ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ISO 6611-2013

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесневых грибов.
Методика определения количества колоний при температуре 25 °С

МАЛАКО І МАЛОЧНЫЯ ПРАДУКТЫ

Падлік калоніеўтваральных адзінак дрожджаў і/ці цвілых грыбоў.
Методыка вызначэння колькасці калоній пры тэмпературы 25 °С

(ISO 6611:2004, IDT)
(IDF 94:2004, IDT)

Издание официальное

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2-2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

2 ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 43-2013 от 7 июня 2013 г.)

За принятие стандарта 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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 6611 | IDF 94:2004 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 плесневых грибов. Методика определения количества колоний при температуре 25 °С).

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).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА Республики Беларусь.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 23 июля 2013 г. № 38 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 марта 2014 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Госстандарт, 2013

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Содержание

1 Область применения ... 1
2 Нормативные ссылки ... 1
3 Термины и определения ... 1
4 Сущность метода ... 2
5 Разбавители и культуральная среда ... 2
5.1 Основные материалы ... 2
5.2 Питательная среда из дрожжевого экстракта/декстрозы/окситетракциклина/агара ... 2
5.3 Питательная среда из дрожжевого экстракта/декстрозы/хлорамфеникола/агара ... 3
6 Аппаратура и стеклянная посуда ... 3
7 Отбор проб ... 3
8 Проведение испытания ... 4
8.1 Общие положения ... 4
8.2 Подготовка анализируемой пробы и приготовление первичного разведения ... 4
8.3 Последующие десятикратные разведения ... 4
8.4 Продолжительность проведения испытания ... 4
8.5 Внесение посевного материала и культивирование ... 4
8.6 Обработка результатов ... 4
8.7 Подтверждение ... 5
9 Представление результатов ... 5
10 Повторяемость ... 6
11 Протокол испытания ... 6
Библиография ... 7

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ
Подсчет колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесневых грибов. Методика определения количества колоний при температуре 25 °С

МАЛАКО І МАЛОЧНЫЯ ПРАДУКТЫ
Падлік калоніеўтваральных адзінак дрожджаў і/ці цвілых грыбоў. Методыка вызначэння колькасці калоній пры тэмпературы 25 °С

Milk and milk products
Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds
Colony-count technique at 25 °C

Дата введения 2014-03-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения и подсчета колониеобразующих единиц жизнеспособных дрожжей и/или плесневых грибов в молоке и молочных продуктах с помощью методики подсчета колоний при температуре 25 °С.

Данный метод применим к:

– молоку, жидким молочным продуктам;

– сухому молоку, сухой сладкой сыворотке, сухой пахте, лактозе;

– сыру;

– кислотному казеину, молочнокислотному казеину, сычужному казеину;

– казеинату, кислой сухой сыворотке;

– маслу;

– замороженным молочным продуктам (включая пищевой лед);

– пудингу, десертам, кисломолочным продуктам (сметане, кисломолочным напиткам, в том числе обогащенным).

Примечание – Данный метод не применяется при наличии в продукте большого количества термолабильных дрожжей (в свежих сырах). В этом случае предпочтительнее применять метод посева на поверхность агара в чашках Петри.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

ISO 6887-1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятичных разведений

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

ISO 8261:2001 | IDF 122:2001 * Молоко и молочные продукты. Общее руководство по подготовке испытательных образцов, исходных суспензий и децимолярных растворов для микробиологического исследования

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **дрожжи и плесневые грибы** (yeasts and moulds): Микроорганизмы, которые при 25 °С образуют колонии в селективной питательной среде при условиях культивирования, установленных в настоящем стандарте.

* Действует только для применения настоящего стандарта.

Издание официальное

4 Сущность метода

4.1 Заливают чашки определенной селективной культуральной средой, которые уже содержат определенное количество анализируемой пробы, если исследуемый продукт является жидким, или определенное количество исходной суспензии, если проводится исследование продуктов другой консистенции.

Подготавливают другие чашки при тех же условиях, используя десятикратные разведения анализируемой пробы или исходной суспензии.

4.2 Чашки термостатируют в аэробных условиях при температуре 25 °С в течение 5 дн.

4.3 Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) дрожжей и плесневых грибов в грамме или миллилитре продукта подсчитывают исходя из количества колоний, выросших на чашках того десятикратного разведения, которое позволит получить достоверный результат.

5 Разбавители и культуральная среда

Основные руководящие указания приведены в ISO 7218.

5.1 Основные материалы

См. ISO 8261 | IDF 122.

5.1.1 Разбавители

Требования к разбавителям общего назначения и разбавителям специального назначения установлены в ISO 8261 | IDF 122.

5.1.2 Распределение, стерилизация и хранение разбавителей

См. ISO 8261 | IDF 122.

5.2 Питательная среда из дрожжевого экстракта/декстрозы/окситетрациклина/агара

5.2.1 Основная питательная среда

5.2.1.1 Состав

Дрожжевой экстракт в порошке	5,0 г
Декстроза ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 г
Агар	10 – 15 г [a]
Вода	900 мл
[a] В зависимости от плотности агара.	

5.2.1.2 Приготовление

Разбавляют ингредиенты или дегидратированную полноценную питательную среду водой, при необходимости – нагревают.

При необходимости регулируют pH таким образом, чтобы после стерилизации значение составляло 6,6 при температуре 25 °С.

Стерилизуют в автоклаве (6.1) при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

5.2.2 Раствор окситетрациклина гидрохлорида

5.2.2.1 Состав

Окситетрациклина гидрохлорид ($C_{22}H_{30}O_{11}\cdot HCl$)	50 мг
Вода	50 мл

5.2.2.2 Приготовление

Разбавляют гидрохлорид окситетрациклина водой. Используют только свежеприготовленный раствор. Стерилизуют раствор посредством фильтрации.

5.2.3 Полноценная питательная среда

5.2.3.1 Состав

Раствор окситетрациклина гидрохлорида	10 мг
Основная питательная среда	90 мл

5.2.3.2 Приготовление

Охлаждают простерилизованную основную питательную среду (5.2.1) до температуры 45 °С. Непосредственно перед использованием доводят раствор окситетрациклина гидрохлорида до температуры 45 °С и в стерильных условиях добавляют его в количестве 10 мл к объему основной питательной среды, равному 90 мл.

5.3 Питательная среда из дрожжевого экстракта/декстрозы/хлорамфеникола/агара

5.3.1 Состав

Дрожжевой экстракт в порошке	5,0 г
Декстроза ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 г
Хлорамфеникол	0,1 г [a]
Агар	12 – 15 г [b]
Вода	1000 мл

[a] Для получения конечной концентрации 100 мкг/мл среды.
[b] В зависимости от плотности агара.

5.3.2 Приготовление

Компоненты разбавляют водой, при необходимости – нагревают.

Регулируют pH таким образом, чтобы после стерилизации значение составляло 6,6 при температуре 25 °С.

Агаризованную питательную среду разливают в подходящую посуду (6.8).

Стерилизуют в автоклаве (6.1) при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

6 Аппаратура и стеклянная посуда

ВНИМАНИЕ! Аппаратуру, с которой контактировали анализируемая проба, разбавители, растворы или культуральная среда, стерилизуют в соответствии с требованиями ISO 8261:2001 | IDF 122:2001 (подраздел 6.1).

Предпочтительно применять аппаратуру одноразового использования, если она имеет соответствующие технические характеристики, чем стеклянную посуду многоразового использования.

Для проведения исследований используют указанное ниже обычное микробиологическое лабораторное оборудование, аппаратуру, необходимые для подготовки анализируемой пробы и приготовления разведений, требования к которым установлены в ISO 8261 | IDF 122:2001.

6.1 **Оборудование для суховоздушной стерилизации (сухожаровой шкаф) или паровой стерилизации (автоклав).**

См. ISO 7218.

6.2 **Термостат**, способный поддерживать температуру (25 ± 1) °С.

6.3 **Чашки Петри** диаметром 90 – 1000 мм.

6.4 **Градуированные пипетки** с ватной закупоркой, калиброванные с точностью до (1 ± 0,02), или (10 ± 0,2), или (11 ± 0,2) мл.

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

6.6 **Оборудование для подсчета колоний**, состоящее из освещенного основания с темным фоном, оснащенное увеличительным стеклом, используемым для увеличения в 1,5 раза, и механическим или электронным цифровым счетчиком.

6.7 **Прибор для измерения pH** с компенсацией температурных воздействий и точностью ±0,1 единицы pH при температуре 25 °С.

6.8 **Сосуды** или **колбы для культур.**

Можно использовать сосуды или колбы с нетоксичными металлическими навинчивающимися колпачками.

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 ISO 707.

Если созревшие сыры покрыты слоем дрожжей или плесневых грибов, то его желательно удалить с исследуемого материала. В этом случае слой можно убрать с помощью стерильного скальпеля или ножа до начала отбора проб.

8 Проведение испытания

8.1 Общие положения

Для обеспечения точности результатов при использовании данного метода приготовление разведений должно быть строго стандартизовано. На точность влияют следующие факторы:

– тип смесительного оборудования;

– время смешивания;

– разбавитель;

– время, необходимое для оседания крупных частиц;

– продолжительность перемешивания, учитываемая при приготовлении десятикратных разведений.

ВНИМАНИЕ! Необходимо строго соблюдать меры предосторожности для обеспечения стерильности. Действия, описанные в 8.2 и 8.3, не выполняют при солнечном свете.

8.2 Подготовка анализируемой пробы и приготовление первичного разведения

См. ISO 8261 | IDF 122.

8.3 Последующие десятикратные разведения

См. ISO 8261 | IDF 122.

8.4 Продолжительность проведения испытания

См. ISO 6887-1.

8.5 Внесение посевного материала и культивирование

8.5.1 Берут две стерильные чашки Петри (6.3). С помощью стерильной пипетки (6.4) переносят в каждую чашку 1 мл анализируемой пробы, если она в жидком виде, или 1 мл исходной суспензии, если исследуются продукты иной консистенции.

8.5.2 Берут еще две чашки Петри. В каждую из них переносят с помощью другой стерильной пипетки 1 мл разведения 10^{-1} (для жидкого продукта) или 1 мл разведения 10^{-2} (для продукта другой консистенции).

8.5.3 При необходимости эту операцию повторяют, используя дополнительные десятикратные разведения.

8.5.4 В каждую чашку Петри заливают примерно 15 мл среды, содержащей окситетрациклина гидрохлорида (5.2), или среды, содержащей хлорамфеникол (5.3), предварительно растворенный на водяной бане (6.5) при температуре 45 °С.

8.5.5 Вращая чашки Петри, тщательно перемешивают посевной материал со средой и оставляют чашки Петри на холодной горизонтальной поверхности, чтобы смесь затвердела.

8.5.6 Время от приготовления первого разведения до смешивания посевного материала со средой не должно превышать 15 мин.

8.5.7 Подготавливают достаточное количество контрольных чашек для проверки стерильности.

8.5.8 После переворачивания подготовленные чашки (8.5.5) помещают (в горизонтальном положении) в термостат (6.2), установленный на температуру 25 °С, и выдерживают в течение 5 дн.

Для предотвращения растекания необходимо предпринимать следующие меры предосторожности:

– добавлять верхний слой питательной среды после повторного затвердевания; или

– добавлять каплю глицерина на фильтровальную бумагу в крышке чашки.

8.5.9 Не ставят друг на друга более 6 чашек. Стопки чашек помещают на определенном расстоянии друг от друга, а также от стен и верхней части термостата.

8.6 Обработка результатов

8.6.1 Подсчитывают колонии в каждой чашке. При наличии колоний, выросших в результате попадания посторонней микрофлоры, их не учитывают. Если требуется, разделяют колонии дрожжей и колонии плесневых грибов на основе морфологических признаков (см. 8.7).

8.6.2 Учитывают только чашки, содержащие не менее 10 и не более 150 колоний. Если на некоторых чашках чрезмерно разрослись колонии плесневых грибов или если трудно подсчитать хорошо изолированные колонии, то считают колонии на чашках, засеянных следующим более высоким разведением, даже если их количество может быть менее 10. В последнем случае следуют требованиям 9.2.

8.7 Подтверждение

Идентичность какой-либо особой или сомнительной колонии изучают с помощью микроскопа.

При необходимости подтверждают не менее $\sqrt{n}$ колоний с помощью микроскопа, где n – количество подсчитанных колоний.

9 Представление результатов

9.1 Учитывают чашки, содержащие не менее 10 и не более 150 колоний.

Рассчитывают количество КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов N в грамме или миллилитре продукта по следующей формуле:

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

где $\sum C$ – сумма колоний, подсчитанных в отобранных чашках;

n_1 – количество отобранных чашек первого разведения, в которых в результате культивирования выросли от 10 до 150 колоний;

n_2 – количество отобранных чашек второго разведения, в которых в результате культивирования выросли от 10 до 150 колоний;

d – степень разведения, соответствующая первому разведению.

Если имеется более двух подсчитываемых разведений, в которых в результате появилось от 10 до 150 колоний, формулу следует изменить для учета дополнительных разведений. Для трех разведений формула становится следующей:

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

где n_3 – количество отобранных чашек третьего разведения, в которых в результате культивирования выросли от 10 до 150 колоний.

Полученный результат округляют до двух значащих цифр. Если округленное число равно 5, без дополнительных значащих цифр, округляют до целого четного числа в меньшую сторону. Например, 28500 округляется до 28000, а 11500 — до 12000.

За результат принимают количество КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов в миллилитре или грамме продукта, выраженного как количество от 1,0 до 9,9, умноженное на 10^x, где x – это соответствующая степень 10.

Пример – При подсчете КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов получены следующие результаты (по две чашки Петри на одно разведение):

– при первом учитываемом разведении (10^{-2}), 83 и 97 колоний;

– при втором учитываемом разведении (10^{-3}), 33 и 28 колоний:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + 0{,}1 \cdot 2]10^{-2}} = \frac{241}{0{,}022} = 10954.$$

После округления, как установлено в 9.1, получают результат 11000, или $1{,}1 \times 10^4$ КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов в грамме или миллилитре продукта.

9.2 Если две чашки, соответствующие анализируемой пробе (для жидких продуктов) или исходной суспензии (для продуктов другой консистенции) содержат менее 10 колоний, результаты записывают следующим образом:

– менее 10 КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов в миллилитре (для жидких продуктов);

– менее $10 \times 1/d$ КОЕ дрожжей и/или плесневых грибов в грамме (для продуктов другой консистенции), где d – степень разведения исходной суспензии.

9.3 Если имеются только чашки, содержащие более 150 колоний, то подсчитывают приблизительное количество из чашек, имеющих около 150 колоний, и умножают это число на обратное значение, соответствующее наивысшему разведению. Записывают результат как «приближенное количество колониеобразующих единиц дрожжей и/или плесневых грибов в грамме или миллилитре продукта».

10 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя отдельными независимыми результатами испытания, полученными одним и тем же методом при исследовании одного и того же материала в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в течение короткого промежутка времени, должна составлять более 30 % от более низкого результата не более чем в 5 % случаев.

Если требования к повторяемости не выполняются, то проводят исследование возможных источников ошибки.

Примечание – Определение повторяемости см. в ISO 5725-1.

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) применяемый метод отбора проб, если известен;

c) применяемый метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) любые манипуляции, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как дополнительные, вместе с информацией о каких-либо случаях, которые могли повлиять на результаты испытания;

e) полученные результаты испытания с четким указанием метода, применяемого для представления результатов.

Библиография

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

[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. Основные положения 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 и результатов. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений)

[1)] Равнозначен IDF 50.

УДК 637.146.1(083.74)(476) МКС 07.100.30; 67.100.01 IDT

Ключевые слова: молочные продукты, молоко, дрожжи, плесневые грибы, пробы, методы отбора проб, микробиологический анализ, метод анализа

Ответственный за выпуск *Т. В. Варивончик*

Сдано в набор 05.09.2013. Подписано в печать 30.09.2013. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,51 Уч.-изд. л. 0,51 Тираж 7 экз. Заказ 858

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru