МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33951— 2016

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения молочнокислых микроорганизмов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены 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 Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 октября 2016 г. № 92-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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 ноября 2016 г. № 1827-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33951—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2017 г.

5 ВЗАМЕН ГОСТ 10444.11—89 в части молока и молочной продукции

6 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, 2016

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

МКС 67.100.10

Поправка к ГОСТ 33951—2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Сведения о стандарте	6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ	—

(ИУС № 4 2017 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения молочнокислых микроорганизмов

Milk and milk products. Methods for determination of the lactic acid bacteria

Дата введения — 2017—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает методы определения молочнокислых бактерий:

- посевом в стерильное молоко и подсчетом наиболее вероятного числа (НВЧ);
- посевом на или в твердые питательные среды и подсчетом КОЕ.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 13928—84 Молоко и сливки заготовляемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу

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 32901—2014 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства 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 применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **молочнокислые бактерии:** Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные, нитрат-редуктаза-отрицательные и цитохром-оксидазоотрицательные, не разжижающие желатин и не продуцирующие индол кокки или прямые палочки.

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

Издание официальное

Примечание — Основные роды и виды молочнокислых бактерий в производстве молочных продуктов: вид *Lactococcus lactis*, род *Lactobacillus*, вид *Streptococcus thermophilus*, род *Leuconostoc*.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

4.1 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы — по ГОСТ 32901 со следующими дополнениями:

- стерильное обезжиренное молоко;
- гидролизованное молоко;
- агар с гидролизованным молоком;
- подкисленная среда MRS;
- среда MRS агаризованная;
- основа селективного агара;
- среда М 17;
- среда для определения *L. casei*;
- раствор мальтозы;
- гидролизованный бульон;
- среда для определения лактококков и термофильных стрептококков.

4.2 Допускается применять одноразовую посуду, если она отвечает соответствующим требованиям.

5 Отбор проб

Отбор и подготовка проб — по ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1 и ГОСТ 32901.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Подготовка посуды и материалов — по ГОСТ 32901.

6.2 Приготовление питательных сред

6.2.1 Приготовление стерильного обезжиренного молока

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко разливают в пробирки по 10 $см^3$ и затем стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (10 ± 1) мин.

Стерильное обезжиренное молоко допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней.

6.2.2 Приготовление гидролизованного молока

Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят или обрабатывают текучим паром в течение 20 мин, охлаждают до температуры (45 ± 1) °С и устанавливают активную кислотность pH (7,6 – 7,8). К 1000 $см^3$ молока добавляют (0,5 – 1,0) г порошка панкреатина и 5 $см^3$ хлороформа. Колбу со смесью закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате при температуре 40 °С в течение (18 – 24) ч. В течение первых (3 – 5) ч молоко несколько раз перемешивают (пробку после встряхивания приоткрывают для удаления паров хлороформа). Через (18 – 24) ч колбу вынимают из термостата, гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, устанавливают активную кислотность pH (7,0 – 7,2) и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Гидролизованное молоко допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней.

6.2.3 Приготовление агара с гидролизованным молоком или бульоном

К 1000 $см^3$ гидролизованного молока (6.2.2) или гидролизованного бульона (6.2.3.1) добавляют 15 г агара. Смесь нагревают до полного расплавления агара, фильтруют через вату и разливают в пробирки или колбы. Смесь стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (10 ± 1) мин.

Агар с гидролизованным молоком допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней.

6.2.3.1 Приготовление гидролизованного бульона

Состав:

- сухой гидролизат белков молока – 31 г;
- сухой дрожжевой автолизат – 2,5 г;
- фосфат калия двузамещенный – 1,5 г;
- дистиллированная вода – 1000 $см^3$.

Все компоненты вносят в колбу, перемешивают и нагревают до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH (7,3 ± 0,1) при температуре 25 °С.

