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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34472— 2018

МОЛОКО СЫРОЕ

Турбидофлуориметрический экспресс-метод определения бактериальной обсемененности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом маслоделия и сыроделия — филиалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ВНИИМС — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 сентября 2018 г. № 112-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 октября 2018 г. № 745-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34472—2018 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2020 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2018

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 2
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и материалы 2
5 Отбор проб 3
6 Условия проведения измерений 3
7 Определение бактериальной обсемененности сырого молока 3
8 Обработка результатов 4
9 Требования безопасности 5
Приложение А (справочное) Рекомендуемые средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы 6
Приложение Б (справочное) Валидация турбидофлуориметрического приборного экспресс-метода определения бактериальной обсемененности сырого молока с арбитражным методом определения КМАФАнМ по ГОСТ 32901 7
Библиография 8

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО СЫРОЕ

Турбидофлуориметрический экспресс-метод определения бактериальной обсемененности

Milk. Turbidofluorimetric rapid method for estimating total bacterial load

Дата введения — 2020—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на приборный турбидофлуориметрический экспресс-метод определения бактериальной обсемененности сырого молока по интенсивности флуоресценции веществ, образующихся из флуорогенного субстрата, в процессе жизнедеятельности микроорганизмов.

Диапазон измерения бактериальной обсемененности сырого молока — от $2 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ КОЕ/см^3.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте применены нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004—2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 32901—2014 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа

ГОСТ ИСО 5725-6—2002** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Издание официальное

по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт 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 применены термины в соответствии с [1], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бактериальная обсемененность:** Количество аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов, способных проявлять свою жизнедеятельность в сыром молоке при температуре 30 °С.

Примечание — Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) — это количество микроорганизмов, вырастающих и образующих видимые колонии на твердом питательном агаре при температуре (30 ± 1) °С.

В сыром молоке подавляющее количество микрофлоры представлено мезофильными аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами. При посеве сырого молока на определение КМАФАнМ не учитываются анаэробные бактерии, количество которых ничтожно по сравнению с общим количеством выявляемых микроорганизмов. Поэтому разницей между показателями бактериальной обсемененности и КМАФАнМ в сыром молоке следует пренебречь.

3.2 **турбидофлуориметрия:** Оптическая технология, используемая для измерения низких значений флуоресценции в мутных растворах биологических жидкостей, в том числе молоке.

Примечание — Математическая и статистическая обработка динамических значений концентрации флуоресцентного продукта на основе кинетики и стехиометрии микробного роста позволяют точно рассчитать биомассу микроорганизмов.

3.3 **турбидофлуориметр:** Оптический сенсор, предназначенный для фиксации динамических измерений интенсивности светорассеяния и флуоресценции при заданной температуре в мутных растворах биологических жидкостей, в том числе молоке.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и материалы

Турбидофлуориметр* с диапазоном рабочих длин волн от 400 до 650 нм, диапазоном измерений формазиновой суспензии от 100 до 1000 ЕМФ, рабочим диапазоном температуры режима термостатирования от 30 °С до 43 °С и соответствующим программным обеспечением*.

Тест-наборы* для определения бактериальной обсемененности в сыром молоке диапазоном измерения от $2 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ КОЕ/см^3.

Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 0,02 до 2 см^3.

Термометр стеклянный жидкостный (не ртутный) по ГОСТ 28498 диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1 °С.

Подогреватель оптический облучающий, обеспечивающий поддержание температурного режима в диапазоне от 25 °С до 40 °С.

Часы по ГОСТ 27752, секундомер или таймер.

Встряхиватель вибрационного типа со скоростью вращения до 3000 об/мин.

Контрольный образец для контроля тест-наборов*.

Пробирки пластиковые среднестенные с плоской крышкой стерильные (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см^3.

Пипетки градуированные 1(2)—1(2)—1—2 по ГОСТ 29227.

Допускается применение другого оборудования, не уступающего вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающего необходимую точность измерения, а также материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

---

* Рекомендуемые средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы приведены в приложении А.

5 Отбор проб

5.1 Основные понятия и общие правила отбора проб — по ГОСТ 26809.1.

5.2 Отбор проб сырого молока при проведении микробиологических анализов проводят перед отбором проб для физико-химических и органолептических анализов в соответствии с ГОСТ 32901.

При контроле бактериальной обсемененности турбидофлуориметрическим методом из объединенной пробы сырого молока, предназначенной для проведения микробиологических анализов объемом не менее 500 $см^3$, отбирают пробу для анализа объемом от 50 до 100 $см^3$ в соответствии с ГОСТ 32901 (раздел 5).

Перед отбором проб сырое молоко должно быть тщательно перемешано.

5.3 Пробы сырого молока не подлежат консервированию и хранению. Их анализируют непосредственно после отбора для получения более объективных результатов измерений.

6 Условия проведения измерений

При выполнении измерений следует соблюдать следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... от 15 °С до 28 °С;
- относительная влажность воздуха ..... от 20 % до 80 %;
- атмосферное давление ..... от 84 до 106 кПа.

7 Определение бактериальной обсемененности сырого молока

7.1 Сущность метода

Метод основан на измерении скорости образования флуоресцентных веществ из флуорогенных субстратов в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Скорость изменения флуоресценции прямо пропорциональна биомассе жизнеспособных микроорганизмов в сыром молоке. Исходя из средней массы бактериальной клетки, равной 1 пг, программное обеспечение прибора трансформирует значение биомассы в наиболее вероятное число клеток микроорганизмов (НВЧ/$см^3$): биомасса (пг) <=> НВЧ/$см^3$ <=> КОЕ/$см^3$.

7.2 Подготовка к проведению измерений

7.2.1 Подготовка к работе турбидофлуориметра

Турбидофлуориметр располагают вдали от источников тепла и сильного электромагнитного излучения, избегая попадания на него прямых солнечных лучей.

Подготовку турбидофлуориметра и его эксплуатацию следует проводить в соответствии с рекомендациями инструкции или паспорта на прибор.

Перед выполнением измерений проводят холостую пробу для регистрации фоновых значений в соответствии с инструкцией к прибору.

7.2.2 Подготовка тест-наборов

7.2.2.1 При хранении тест-наборов при температуре от 4 °С до 10 °С до начала выполнения измерений тест-набор с пробирками необходимо выдержать в помещении при комнатной температуре для их отепления.

Перед выполнением измерений реагенты в тест-пробирке активируют путем встряхивания.

7.2.2.2 Проверку тест-набора следует проводить ежемесячно, либо при появлении сомнительных результатов.

Контроль качества тест-пробирок, входящих в тест-набор, и правильности выполнения процедуры измерения осуществляют согласно инструкции по эксплуатации, используя контрольный образец сухих реагентов, поставляемых вместе с прибором.

7.3 Проведение измерений

7.3.1 Перед началом измерения пробу для анализа исследуемого сырого молока, предварительно нагретого до комнатной температуры, тщательно перемешивают до получения максимально однородного распределения клеток микроорганизмов в объеме пробы. Точность дальнейшего измерения во многом определяется однородностью распределения клеток микроорганизмов в пробе молока.

7.3.2 С помощью дозатора или стерильной мерной пипеткой отбирают 1,3 $см^3$ сырого молока, которое помещают в микропробирку и перемешивают на встряхивателе вибрационного типа в течение 15 с.

Подогрев сырого молока в микропробирке до температуры (30 ± 2) °С (или температуры, указанной в документах изготовителя тест-наборов по определению общего количества микроорганизмов) проводят в течение 10 мин в оптическом облучающем подогревателе.

7.3.3 Подогретую пробу сырого молока из микропробирки переливают в предварительно активированную тест-пробирку и плотно закрывают крышкой. Объем сырого молока в активированной тест-пробирке должен быть не менее 1,2 $см^3$.

7.3.4 Перед началом измерения визуально оценивают цвет сырого молока в тест-пробирке. Появление розовой окраски различной интенсивности свидетельствует о высокой бактериальной обсемененности, превышающей диапазон измерения. Такое сырое молоко не подлежит дальнейшему контролю.

7.3.5 Содержимое тест-пробирки с пробой сырого молока перед началом измерений перемешивают на встряхивателе вибрационного типа в течение 10—15 с. Тест-пробирку с перемешанной пробой сырого молока помещают в турбидофлуориметр и плотно закрывают крышку прибора.

В зависимости от степени обсемененности молока время измерения составляет от 8 до 20 мин. После завершения измерения результат появится на мониторе в протоколе испытаний.

7.3.6 Проводят два параллельных измерения.

При этом важно соблюдать последовательность выполнения измерений согласно 7.3.1—7.3.5.

8 Обработка результатов

8.1 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости (1).

В случае если бактериальная обсемененность составляет менее $2 \cdot 10^4$ КОЕ/$см^3$ (т. е. результат находится за пределами нижней границы диапазона измерений), то результат записывают «менее $2 \cdot 10^4$ КОЕ/$см^3$».

В случае если бактериальная обсемененность молока превышает верхнюю границу диапазона измерений, то результат записывают «более $5 \cdot 10^6$ КОЕ/$см^3$».

Данные валидации турбидофлуориметрического приборного экспресс-метода определения бактериальной обсемененности сырого молока с арбитражным методом определения КМАФАнМ по ГОСТ 32901 приведены в приложении Б.

8.2 Контроль точности измерений

Характеристики погрешности и прецизионности при доверительной вероятности $P = 0,95$ приведены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Количество клеток, КОЕ/$см^3$	Предел повторяемости r, КОЕ/$см^3$	Предел воспроизводимости R, КОЕ/$см^3$
Бактериальная обсемененность сырого молока	$2 \cdot 10^4$ $1 \cdot 10^5$ $5 \cdot 10^5$ $5 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^3$ $2,5 \cdot 10^4$ $1,0 \cdot 10^5$ $1,0 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^4$ $7,0 \cdot 10^4$ $2,8 \cdot 10^5$ $2,8 \cdot 10^6$

8.3 Проверка приемлемости результатов измерений

8.3.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений бактериальной обсемененности, полученных в условиях повторяемости ($n = 2$), проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии

$$|БО_1 - БО_2| \le r, \quad (1)$$

где $БО_1$ и $БО_2$ — значения двух параллельных измерений, полученные в условиях повторяемости, КОЕ/см^3;

r — предел повторяемости, значение которого приведено в таблице 1, КОЕ/см^3.

Если условие (1) не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.2).

При повторном превышении указанного значения выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа.

8.3.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений бактериальной обсемененности, полученные в условиях воспроизводимости (m = 2), проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (подраздел 5.3).

Результаты измерений, выполненные в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми, если выполняется условие

$$|БО_3 - БО_4| \le R, \quad (2)$$

где $БО_3$ и $БО_4$ — значения двух параллельных определений бактериальной обсемененности, полученные в условиях воспроизводимости, КОЕ/см^3;

R — предел воспроизводимости, значение которого приведено в таблице 1, КОЕ/см^3.

9 Требования безопасности

9.1 При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Организация обучения работающих безопасности труда — по ГОСТ 12.0.004.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

9.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускаются лица с образованием не ниже среднего, имеющие опыт работы в химической или микробиологической лаборатории, освоившие методику выполнения измерений и изучившие инструкцию по эксплуатации турбидофлуориметра.

Приложение А
(справочное)

Рекомендуемые средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы

А.1 Рекомендуемые средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы для воспроизводства методики измерений

Турбидофлуориметр БиоТФ.

Тест-набор «СТАРТ» для определения общего количества микроорганизмов в сыром молоке диапазоном измерения от $2 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ КОЕ/см^3.

Программное обеспечение БиоТФ с приложением «СТАРТ».

Контрольный образец для проверки тест-набора «СТАРТ».

Приложение Б
(справочное)

Валидация турбидофлуориметрического приборного экспресс-метода определения бактериальной обсемененности сырого молока с арбитражным методом определения КМАФАнМ по ГОСТ 32901

Графическая зависимость для общего массива данных, полученных при определении бактериальной обсемененности молока арбитражным методом на среде КМАФАнМ и с использованием турбидофлуориметра, представлена на рисунке Б.1.

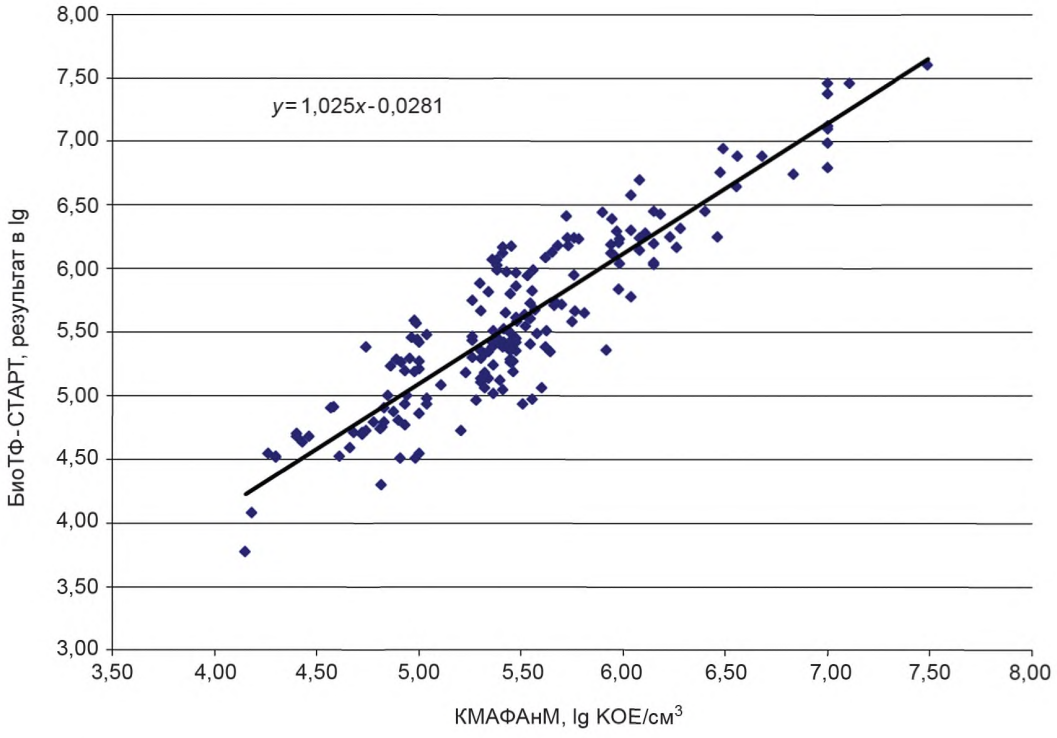


Рисунок Б.1 — Зависимость между результатами содержания КМАФАнМ и результатами, полученными с использованием турбидофлуориметра БиоТФ (n = 137)

Представленные на рисунке Б.1 данные свидетельствуют о линейной зависимости между показателями бактериальной обсемененности, полученными турбидофлуориметрическим экспресс-методом, и результатами определения КМАФАнМ, полученными арбитражным методом по ГОСТ 32901, в диапазоне от 10^4 до 10^7 КОЕ/см^3.

Уравнение линейной зависимости

$$y = 1{,}025x - 0{,}0281. \qquad (Б.1)$$

Коэффициент линейного уравнения (основной критерий сходимости методов) равен 1,025. Свободный член линейного уравнения (0,0281) несет информацию о сдвиге методов.

Так как коэффициент линейного уравнения близок к единице, а свободный член — к нулю, можно говорить о высокой сходимости методов определения бактериальной обсемененности приборным экспресс-методом с использованием турбидофлуориметра и показателя КМАФАнМ, определяемого арбитражным чашечным методом в соответствии с ГОСТ 32901.

Библиография

[1] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 033/2013 — О безопасности молока и молочной продукции

УДК 637.127:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: сырое молоко, методы анализа, бактериальная обсемененность, турбидофлуориметр, тест-набор, контрольный образец, измерения

БЗ 10—2018/43

Редактор *В.Н. Шмельков*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 12.10.2018. Подписано в печать 23.10.2018. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,26.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru