.

Округлите полученные результаты до двух значимых цифр. Для этого, если последняя цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если последняя цифра 5 или больше, предшествующую цифру увеличивают на одну единицу. Рассчитывайте ступенчато, пока не будут получены две значимые цифры.

Для примера, 28500 округляется до 29000, и 11500 округляется до 12000.

Принимается за результат число КОЕ дрожжей и/или на миллилитр или на грамм, выраженное как число между 1,0 и 9,9, умноженное на 10^x, где x соответствующая степень.

ПРИМЕР Подсчет КОЕ дрожжей и /или плесеней дал следующие результаты (инкубированы две чашки Петри на разбавление):

- при первом разбавлении, удержанные (10^{-2}), 83 и 97 колоний;
- при втором разбавлении, удержанные (10^{-3}), 33 и 28 колоний;

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0{,}1 \times 2)]10^{-2}} = 241/0{,}022 = 10\,954$$

Округление результатов как установлено в 9.1, дает 11 000 или $1{,}1 \times 10^{-4}$ КОЕ дрожжей и /или плесени на грамм или на миллилитр продукта.

9.2 Если две чашки, соответствующие испытательным образцам (жидкие продукты) или исходной суспензии (другие продукты), включают, по крайней мере, 10 колоний, результат выражают как:

- по крайней мере, 10 КОЕ дрожжей и /или плесеней на грамм или на миллилитр продукта (жидкие продукты);
- по крайней мере, $10 \times 1/d$ КОЕ дрожжей и /или плесени на грамм (другие продукты), где d - фактор разбавления исходной суспензии.

9.3 Если есть чашки, содержащие более чем 150 колоний, то вычислите предполагаемый подсчет из чашек, имеющих подсчет, ближайший к 150 колониям, и умножьте данное число на обратное значение, соответствующее наивысшему разбавлению. Протоколировать результаты как «предполагае-

мое число колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесени на грамм или на кубический сантиметр продукта».

10 Повторяемость

Абсолютная разница между двумя независимыми единичными результатами испытаний, полученными при помощи одинакового метода на идентичном испытательном материале в одной лаборатории одним лаборантом при использовании одного оборудования за короткий промежуток времени, будет не более чем в 5 % случаев более чем 30 % с низким результатом.

Если требования по повторяемости не соответствуют, то должно проводиться исследование по выявлению возможных источников ошибок.

ПРИМЕЧАНИЕ Определение повторяемости по ГОСТ ИСО 5725-1.

11 Оформление результатов испытания

Протокол испытания должен содержать используемый метод и полученные результаты.

Он должен также содержать все рабочие моменты, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с подробными данными о каких-либо инцидентах, которые могли повлиять на результаты испытаний.

Отчет об испытаниях должен включать всю информацию, необходимую для полной идентификации образца.

УДК 637.1/.3:637.146.1:579.262.637.074:543:006.354(574) **МКС 67.100.01**

Ключевые слова: молоко и молочные продукты, подсчет колоний, дрожжи и плесень, агар, основная среда, стерилизация, раствор, инкубация, точность

Для заметок

Басуға _____ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 240074

gost.e-ecolog.ru