Готовый гидролизованный бульон разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готового гидролизованного бульона (35 ± 1) г сухой среды вносят в (1000 ± 50) $см^3$ холодной воды. Смесь тщательно перемешивают, кипятят (3 – 5) мин, не допуская пригорания. При наличии осадка фильтруют через ватно-марлевый фильтр. В полученной среде проверяют активную кислотность и корректируют pH до (7,3 ± 0,1). При необходимости среду вновь подогревают, разливают в колбы или пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Гидролизованный бульон допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней.

6.2.4 Приготовление среды для определения лактококков и термофильных стрептококков

Состав:

- сухой гидролизат белков молока – 31,5 г;
- сухой дрожжевой автолизат – 5,0 г;
- фосфат калия двузамещенный – 1,5 г;
- агар – 12 г;
- дистиллированная вода – 1000 $см^3$.

Все компоненты вносят в колбу, перемешивают и нагревают до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH (7,3 ± 0,1) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды (50 ± 1) г сухой среды вносят в (1000 ± 50) $см^3$ холодной воды. Смесь тщательно перемешивают, кипятят 3 — 5 мин, не допуская пригорания. При наличии осадка фильтруют через ватно-марлевый фильтр. В полученной среде проверяют активную кислотность и корректируют pH до (7,3 ± 0,1). При необходимости среду вновь подогревают, разливают в колбы или пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Готовая среда прозрачная и имеет желтовато-коричневый цвет.

Рабочую среду допускается хранить при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней.

6.2.5 Приготовление среды М 17 для определения лактококков и термофильного стрептококка

Состав основной среды:

- пептон 1 – 2,5 г;
- пептон 2 – 2,5 г;
- пептон 3 (перевар сои) – 5,0 г;
- дрожжевой экстракт – 2,5 г;
- мясной экстракт – 5,0 г;
- глицерофосфат – 19,0 г;
- сернокислый магний – 0,25 г;
- аскорбиновая кислота – 0,5 г;
- агар – (9—18) г;
- дистиллированная вода – 950 $см^3$.

Все компоненты основной среды вносят в колбу, перемешивают и нагревают до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (7,2 ± 0,2) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают по 95 $см^3$ в колбы вместимостью 250 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды 55 г питательной среды вносят в колбу, добавляют 950 $см^3$ дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (7,2 ± 0,2). Готовую среду разливают по 95 $см^3$ в колбы вместимостью 250 $см^3$ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Перед использованием 95 $см^3$ основной среды расплавляют на водяной бане и охлаждают до температуры (48—56) °С. 5 $см^3$ раствора лактозы (6.3.1) подогревают до температуры (48—56) °С, добавляют его к основной среде и перемешивают.

6.2.6 Приготовление подкисленной среды MRS для молочнокислых палочек

Состав:

- пептон – 10 г;
- мясной экстракт – 10 г;
- дрожжевой экстракт – 5 г;
- глюкоза – 20 г;
- твин 80 – 1 $см^3$;
- фосфат калия однозамещенный – 2 г;

- ацетат натрия тригидрат – 5 г;
- диаммоний цитрат – 2 г;
- сернокислый магний – 0,2 г;
- сернокислый марганец – 0,05 г;
- агар – 15 г;
- дистиллированная вода – 1000 см^3.

Все компоненты (кроме твин 80) вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (5,4 ± 0,2) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды 60 г сухой питательной среды вносят в колбу, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (5,4 ± 0,2). Готовую среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

6.2.7 Приготовление среды для определения молочнокислых палочек

Состав:

- сухой гидролизат белков молока – 24 г;
- дрожжевой экстракт – 7 г;
- глюкоза – 15 г;
- твин 80 – 1 см^3;
- фосфат калия однозамещенный – 1 г;
- ацетат натрия тригидрат – 5 г;
- диаммоний цитрат – 2 г;
- сернокислый магний – 0,2 г;
- сернокислый марганец – 0,05 г;
- агар – 15 г;
- дистиллированная вода – 1000 см^3.

Все компоненты (кроме твин 80) вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и корректируют pH до (7,3 ± 0,1) таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,3 ± 0,2) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды (69 ± 1) г сухой питательной среды вносят в колбу, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и корректируют pH до (7,3 ± 0,1) таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,3 ± 0,2). Готовую среду разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

6.2.8 Приготовление среды для определения вида *L.casei (L.casei subsp.casei* или *L.casei subsp. rhamnosus)*

Состав:

- триптон – 10 г;
- дрожжевой экстракт – 5 г;
- твин 80 – 1 г;
- натрия фосфат двузамещенный – 2,6 г;
- ацетат натрия тригидрат – 5 г;
- аммония цитрат двузамещенный – 2 г;
- сернокислый магний – 0,2 г;
- сернокислый марганец – 0,05 г;
- агар – 13 г;
- дистиллированная вода – 880 см^3.

Все компоненты вносят в колбу, перемешивают и нагревают до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,9 ± 0,1) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают по 90 см^3 в колбы вместимостью 250 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды 36,73 г питательной среды вносят в колбу, добавляют 880 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации

pH составил (6,9 ± 0,1). Среду разливают по 90 см^3 в колбы вместимостью 250 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

Питательную среду допускается хранить в темном месте при температуре (4 ± 2) °С в течение 30 дней. Перед использованием среду расплавляют на водяной бане и вносят в нее 10 см^3 20%-ного раствора мальтозы (6.3.2).

6.3 Приготовление реактивов

6.3.1 Приготовление раствора лактозы

Для приготовления 10 %-ного раствора лактозы 10 г лактозы вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой, растворяют, разливают в пробирки по 5 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

6.3.2 Приготовление раствора мальтозы

Для приготовления 20 %-ного раствора мальтозы 20 г мальтозы вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки дистиллированной водой, растворяют, разливают в пробирки по 10 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

7 Условия проведения анализа

При выполнении анализа в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:
температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;
относительная влажность воздуха . . . . . от 30 % до 80 %;
атмосферное давление . . . . . от 84 кПа до 106 кПа.

8 Методы анализа

Для определения количества лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков посев проводят в жидкую питательную среду по 6.2.1 или агаризованные питательные среды по пп. 6.2.3 — 6.2.5.

Для определения количества молочнокислых палочек посев проводят в жидкую среду по 6.2.1 или 6.2.6, 6.2.7.

Для определения количества *L. casei (L.casei subsp.casei* или *L.casei subsp. rhamnosus)* в смешанных культурах с молочнокислыми палочками посев проводят в среду по 6.2.8.

8.1 Метод определения молочнокислых бактерий посевом в стерильное молоко и подсчета НВЧ

8.1.1 Сущность метода

Метод основан на способности мезофильных молочнокислых бактерий развиваться в обезжиренном молоке при температуре (30 ± 1) °С, а термофильных молочнокислых бактерий — при температуре (37 ± 1) °С, сбраживая лактозу до молочной кислоты и образуя сгусток в течение 72 ч.

8.1.2 Проведение анализа

8.1.2.1 Выбор разведений для посева

Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания этих микроорганизмов в продукте. Как правило, для подсчета палочек используют пятое, шестое или седьмое разведение. Для подсчета стрептококков — седьмое или восьмое разведение.

8.1.2.2 Посев

Из каждой пробы делают ряд последовательных разведений (до 10). По 1 см^3 последних трех-четырех разведений вносят в две параллельные пробирки со стерильным обезжиренным молоком и помещают в термостат.

8.1.2.3 Культивирование

Термостатирование чашек Петри осуществляют при температуре (37 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч в анаэробных условиях.

Термостатирование пробирок осуществляют при температуре (37 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч в аэробных условиях.

Пробирки с посевами инкубируют в течение 72 ч при:

- температуре (30 ± 1) °С для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий;
- температуре (37 ± 1) °С для подсчета термофильных молочнокислых бактерий;
- температуре (37 ± 1) °С для совместного подсчета мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий.

Во время инкубирования молоко, содержащее молочнокислые бактерии, свертывается. Из сгустка готовят микроскопический препарат.

При определении количества молочнокислых палочек или молочнокислых стрептококков и палочек по микроскопическому препарату отмечают три последних разведения, в которых содержатся палочки или палочки со стрептококками.

8.1.3 Обработка результатов

НВЧ микроорганизмов определяют по количеству пробирок с признаками роста.

Составляют числовую характеристику из трех цифр, указывающих число пробирок с признаками роста, где первая цифра соответствует разведению, при котором в двух пробирках есть признаки роста; следующие цифры — число пробирок с признаками роста в двух последующих разведениях. Выбор трех последовательных разведений для составления числовой характеристики желательно проводить так, чтобы в первом из выбранных разведений обе пробирки имели признаки роста, а в последнем разведении признаки роста в обеих пробирках отсутствовали.

По числовой характеристике определяют НВЧ (таблица 1), которое умножают на то разведение, с которого составляют числовую характеристику. Полученное число соответствует статистически достоверному количеству клеток бактерий в 1 г или 1 см^3 продукта.

Таблица 1

Числовая характеристика	НВЧ микробов при заражении двух параллельных пробирок	Числовая характеристика	НВЧ микробов при заражении двух параллельных пробирок
120	2,0	210	6,0
121	3,0	211	13,6
122	—	212	20,0
200	2,5	220	25,0
201	5,0	221	70,0
202	—	222	110,0

Пример — Если числовая характеристика 210, то по таблице ей соответствует вероятное число 6. Так как при составлении числовой характеристики было взято разведение 1:100, то для вычисления НВЧ микробов в 1 см^3 нужно 6 · 100 = 600. Следовательно, в 1 см^3 содержится 600 микробов.

Разведения	*0*	*1:10*	*1:100*	*1:1000*	*1:10 000*	*1:100 000*
Число зараженных пробирок	*2*	*2*	*2*	*2*	*2*	*2*
Число пробирок со свернувшимся молоком	*2*	*2*	*2*	*1*	*0*	*0*

8.2 Метод определения молочнокислых бактерий посевом на/или в твердые питательные среды и их подсчета

8.2.1 Сущность метода

Метод предназначен для определения молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах и основан на способности микроорганизмов расти на агаризованных селективных питательных средах при высеве определенного их количества и (или) их разведений, культивировании посевов при оптимальных условиях, учете полученных результатов и, при необходимости, определении морфологических и биохимических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете.

8.2.2 Проведение анализа

8.2.2.1 Выбор разведений для посева

Выбирают те разведения, при посеве которых на чашках Петри вырастает от 15 до 300 колоний.

8.2.2.2 Посев

Для определения молочнокислых бактерий, кроме *L. casei* или *L. rhamnosus*, в две чашки Петри засевают по 1 см^3 из трех последних разведений продукта. В каждую чашку Петри заливают по (12 — 15) см^3 среды:

- для учета количества лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков — среды по пп. 6.2.3 — 6.2.5;
- для учета количества молочнокислых палочек — среда по пп. 6.2.6, 6.2.7.

Для определения *L. casei* или *L. rhamnosus* в смешанной культуре с молочнокислыми палочками берут три чашки Петри с заранее подсушенной в термостате в течение 30 мин питательной средой (6.2.8). 1 $см^3$ каждого разведения продукта наносят на поверхность среды и тщательно растирают шпателем Дригальского по поверхности. Чашки Петри переворачивают дном вверх и помещают в термостат.

8.2.2.3 Выращивание

Чашки с посевами инкубируют в течение 72 ч при:

- температуре (30 ± 1) °С для подсчета мезофильных молочнокислых бактерий;
- температуре (37 ± 1) °С для подсчета термофильных молочнокислых бактерий;
- температуре (37 ± 1) °С для совместного подсчета мезофильных и термофильных молочнокислых бактерий.

При определении количества *L. bulgaricus* и *S. thermophilus* в образцах йогурта чашки с посевами для подсчета *L. bulgaricus* термостатируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 72 ч в анаэробных условиях, *S. thermophilus* — при температуре (37 ± 1) °С в течение 48 ч.

При определении *L. casei* или *L. rhamnosus* чашки с посевами термостатируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч.

8.2.3 Обработка результатов

По окончании инкубации подсчитывают количество характерных колоний на чашке Петри. Если колонии имеют гетерогенный вид, делают микроскопические препараты нескольких колоний для подтверждения их принадлежности к конкретному виду:

- *L. delbruecki subsp. bulgaricus* образует чечевицеобразные с четко очерченными краями колонии диаметром (1 — 3) мм на среде по 6.2.6;
- *S. thermophilus* образует чечевицеобразные колонии диаметром (1 — 2) мм на среде по 6.2.5;
- лактококки – образуют на поверхности питательной среды мелкие колонии диаметром до 1 мм, круглые, светлые; глубинные — чечевицеобразные;
- *L. casei* или *L. rhamnosus* образуют мелкие круглые колонии на поверхности плотных питательных сред и вогнутые, иногда с выростами глубинные колонии по 6.2.8.

Для подтверждения результатов выбирают использованные при подсчете колонии и готовят микроскопический препарат по ГОСТ 32901 (8.7).

Характеристика микропрепарата *L. delbruecki subsp. bulgaricus* — палочки одиночные и в парах, цепочки палочек;

Характеристика микропрепарата *S. thermophilus*-кокки, диплококк, длинные цепочки кокков;

Характеристика микропрепарата *L. casei* или *L. rhamnosus* — мелкие тонкие палочки.

Количество микроорганизмов каждого вида *N* определяют по формуле:

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

где N — количество микроорганизмов каждого вида в пробе, КОЕ/г;

C — сумма колоний, подсчитанных на чашках;

n_1 — количество чашек, соответствующих определяемому микроорганизму, подсчитанных в самом низком разведении;

n_2 — количество чашек, соответствующих, определяемому микроорганизму, подсчитанных в самом высоком разведении;

d — число, соответствующее значению разведения для каждого вида микроорганизмов, для которого был произведен первый подсчет.

Общее количество молочнокислых бактерий в йогурте определяют путем суммирования количества *L. bulgaricus* и *S. thermophilus*.

Пример — Если в 10^{-5} разведении 295 и 245 колоний L. bulgaricus и в 10^{-6} разведении 33 и 40 колоний L. bulgaricus, то $N_1 = (295+245+33+40) / [(2+0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-5}] = 278{,}6 \cdot 10^5$; если в 10^{-5} разведении 280 и 240 колоний S. thermophilus и в 10^{-6} разведении 30 и 38 колоний S. thermophilus, то $N_2 = (280+240+30+38) / [(2+0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}] = 267{,}3 \cdot 10^6$; общее количество молочнокислых бактерий $N = N_1 + N_2 = 278{,}6 \cdot 10^5 + 267{,}3 \cdot 10^6 = 295{,}2 \cdot 10^6 = 3{,}0 \cdot 10^8$ КОЕ/$см^3$.

9 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021;
- содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;
- 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.

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.

УДК 637.14.04/.07:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, молочнокислые бактерии, *L. casei*, *L. rhamnosus, L. bulgaricus, S. thermophilus,* отбор проб, метод определения молочнокислых бактерий посевом в стерильное молоко и подсчета НВЧ, метод определения молочнокислых бактерий посевом на/или в твердые питательные среды и их подсчета, требования, обеспечивающие безопасность

Редактор *Н.Р. Лемех*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.С. Тыртышного*

Сдано в набор 06.12.2016. Подписано в печать 23.12.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,26. Тираж 42 экз. Зак. 3267.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru