ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56139— 2014

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН коллективом специалистов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» (ФГБНУ «НИИ питания»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукция пищевая специализированная»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 сентября 2014 г. № 1173-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «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.ru)

© Стандартинформ, 2015

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 Сущность методов 4
5 Аппаратура, материалы, лабораторная посуда и реактивы 4
6 Приготовление питательных сред, реактивов и материалов 6
7 Подготовка к анализу 10
8 Проведение анализа 12
9 Методы идентификации пробиотических микроорганизмов 15
10 Обработка результатов 17
Приложение А (обязательное) Признаки роста пробиотических микроорганизмов на питательных средах 19
Приложение Б (справочное) Характерные ферментативные реакции для штаммов бифидобактерий, наиболее часто используемых при производстве функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами 20
Библиография 21

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ

Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов

Functional foods.
Methods for detection and enumeration of probiotic microorganisms

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на функциональные пищевые продукты (молочные продукты, молочные составные продукты, молокосодержащие продукты, безалкогольные напитки и биологически активные добавки к пище), обогащенные пробиотическими микроорганизмами, и функциональные пищевые ингредиенты, содержащие пробиотические микроорганизмы, и устанавливает методы определения пробиотических микроорганизмов родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, а также штаммов рода *Lactococcus* и вида *Streptococcus thermophilus*, используемых в ассоциациях с пробиотическими микроорганизмами, и подсчета их количества.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 490–2006 Кислота молочная пищевая. Технические условия

ГОСТ 975–88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2156–76 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4159–79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4198–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4232–74 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523–77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 5556–81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6672–75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6687.0–86 Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ ISO 7218–2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 10444.1–84 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

Издание официальное

ГОСТ 10444.11–2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13646–68 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13739–78 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805–76 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919–83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 15113.0–77 Концентраты пищевые. Правила приемки, отбор и подготовка проб

ГОСТ 16317–87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206–96 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 19908–90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 21239–93 Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21240–89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241–89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280–76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932–90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363–80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706–83 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26669–85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670–91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

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

ГОСТ 27987–88 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 28495–90 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

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

ГОСТ 29227–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ ISO 29981–2013 Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

ГОСТ 31725–2012 Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия

ГОСТ 31904–2012 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ Р ЕН 13060–2011 Стерилизаторы паровые малые

ГОСТ Р 51652–2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ Р 51935–2002 Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ Р 52687–2006 Продукты кисломолочные, обогащенные бифидобактериями бифидум. Технические условия

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 53430–2009 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 вы-

пускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по [1], [2], ГОСТ 10444.11, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **пробиотические микроорганизмы:** Живые непатогенные, нетоксигенные микроорганизмы, поступающие в кишечник человека с пищей, благотворно воздействующие на организм человека и нормализующие состав и биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта (микроорганизмы родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, а также используемые в ассоциациях с ними бактерии рода *Lactococcus*, вида *Streptococcus thermophilus*).

3.2 **лактобациллы (*Lactobacillus*)**: Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие палочковидные бактерии, имеющие форму от длинных и тонких палочек до коротких коккобацилл, обладают выраженным полиморфизмом, температурные пределы культивирования 5 °С — 53 °С, оптимум обычно 30 °С — 40 °С; факультативные анаэробы или микроаэрофилы, кислотолюбивые (pH 5,5–5,8 и менее), хемоорганотрофы; метаболизм сахаролитический по гомо- или гетероферментативному типу, всегда с образованием молочной кислоты, с образованием газа или без него; каталаза-, нитратредуктаза- и цитохром-оксидазаотрицательные.

3.3 **бифидобактерии (*Bifidobacterium*):** Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие бактерии, обладающие выраженным полиморфизмом: прямые, изогнутые или разветвленные палочки, часто раздвоенные *Y*- или *V*-образной формы, булавовидные, расположены одиночно, цепочками или скоплениями в виде «китайских иероглифов»; неустойчивы в кислой среде, температурные пределы культивирования 34 °С — 41 °С, оптимальная температура 36 °С — 38 °С; анаэробы, но при высоких концентрациях CO_2 толерантны к кислороду; хемоорганотрофы; метаболизм сахаролитический; газа не образуют; глюкозу сбраживают преимущественно до уксусной и молочной кислот; каталазаотрицательные, но могут вырабатывать каталазу, если растут в аэробных условиях.

3.4 **пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium*):** Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие плеоморфные палочковидные бактерии, в зависимости от условий культивирования и цикла развития способны менять форму до кокковидной, изогнутой, булавовидной или раздвоенной; располагаются поодиночке, парами, цепочками или группами; температурный диапазон для роста — 25 °С — 46 °С, оптимальная температура — 30 °С — 37 °С и pH около 7,0; предпочитают строго анаэробные условия, но многие представители аэротолерантны; хемоорганотрофы; метаболизм сахаролитический; сбраживают субстраты преимущественно до пропионовой и уксусной кислот и углекислого газа.

3.5 **стрептококки вида *Streptococcus thermophilus***: Грамположительные молочнокислые кокки, неподвижные, располагаются длинными цепочками; оптимальная температура развития — 40 °С — 45 °С, факультативные анаэробы, свертывают молоко при 50 °С; предел кислотообразования — 100 — 115 °Т; каталазаотрицательные; дифференциальные признаки — не развиваются при наличии в молоке 0,1 % метиленового голубого, не дают роста в питательных средах с pH 9,6 и с содержанием 6,5 % NaCl.

3.6 **бактерии рода *Lactococcus*:** Мезофильные грамположительные, неподвижные, неспорообразующие молочнокислые кокки; факультативные анаэробы, свертывающие молоко в течение первых 24 ч, формирующие точечные круглые колонии на плотных селективных средах при 30 °С; оптимальная температура для культивирования — 30 °С — 35 °С, сбраживают лактозу до молочной кислоты, растущие культуры имеют форму стрептококка.

4 Сущность методов

Методы основаны на высеве функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, содержащих пробиотические микроорганизмы или пробиотические микроорганизмы в ассоциации с молочнокислыми микроорганизмами, в определенных разведениях в (на) селективные питательные среды для глубинного или поверхностного культивирования, их культивировании при оптимальных для роста вышеуказанных микроорганизмов условиях и последующем определении их культурально-морфологических свойств, идентификации изолированных культур по физиолого-биохимическим признакам и подсчете количественного содержания в продукте.

Методы предназначены для установления родовой и видовой принадлежности пробиотических микроорганизмов и количественных показателей их содержания в функциональных пищевых продуктах и ингредиентах, содержащих пробиотические микроорганизмы.

5 Аппаратура, материалы, лабораторная посуда и реактивы

5.1 Вспомогательное оборудование и инструменты

Анализатор потенциометрический (pH-метр) с точностью ± 0,01 единицы pH при температуре 25 °С по ГОСТ 27987.

Аппарат универсальный типа АВУ-6С для встряхивания жидкости в колбах и пробирках (шуттель — аппарат).

Баня водяная с подогревом.

Весы лабораторные общего назначения, 2-го и 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г (или получаемые по импорту) по ГОСТ Р 53228.

Лотки эмалированные или кристаллизаторы.

Лупа измерительная по ГОСТ 25706.

Микроскоп биологический с иммерсионной системой.

Облучатель бактерицидный настенный.

Прибор для счета колоний бактерий.

Скальпель хирургический, 15 см по ГОСТ 21240.

Стерилизаторы паровые медицинские по ГОСТ Р ЕН 13060, ГОСТ Р 51935.

Термостат, позволяющий поддерживать температуру от 15 °С до 65 °С с отклонением от заданной ± 1 °С.

Инкубатор-анаэростат или другие устройства, создающие анаэробные условия культивирования.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 16317.

Таймер.

Часы песочные настольные на 1,5 и 10 мин.

Шкаф сушильный стерилизационный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима в диапазоне от 50 °С до 200 °С с погрешностью ± 2 °С.

Электроплитка по ГОСТ 14919.

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды в соответствии с ГОСТ 6709.

5.2 Лабораторная посуда и материалы

Бумага индикаторная универсальная.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Бутылки стеклянные для химических реактивов.

Флаконы стеклянные для питательных сред.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Карандаш по стеклу.

Колбы типа Кн, номинальной вместимостью 40, 200, 400, 1000 $см^3$ по ГОСТ 19908.

Колбы исполнения 2, 2-го класса точности, номинальной вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Колбы исполнения 2, 2-го класса точности, номинальной вместимостью 50, 100, 200, 500, 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Колбы мерные исполнения 1, 2-го класса точности, номинальной вместимостью 50, 100 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пакеты полимерные стерильные для гомогенизатора перистальтического типа.

Пакеты газогенерирующие.

Ножницы медицинские по ГОСТ 21239.

Пинцет медицинский по ГОСТ 21241.

Палочки стеклянные.

Шпатели Дригальского.

Шпатели металлические или фарфоровые 15–20 см.

Штативы металлические или пластмассовые.

Петли бактериологические.

Пипетки исполнения 5, 1-го, 2-го классов точности вместимостью 1 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Пипетки исполнения 7, 1-го, 2-го классов точности вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 29227.

Пробирки типов П1, П2, диаметром 16 мм, высотой 150 мм по ГОСТ 25336.

Проволока нихромовая, диаметром 0,4–0,5 мм для изготовления бактериологических петель и игл.

Проволока платиновая для изготовления бактериологических петель.

Спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932.

Стаканчики для взвешивания типа СВ по ГОСТ 25336.

Стаканы типа ВН, вместимостью 100 и 200 $см^3$ по ГОСТ 19908.

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.

Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672.

Ступка фарфоровая с пестиком по ГОСТ 9147.

Термометр (ртутный) с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 13646.

Термометр жидкостный (нертутный) с диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Фильтры мембранные с размером пор 0,2 мкм.

Цилиндры исполнения 1, вместимостью 100, 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Чашки биологические (Петри) по ГОСТ 23932.

Шуттель-аппарат.

5.3 Реактивы, индикаторы и питательные среды

Йод по ГОСТ 4159.

Калий йодистый по ГОСТ 4232.

Калий фосфорнокислый однозамещенный (дигидрофосфат) по ГОСТ 4198.

Калия гидроокись, раствор массовой концентрацией 10 $г/дм^3$ по ГОСТ 24363.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный (гидрофосфат) по ГОСТ 31725.

Натрия глицерофосфат.

Кислота соляная по ГОСТ 3118.

Кристаллический фиолетовый.

Лактоза кристаллическая.

Лактоза моногидрат.

Глюкоза кристаллическая по ГОСТ 975.

Твин–80.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523.

Натрия гидроокись, раствор массовой концентрацией 200 $г/дм^3$ по ГОСТ 4328.

Кислота молочная, раствор объемной долей 20 % по ГОСТ 490.

Кислота тиогликолевая.

Кислота аскорбиновая.

Натрий двууглекислый (гидрокарбонат), раствор массовой концентрацией 100 $г/дм^3$ по ГОСТ 2156.

Натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805.

Автолизат дрожжевой.
Экстракт дрожжевой сухой.
Экстракт мясной.
Панкреатин.
Перевар триптический казеина (триптон).
Перевар пептический мяса (пептон).
Перевар папаиновый сои (пептон соевый).
Агар микробиологический по ГОСТ 17206.
Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.
Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.
Кислота сорбиновая.
Диклоксациллин.
L-цистин или L-цистеин.
L-цистеин гидрохлорид.
Набор для окраски по Граму.
Среда МРС (MRS) бульон.
Среда МРС (MRS) агар.
Молоко обезжиренное.
Среда Блаурокка модифицированная.
Среда для культивирования и выделения бифидобактерий.
Среда гидролизатно-молочная.
Среда кукурузно-лактозная.
TOS пропионатный агар (основа).
MUP селективная добавка к TOS пропионатному агару.
Среда М-17.
Среда Ли (Lee).

Стандарты для визуальной оценки мутности бактериальных взвесей по шкале МакФарланда по [3], [4].

Системы для биохимической идентификации микроорганизмов, включающие тест-панели (планшеты) на 20, 23 и 49 тестов ферментации.

6 Приготовление питательных сред, реактивов и материалов

6.1 Подготовка посуды и материалов

Подготовка новой стеклянной посуды, мытье, сушка, стерилизация, обеззараживание посуды с использованными питательными средами и растворами проводят в соответствии с ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ Р 53430

Стерильную посуду хранят в плотно закрывающихся шкафах или ящиках с крышками. Срок хранения стерильной стеклянной посуды — не более 30 сут при ненарушенной упаковке или в невскрытых пеналах.

Допускается использование стерильной одноразовой посуды из полимерных материалов в соответствии со сроком годности, указанным на упаковке.

6.2 Приготовление растворов для разведения продуктов

6.2.1 Приготовление концентрированного фосфатного буферного раствора

(34,0 ± 0,1) г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в объеме от 500,0 до 700,0 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770. Устанавливают активную кислотность раствора (7,2 ± 0,1) ед. pH добавлением раствора гидроокиси натрия и доводят дистиллированной водой до метки. Хранят в емкости, укупоренной резиновой пробкой, в условиях холодильника не более 30 сут.

6.2.2 Приготовление разбавленного фосфатного буферного раствора

Вносят пипеткой 1,25 $см^3$ концентрированного фосфатного буферного раствора, приготовленного по 6.2.1, в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770, и доводят объем дистиллированной водой до метки, проверяют активную кислотность (7,1 ± 0,1) ед. pH.

Разливают разбавленный фосфатный буферный раствор по 9,0 $см^3$ в пробирки, по 100,0 или по 900,0 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости, закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1)° С в течение (20 ± 1) мин.

6.2.3 Приготовление фосфатно-тиогликолевого буферного раствора

В 100 $см^3$ дистиллированной воды при нагревании растворяют 1,0 г агара, 6,0 г натрия гидрофосфата (Na_2HPO_4) и 4,5 г калия дигидрофосфата (KH_2PO_4). Остужают, пипеткой добавляют 0,4 $см^3$ тиогликолевой кислоты, устанавливают активную кислотность раствора (6,8 ± 0,1) ед. pH и доводят объем смеси до 1000 $см^3$. Разливают фосфатно-тиогликолевый буферный раствор по 9,0 $см^3$ в пробирки, по 100,0 или по 900,0 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости, закрывают ватными пробками. Стерилизуют в автоклаве при (112 ± 1) °С в течение 2–5 мин.

Перед употреблением буферный раствор регенерируют на кипящей водяной бане в течение 20 мин для снижения содержания в нем растворенного кислорода. В момент использования температура раствора должна составлять 40 °С — 45 °С.

Буферный раствор используют для приготовления разведений функциональных продуктов на основе бифидобактерий со смешанной технологической микрофлорой.

6.2.4 Приготовление раствора лимоннокислого натрия

В 1000,0 $см^3$ дистиллированной воды растворяют 20 г трехзамещенного лимоннокислого натрия, разливают в пробирки по 9,0 $см^3$, по 100,0 или по 900,0 $см^3$ в колбы соответствующей вместимости и стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение (20 ± 1) мин.

Раствор лимоннокислого натрия используют для приготовления разведений функциональных продуктов на основе творога, творожных продуктов, сыра, обогащенных пробиотическими микроорганизмами.

6.3 Приготовление питательных сред для культивирования пробиотических микроорганизмов

6.3.1 Среды сухие промышленного производства, указанные 5.3, готовят согласно рекомендациям изготовителей, указанным на этикетках. Допускается применение аналогичных сред лабораторного приготовления из отдельных компонентов.

6.3.2 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Lactobacillus*

6.3.2.1 Среда МРС (MRS) агаризованная

Среду готовят по ГОСТ 10444.11.

6.3.2.2 Среда МРС (MRS) полужидкая

Среду готовят аналогично агаризованной, но с добавлением 0,6 % — 0,7 % агара.

6.3.2.3 Стерилизованное обезжиренное молоко

Обезжиренное молоко (кислотностью от 16 °Т до 18 °Т) разливают в пробирки по 10,0 $см^3$ и затем стерилизуют в автоклаве при (115 ± 1) °С в течение (10 ± 1) мин.

6.3.3 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Bifidobacterium*

6.3.3.1 Среды селективные для выделения бифидобактерий

а) Модифицированная печеночно-цистеиновая среда Блаурокка

Среду готовят по ГОСТ Р 52687.

б) Тиогликолевая среда

В 1000 $см^3$ дистиллированной воды вносят 15,0 г ферментативного сухого гидролизата казеина неглубокой степени расщепления (триптона), 5,0 г сухого дрожжевого экстракта, 2,5 г хлорида натрия, 0,75 г микробиологического агара, размешивают и нагревают до температуры 60 °С — 70 °С. L-цистеин предварительно растворяют при постепенном добавлении раствора гидроокиси натрия (до полного растворения). Раствор цистеина вносят в приготовленную смесь, устанавливают активную кислотность 8,0–8,2 ед. pH с помощью раствора гидроокиси натрия, кипятят в течение двух-трех минут до полного расплавления агара. Добавляют 5,0 г глюкозы и 0,3 $см^3$ тиогликолевой кислоты (или натрия тиогликолята — 0,5 г), фильтруют через фильтровальную бумагу, устанавливают pH 7,2–7,3 с помощью 5 %-ного раствора соляной кислоты. Среду разливают в стерильные пробирки высоким столбиком и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Готовую среду хранят в защищенном от света месте при температуре 18 °С — 25 °С.

в) Бифидум-среда

Среду готовят согласно прописи производителя, указанной на этикетке.

6.3.3.2 Среды селективные для определения количества бифидобактерий в продуктах со смешанной технологической микрофлорой

а) В качестве селективного агента для ингибиции роста сопутствующих биотехнологических микроорганизмов используют добавки антибиотиков и редуцирующие агенты, снижающие окислительно-восстановительный потенциал питательной среды.

б) TOS-MUP агар (TOS пропионатный агар с мупироцином лития)

Среду готовят по ГОСТ ISO 29981.

в) Питательная среда МРС (MRS) с диклоксациллином

- Приготовление раствора селективного агента

25 мг диклоксациллина растворяют в 50 $см^3$ дистиллированной воды, затем полученный раствор стерилизуют фильтрацией по ГОСТ 26670 при использовании мембранных фильтров с размером пор 0,2 мкм, срок хранения раствора — 15 сут при температуре 4 °С.

Допускается готовить раствор диклоксациллина без фильтрации с соблюдением правил асептики, при этом диклоксациллин в асептических условиях растворяют в стерильной дистиллированной воде.

Непосредственно перед использованием готовят рабочее разведение этого раствора 1:10.

- Приготовление антиоксидантного раствора

Растворяют 3 г L-цистеина гидрохлорида в 100 $см^3$ дистиллированной воды, затем полученный раствор стерилизуют фильтрацией по ГОСТ 26670 при использовании мембранных фильтров с размером пор 0,2 мкм. Раствор разливают по 10 $см^3$ в стерильные пробирки. Хранят раствор 15 сут при температуре 4 °С.

Допускается готовить раствор L-цистеина без фильтрации с соблюдением правил асептики, при этом в асептических условиях растворяют L-цистеин гидрохлорид в стерильной дистиллированной воде.

- Приготовление питательной среды МРС (MRS)

Среду готовят по 6.3.2.1 и разливают в бутылки или флаконы по 100 $см^3$.

Перед использованием среду расплавляют и выдерживают в кипящей водяной бане в течение 20 мин для регенерации среды. Затем среду охлаждают до температуры 40 °С — 45 °С, после чего вносят на каждые 100 $см^3$ среды по 1 $см^3$ раствора селективного агента и 1 $см^3$ раствора антиоксиданта. Смесь аккуратно перемешивают, не допуская насыщения среды воздухом.

6.3.3.3 Среды неселективные для культивирования изолятов бифидобактерий

а) Гидролизатно-молочная среда

Среду готовят в два этапа.

- Натуральное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят в течение (2 ± 1) мин и охлаждают до температуры (45 ± 2) °С. Доводят активную кислотность до pH (7,7 ± 0,1), добавляя водный раствор гидроокиси натрия. К 1000 $см^3$ молока добавляют 1,0 г порошка панкреатина. Затем к молоку добавляют от 5 до 6 $см^3$ хлороформа. Колбу закрывают корковой пробкой и выдерживают при температуре (40 ± 2) °С в течение 18–24 ч. В течение первых 3-5 ч молоко 2-3 раза перемешивают (пробку после перемешивания приоткрывают для удаления хлороформа).

Затем гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1:1, устанавливают активную кислотность pH (7,1 ± 0,1), добавляя водный раствор гидроокиси натрия. В случае хранения гидролизованное молоко стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

- Приготовление гидролизатно-молочной среды

В небольшом количестве разведенного гидролизата молока расплавляют агар в количестве 2,5 г на 1000 $см^3$ приготовляемой среды. К остальному количеству гидролизата добавляют 20 г пептона и 3,5 г хлористого натрия, смесь нагревают до температуры (80 ± 2) °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. В смеси устанавливают активную кислотность (7,4 ± 0,1) ед. pH, кипятят в течение (15 ± 1) мин, дают отстояться, сливают с осадка, не фильтруя, доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема и добавляют в нее 10 г лактозы и 0,15 г солянокислого цистина. Среду разливают в пробирки высоким столбиком и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин, pH готовой среды (7,1 ± 0,1) ед. pH при 25 °С.

б) Кукурузно-лактозная среда

Среду готовят по ГОСТ Р 52687.

6.3.4 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Lactococcus* и вида *Streptococcus thermophilus*

6.3.4.1 Приготовление среды Ли (Lee)

Среду готовят по ГОСТ 10444.11.

6.3.4.2 Приготовление питательной среды М-17

а) Основа среды

В 950 $см^3$ дистиллированной воды на кипящей водяной бане растворяют 2,5 г триптического перевара казеина (триптона), 2,5 г пептического перевара мяса (пептона), 5,0 г перевара папаинового сои (пептона соевого), 2,5 г дрожжевого экстракта, 5,0 г мясного экстракта, 19,0 г глицерофосфата натрия ($C_3H_7O_6PNa_2$), 0,25 г сернокислого магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,5 г аскорбиновой кислоты, 9–18 г агара, охлаждают на другой водяной бане до 50 °С. Устанавливают активную кислотность среды таким образом, чтобы после стерилизации при 25 °С pH был в пределах (6,8 ± 0,1) ед. pH при посеве на *Lactococcus spp.* или (7,2 ± 0,1) ед. pH — при посеве на *Streptococcus thermophilus.* Готовую среду разливают в лабораторную посуду соответствующей вместимости по 95 $см^3$. Стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

б) Раствор лактозы

10,0 г лактозы растворяют в 100,0 $см^3$ дистиллированной воды, стерилизуют в автоклаве при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

в) Приготовление среды

Непосредственно перед использованием расплавляют 95 $см^3$ основной среды в водяной бане и быстро охлаждают до 48 °С — 50 °С. Подогревают 5 $см^3$ раствора лактозы до 48 °С — 50 °С. Добавляют раствор лактозы к основной среде и перемешивают.

6.3.5 Приготовление питательных сред для культивирования бактерий рода *Propionibacterium*

6.3.5.1 Плотная кукурузно-лактозная среда готовится по ГОСТ Р 52687.

6.3.5.2 Агаризованная питательная среда для определения пропионовокислых бактерий

В (1000 ± 50) $см^3$ воды вносят 30 г пептона, 1 г дрожжевого автолизата, 20 г агара. Смесь тщательно перемешивают, затем нагревают и кипятят до расплавления агара, не допуская пригорания. Добавляют 20 $см^3$ 40 %-ного раствора молочной кислоты. В полученной среде проверяют активную кислотность и доводят ее раствором гидроокиси натрия до значения (7,1 ± 0,1) ед. pH. Среду перемешивают, разливают в пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в автоклаве в течение (15 ± 1) мин.

6.4 Подготовка питательных сред перед использованием

6.4.1 Питательные среды расплавляют на кипящей водяной бане или другим способом, который дает аналогичный результат (например, текучим паром в автоклаве), избегая перегревания среды, для чего прекращают нагрев сразу же после расплавления. Перед использованием питательную среду содержат в расплавленном состоянии на водяной бане с терморегулятором при температуре (47 ± 2) °С.

Сохраняют расплавленную питательную среду не более 6 ч. Неиспользованную полностью среду после ее затвердения не применяют.

6.4.2 При необходимости регенерации (деаэрирования для снижения растворенного кислорода) питательных сред, фосфатно-тиогликолевого буферного раствора и других растворов их прогревают непосредственно перед использованием в течение 20 мин на кипящей водяной бане. Далее пробирки или флаконы с растворами охлаждают в водяной бане до температуры (45 ± 2) °С.

6.4.3 Агаризованные питательные среды разливают в чашки Петри с толщиной слоя питательной среды не менее 2 мм и после застывания подсушивают. При подсушивании для удаления влаги с поверхности среды чашки переворачивают вверх дном и выдерживают в течение 30 мин в термостате при температуре 48 °С — 50 °С. Приготовленные таким образом чашки Петри накрывают крышками и используют немедленно или хранят при условиях, предупреждающих изменение их состава, т. е. в темноте и в холодильнике в течение рабочего дня.

6.5 Приготовление растворов и реактивов для анализа

6.5.1 Стерильная дистиллированная вода

Дистиллированную воду разливают в колбы или пробирки в необходимых количествах и стерилизуют в автоклаве в течение (20 ± 1) мин при (121 ± 1) °С.

6.5.2 Раствор натрия гидрокарбоната для нейтрализации проб

10 г натрия гидрокарбоната помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде, доводят объем раствора до метки. Раствор разливают в пробирки и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение (30 ± 1) мин.

6.5.3 Приготовление реактивов для окраски по Граму

Реактивы готовят по ГОСТ ISO 7218.

6.5.4 Приготовление раствора HCl с массовой долей 5 %

11,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки.

7 Подготовка к анализу

7.1 Требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования безопасности при подготовке и проведении исследования, при работе с микроорганизмами по ГОСТ ISO 7218, а также требования, изложенные в [5], требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

7.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускается специалист, имеющий опыт работы в микробиологической лаборатории, освоивший методы и прошедший инструктаж по технике безопасности при работе с вредными веществами и пожарной безопасности.

7.3 Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 31904, ГОСТ 26669, ГОСТ Р 53430 с учетом следующих положений.

7.3.1 Отбор проб для микробиологических анализов проводят перед отбором проб для физико-химических и органолептических анализов.

Анализируют пробы, отобранные из потребительской упаковки с продукцией, попавшей в выборку. Объем выборки для конкретных наименований функциональных пищевых продуктов установлен требованиями ГОСТ 26809, ГОСТ 15113.0, ГОСТ 6687.0, ГОСТ 28495.

7.3.2 Пробы до вскрытия упаковки пятикратно перемешивают: жидкие функциональные пищевые продукты путем переворачивания, твердые — встряхиванием. Перед вскрытием поверхность упаковки функционального пищевого продукта протирают для удаления грязи, при необходимости обмывают питьевой водой и подсушивают. Затем поверхность упаковки протирают 70 %-ным этиловым спиртом. После высыхания поверхности производят вскрытие упаковки в асептических условиях стерильными или профламбированными инструментами. Функциональный пищевой продукт во вскрытых упаковках вновь тщательно перемешивают стерильными приспособлениями.

7.3.3 Суммарную пробу отбирают по массе (для твердых и сухих функциональных пищевых продуктов) или по объему (для жидких функциональных пищевых продуктов). Отбор проб проводят в стерильную посуду соответствующих вместимости и формы (стеклянные колбы, банки, чашки Петри), закрывают стерильными пробками или крышками, горловины колб и банок закрывают стерильной бумагой и обвязывают.

7.3.4 Перед анализом проб на наличие микроаэрофильных и анаэробных пробиотических бактерий (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Propionibacterium*) твердые функциональные пищевые продукты измельчают в перистальтическом гомогенизаторе или в фарфоровой ступке, избегая активного перемешивания; жидкие — перемешивают круговыми движениями, избегая активного встряхивания во избежание насыщения воздухом.

7.3.5 Из суммарной пробы пищевого продукта отбирают лабораторную пробу в следующем количестве: жидких и пастообразных функциональных пищевых продуктов не менее 15–20 $см^3$, творога, сыров и продуктов на их основе — 15–20 г, мороженого — 40–50 г, сухих функциональных пищевых продуктов — 40–50 г.

Далее отбирают анализируемые пробы, предназначенные для посева в питательные среды и (или) для приготовления разведений, которые должны составлять 10 г или 10 $см^3$ функционального пищевого продукта.

7.3.6 При анализе многокомпонентных функциональных пищевых продуктов суммарную пробу отбирают так, чтобы в ней были представлены все его компоненты в том же соотношении.

7.3.7 Кисломолочные жидкие пробиотические продукты и сквашенные пробиотические продукты на молокосодержащей основе, жидкие БАД к пище с пробиотическими микроорганизмами и прочие пробиотические ферментированные продукты перед проведением анализа нейтрализуют. Для этого из каждой пробы после тщательного перемешивания стерильной стеклянной палочкой отбирают необходимый объем продукта и помещают в стерильную посуду. На каждые 10 $см^3$ анализируемой пробы добавляют 1,0 $см^3$ стерильного раствора гидрокарбоната натрия с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$; содержимое перемешивают с использованием стерильных приспособлений или шуттель-аппарата.

7.3.8 Нейтрализацию сухих кисломолочных продуктов и сквашенных пробиотических продуктов на молокосодержащей основе, БАД на основе пробиотических микроорганизмов, высушенных в среде культивирования, в том числе таблетированных и инкапсулированных, проводят на этапе приготовления первого разведения для посева.

7.3.9 Нейтрализацию функциональных продуктов на основе творога, сыра, творожных продуктов и других аналогичных по консистенции пастообразных продуктов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами, проводят по 7.3.6. Для этого пробу для анализа продукта взвешивают на стерильном часовом стекле, чашке Петри, в бюксе, переносят в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую крышкой от чашки Петри, или пакет для перистальтического гомогенизатора, тщательно растирают, нейтрализуют по 7.3.7.

7.3.10 Мороженое, обогащенное пробиотическими микроорганизмами, перед проведением анализа расплавляют. Для этого отобранные пробы мороженого помещают в стерильную посуду с притертой или ватной пробкой. Перед использованием посуду с пробой нагревают на водяной бане при температуре не выше 40 °С и перемешивают до получения однородной эмульсии.

7.4 Приготовление разведений продуктов для посева

7.4.1. К анализируемой пробе жидкого продукта объемом 10 $см^3$ или твердого продукта массой 10 г добавляют предварительно регенерированный по 6.4.2 стерильный разбавленный фосфатный буферный раствор, фосфатно-тиогликолевый буферный раствор или раствор лимоннокислого натрия до достижения общего объема или массы пробы 100 $см^3$ (г), после чего смесь опять тщательно перемешивают до гомогенного состояния. Таким образом, получают первое разведение продукта (1×10^{-1}).

7.4.2 Первое разведение для сухих кисломолочных продуктов, сквашенных пробиотических продуктов на молокосодержащей основе и БАД на основе пробиотических микроорганизмов, высушенных в среде культивирования, нейтрализуют. Для этого на каждые 10 $см^3$ разведения в стерильную посуду добавляют 1,0 $см^3$ стерильного раствора натрия гидрокарбоната с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$; содержимое перемешивают с использованием стерильных приспособлений или шуттель-аппарата. Общая масса первого разведения пробы с разбавителем и нейтрализующим раствором должна составлять 100 г.

7.4.3 При анализе функциональных пищевых продуктов в капсулированном виде ее освобождают от капсул в асептических условиях с применением стерильных инструментов.

7.4.4 При анализе функциональных пищевых продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы в микрокапсулированной форме, при приготовлении первого разведения необходимо освободить микроорганизмы от покрытий путем растворения последних.

7.4.4.1 Для удаления покрытия из полисахаридов производится энергичное перемешивание взвеси первого разведения в течение 10–15 мин круговыми движениями.

7.4.4.2 Для удаления двойного покрытия из полисахаридов и белков/пептидов производится энергичное перемешивание взвеси первого разведения не менее 21 мин круговыми движениями. Порядок операций следующий: осторожное размешивание (без образования пузырьков) в течение двух минут, отстаивание в течение пяти минут, операции повторяют три раза для полного растворения покрытия.

7.4.4.3 Для того чтобы проверить, растворилось ли покрытие, из пробы первого разведения готовят микроскопический препарат и просматривают его под микроскопом. Если клетки остались в агрегированном состоянии и покрытия полностью не растворились, процедуру удаления покрытия повторяют.

7.4.5 Последующие десятикратные разведения функционального пищевого продукта готовят, добавляя в 9 $см^3$ предварительно регенерированного разбавленного фосфатного буферного раство-

ра, фосфатно-тиогликолевого буферного раствора или раствора лимоннокислого натрия по 1 $см^3$ предыдущего разведения функционального пищевого продукта. Перемешивание предыдущего разведения осуществляют путем осторожного промывания пипетки до 10 раз полученной смесью до верхнего уровня имеющихся на ней делений, не допуская появления пузырьков и насыщения смеси воздухом. Для приготовления каждого разведения берут новую стерильную пипетку.

7.4.6 Разведения готовят с таким расчетом, чтобы последние из них не содержали пробиотических микроорганизмов. Для посева в (на) питательные среды выбирают разведения продукта, согласно таблице 1.

Таблица 1

Нормируемое количество пробиотических микроорганизмов	Рекомендуемое разведение для посева
10^6	10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}
10^7	10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}
10^8	10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9},10^{-10}
10^9	10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9},10^{-10},10^{-11}
10^{10}	10^{-8}, 10^{-9},10^{-10},10^{-11},10^{-12}

Примечание — В случае ожидаемого большого количества пробиотических микроорганизмов в функциональных пищевых продуктах допускается использовать для посева разведения продукта со степенью, соответствующей нормируемому уровню их содержания, а также разведения на один порядок выше и ниже.

8 Проведение анализа

8.1 Поверхностный метод посева на плотные среды в чашках Петри

8.1.1 На подсушенную питательную среду наносят разведение продукта в количестве 0,2 $см^3$ и немедленно равномерно втирают посевной материал по всей поверхности с помощью стерильного шпателя. Посев каждого разведения продукта проводят параллельно в две чашки Петри.

8.1.2 Засеянную поверхность подсушивают, выдерживая чашки в горизонтальном положении в течение 15 мин, переворачивают вверх дном и помещают в термостат, установленный на соответствующую температуру.

8.1.3 Для обеспечения оптимальных условий роста бактерий рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* на агаризованных средах осуществляют ограничение доступа кислорода одним из указанных ниже методов:

а) посевы помещают в газовую среду, состоящую из 95 % газообразного азота и 5 % углекислого газа;

б) посевы помещают в анаэробный сосуд (или изолирующий пластиковый пакет), в который закладывают газогенерирующие пакеты для химического связывания кислорода.

в) посевы помещают в анаэростат, аппарат закрывают, с помощью вакуумного насоса создают вакуум 86,6—93,3 кПа;

г) на застывшую питательную среду в чашках Петри наливают второй слой расплавленной и охлажденной до (45 ± 2) °С агаризованной среды в количестве 5,0 $см^3$ и оставляют до затвердения.

Учет полученных результатов должен производиться непосредственно после термостатирования. В других случаях, кроме особо оговоренных, чашки с посевами хранят не более 24 ч в холодильнике.

8.2 Глубинный метод посева в жидкие и полужидкие питательные среды в пробирках

8.2.1 Используют три ряда пробирок, содержащих полужидкую питательную среду или стерильное обезжиренное молоко, для высева в них соответствующих разведений анализируемого функционального пищевого продукта для определения количества пробиотических микроорганизмов по методу наиболее вероятного числа (НВЧ). Перед проведением анализа среду, разлитую при приготовле-

нии высоким столбиком (не менее 10 $см^3$ в пробирке), нагревают в кипящей водяной бане до полного расплавления агара в среде и выдерживают в кипящей водяной бане в течение (25 ± 5) мин для снижения в ней содержания растворенного кислорода. Затем пробирки охлаждают в водяной бане до температуры (45 ± 2) °С. Анализируемую пробу из трех последовательных разведений вносят в питательную среду в трехкратной повторности начиная с последнего выбранного десятикратного разведения анализируемого функционального пищевого продукта, по 1 $см^3$ в заранее промаркированные три пробирки питательной среды последовательно от большего разведения к меньшему. При внесении разведений в питательную среду проводят тщательное перемешивание пипеткой, а затем круговыми движениями руки или с помощью шуттель-аппарата, не допуская вспенивания и насыщения воздухом. Для каждого посева берут новую стерильную пипетку. Пробирки с посевами охлаждают до температуры инкубирования и затем помещают в термостат, установленный на соответствующую температуру.

Для обеспечения оптимальных условий роста бактерий рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* осуществляют ограничение доступа кислорода по 8.1.3.

8.2.2 Если ожидается рост большого числа бифидобактерий при определении их количества, например, при проведении производственного контроля по [6], допускается осуществлять посев разведений, необходимых для подсчета, в два ряда пробирок по ГОСТ Р 52687.

8.3 Глубинный метод посева в плотные среды

8.3.1 Глубинный метод посева в плотные среды на чашки Петри

Соответствующие разведения анализируемого функционального пищевого продукта в количестве 1 $см^3$ вносят параллельно в две чашки Петри и заливают не позднее чем через 15 мин расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 2) °С предварительно регенерированной агаризованной питательной средой. Высота слоя питательной среды должна быть 4–5 мм.

Среду немедленно равномерно перемешивают с посевным материалом осторожными круговыми движениями чашки так, чтобы среда не выплескивалась из чашки. После застывания среды чашки с посевами переворачивают вверх дном и помещают в термостат, установленный на соответствующую температуру.

8.3.2 Глубинный метод посева в плотные среды в пробирки

Соответствующие разведения анализируемого функционального пищевого продукта в количестве 1 $см^3$ вносят параллельно в три ряда пробирок, содержащих плотную агаризованную среду, разлитую высоким столбиком в пробирки, как описано в 8.1.2.

Перед проведением анализа среду нагревают в кипящей водяной бане до полного расплавления агара и выдерживают в течение (25 ± 5) мин для снижения в ней растворенного кислорода. Затем пробирки охлаждают в водяной бане до температуры (45 ± 2) °С.

Внесение анализируемой пробы в питательную среду начинают с последнего разведения анализируемого функционального пищевого продукта, внося его по 1 $см^3$ в последнюю пробирку каждого из трех рядов питательной среды; затем таким же образом вносят по 1 $см^3$ предыдущих разведений — последовательно от большего к меньшему. Пипетку с отобранным разведением опускают до дна пробирки, а затем медленно поднимают вращательным движением, таким образом, чтобы тщательно перемешать разведенный продукт со средой, не допустить попадание воздуха и ограничить пристеночный рост. Пробирки с посевами охлаждают до застывания агара и затем проводят культивирование при температуре (37 ± 1) °С ограничением доступа кислорода.

8.4 Определение количества отдельных групп пробиотических микроорганизмов

8.4.1 Бактерии рода *Lactobacillus*

8.4.1.1 Для определения количества бактерий рода *Lactobacillus* в анализируемом функциональном пищевом продукте, его разведения, приготовленные согласно 7.4, высевают методом поверхностного посева по 8.1 в чашки Петри с плотной питательной средой МРС (MRS) или методом глубинного посева по 8.2 в пробирки с полужидкой питательной средой МРС (MRS). Для представителей гомоферментативных видов бактерий рода *Lactobacillus* допускается также осуществлять посев в стерильное обезжиренное молоко. Посевы инкубируют 72 ч при температуре (37 ± 1) °С с ограничением доступа кислорода.

8.4.1.2 Результаты оценивают по каждой пробе отдельно. Подсчет колоний проводят через 72 ч. Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 10 до 300 характерных колоний, или пробирки с тремя конечными разведениями, в которых наблюдают рост микроорганизмов. Харак-

теристика колоний приведена в приложении А. При посеве на стерильное молоко критерием роста является сворачивание молока.

8.4.1.3 Из выросших колоний на чашках или из трех последних разведений с признаками роста при посеве на полужидкую среду или стерильное молоко готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.2. Наличие каталазы определяют по 9.3, подвижность по 9.4.

При обнаружении специфичных для бактерий рода *Lactobacillus* неспорообразующих, грамположительных, неподвижных, каталазаотрицательных палочек, проводят подсчет числа или определение наиболее вероятного числа бактерий рода *Lactobacillus* по 10.

8.4.1.4 При необходимости для получения чистых культур из чашек и пробирок с признаками роста производят пересев на агаризованную среду МРС (MRS) так, чтобы получить рост изолированных колоний. Отбирают типичные колонии и пересевают их на среду МРС (MRS), инкубируют при температуре (37 ± 1) °С с ограничением доступа кислорода, после чего подвергают дальнейшему изучению по 9.5. При необходимости подтверждения принадлежности к роду *Lactobacillus* и/или дифференциации видов используют методы идентификации микроорганизмов с помощью биохимических диагностических тест-панелей промышленного производства, обеспечивающих получение профиля ферментации расширенного набора углеводов и аминокислот не менее чем по 49 тестам.

8.4.2 Бактерии рода *Bifidobacterium*

8.4.2.1 Для определения количества бактерий рода *Bifidobacterium* в анализируемом продукте разведения, приготовленные согласно 7.4, высевают методом глубинного посева в пробирки с одной из полужидких селективных питательных сред по 6.3.3.1 или в чашки Петри с одной из плотных селективных питательных сред по 6.3.3.2. Посевы инкубируют в анаэробных условиях при температуре (37 ± 1) °С в течение 72 ч.

Предварительный учет результатов проводят через 24–48 ч инкубирования, окончательный подсчет количества бактерий рода *Bifidobacterium* проводят через 72 ч культивирования.

Посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Bifidobacterium*, затем проводят подсчет всех типов выросших колоний. Характеристика колоний бифидобактерий и признаков роста на питательных средах приведена в приложении А.

Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний или пробирки с тремя конечными разведениями, в которых наблюдают характерный рост микроорганизмов. Для получения изолированных колоний производят пересев всех типов колоний, выросших на чашках Петри или в пробирках с полужидкими средами, в пробирки с неселективными средами для культивирования по 6.3.3.3, разлитыми высоким столбиком или чашки с агаризованными средами для бифидобактерий, приготовленными без добавления селективных агентов.

Если в посевах первой генерации в пробирках и на чашках имеются четко изолированные колонии, допускается их отбирать для дальнейшего изучения без рассева.

В случае диффузного недифференцированного роста в пробирках с полужидкими средами допускается производить пересев 1 $см^3$ культуральной жидкости в пробирки с полужидкими или на чашки с агаризованными селективными средами для бифидобактерий.

Посевы инкубируют в анаэробных условиях при 37 °С в течение 24–48 ч.

8.4.2.2 Подтверждение наличия бактерий рода *Bifidobacterium* методом микроскопирования

По окончании инкубации отбирают все типы изолированных колоний (из пробирок — пастеровской пипеткой, с чашек — бактериологической петлей), имеющие морфологическое сходство с колониями бактерий рода *Bifidobacterium* согласно приложению А.

Из выросших колоний готовят мазки-препараты, окрашивают по Граму, определяют наличие каталазы по 8.2.2. При обнаружении в препаратах клеток грамположительных палочек, неспорообразующих, прямых, изогнутых или разветвленных, *Y*- или *V*-образной формы, булавовидных; расположенных одиночно, цепочками, или скоплениями в виде «китайских иероглифов», и при отрицательном тесте на каталазу колонии относят к бактериям рода *Bifidobacterium* и проводят обработку результатов по 10.

При необходимости проводят дальнейшую идентификацию культур биохимическим методом и анализируют профиль ферментации углеводов и аминокислот по 9.4.

8.4.3 Бактерии рода Lactococcus и вида Streptococcus thermophilus

Для определения количества бактерий рода *Lactococcus* и бактерий вида *Streptococcus thermophilus* из анализируемого продукта отбирают пробу по 7.3 и готовят необходимые разведения по 7.4. Разведения высевают поверхностным по 8.1.1 или глубинным методом по 8.1.2 на чашки с одной из агаризованных сред, указанных в 6.3.4.

Засеянные чашки после застывания агара переворачивают вверх дном и помещают в термостат. Посевы инкубируют (72 ± 3) ч при температуре (30 ± 1) °С для определения бактерий рода *Lactococcus*, и (48 ± 3) ч при температуре (37 ± 1) °С для определения бактерий вида *Streptococcus thermophilus*. При наличии в продукции одновременно бактерий рода *Lactococcus* и бактерий вида *Streptococcus thermophilus*, параллельно делают 2 посева, используя питательную среду М-17, pH которой при посеве для определения бактерий рода *Lactococcus* должен быть установлен на уровне (7,2 ± 0,1) ед. pH при температуре 25 °С, а для определения бактерий вида *Streptococcus thermophilus* — на уровне (6,8 ± 0,1) ед. pH. Посевы инкубируют пять дней при температуре (20 ± 1) °С для определения бактерий рода *Lactococcus*, и (48 ± 3) ч при температуре (45 ± 1) °С для определения бактерии вида *Streptococcus thermophilus*.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Lactococcus* и бактерий вида *Streptococcus thermophilus*, затем проводят подсчет выросших колоний. Для подсчета колоний отбирают чашки Петри, на которых выросло от 10 до 300 характерных колоний. Характеристика колоний приведена в приложении А.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.2, наличие каталазы определяют по 9.3, подвижность определяют по 9.4.

При наличии в препаратах специфичных по морфологии клеток (грамположительных неспорообразующих кокков, расположенных парами, короткими или длинными цепочками), отрицательном тесте на каталазу, отрицательном тесте на подвижность колонии относят к *Lactococcus* или *Streptococcus thermophilus* и проводят обработку результатов по 10.

При необходимости отбирают культуры для дальнейшего изучения биохимическим методом по 9.5.

8.4.4 Бактерии рода *Propionibacterium*

Для определения количества бактерий рода *Propionibacterium* из анализируемого пищевого продукта отбирают пробу по 7.3 и готовят необходимые разведения по 7.4, высевают глубинным методом по 8.1.3 на питательные среды, указанные в 6.3.4.

Посевы для определения бактерий рода *Propionibacterium* инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–48 ч с ограничением доступа кислорода, предварительный подсчет колоний проводят через 24–27 ч.

Допускается при посеве на агаризованную питательную среду для определения бактерий рода *Propionibacterium* инкубировать посевы при температуре (30 ± 1) °С в течение 72 ч.

После инкубирования посевы просматривают и отмечают рост колоний, характерных для бактерий рода *Propionibacterium*. Характеристика колоний приведена в приложении А.

Из выросших колоний готовят препараты, окрашивают по Граму по 9.2. Наличие каталазы определяют по 9.3, подвижность по 9.4.

Результаты оценивают визуально по каждой пробе отдельно. При наличии в посевах каталазоположительных, неспорообразующих, грамположительных, неподвижных палочек, располагающихся поодиночке, парами, в виде букв *V* или *Y*, короткими цепочками или группами в виде «китайских иероглифов», проводят обработку результатов по 10.

При необходимости отбирают культуры для дальнейшего изучения биохимическим методом по 9.5.

9 Методы идентификации пробиотических микроорганизмов

9.1 В процессе идентификации определяются основные фенотипические признаки чистой культуры штамма: культуральные свойства колоний, морфология клеток в микроскопических препаратах, отношение к окраске по Граму, способность к спорообразованию, а также каталазная активность при использовании общепринятых в микробиологии методов анализа, для чего культуру микроорганизма выделяют в чистом виде.

Чистую культуру штамма выделяют на питательной среде, предназначенной для данного вида микроорганизма, позволяющей получать изолированные колонии. Культивирование изолятов бактерий рода *Lactobacillus* осуществляется на среде МРС (MRS), бактерий рода *Streptococcus* и *Lactococcus* — среде типа М-17 или среде Ли (Lee), бактерий рода *Bifidobacterium* — среде Блаурокка, тиогликолевой, гидролизатно-молочной, кукурузно-лактозной, Бифидум-среде, среде МРС (MRS) с диклоксациллином, TOS-MUP-агаре.

Описание характерных культуральных признаков роста пробиотических микроорганизмов на питательных средах приведено в приложении А.

9.2 Окрашивание по Граму

Приготовление мазков-препаратов и окрашивание проводят по ГОСТ ISO 7218.

9.3 Проба на каталазу

9.3.1 Определение каталазной активности микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах

На предметное стекло наносят отдельно две капли раствора перекиси водорода с массовой долей 3 % (1:10 по объему). Отделяют колонию от среды стерильным стеклом или пластиковой палочкой (но не металлической иглой) и осторожно суспендируют ее в одной из капель. Немедленно, а также через несколько минут (но не менее одной минуты) отмечают отсутствие или образование пузырьков кислорода. В сомнительном случае покрывают обе капли предметным стеклом и сравнивают наличие пузырьков в обеих каплях. Наблюдение проводят визуально или с помощью микроскопа при малом увеличении.

9.3.2 Определение каталазной активности микроорганизмов, выросших на жидких (в стерильном молоке) и полужидких питательных средах

Из посевов отбирают 2-3 $см^3$ культуральной жидкости, переносят ее в пробирку и нейтрализуют 10%-ным раствором гидроокиси натрия или соляной кислоты, приготовленных по ГОСТ 10444.1. Одну-две капли нейтрализованной культуральной жидкости пипеткой переносят на предметное стекло и после выдержки на воздухе в течение 30 мин добавляют к ней каплю 3 %-ного раствора перекиси водорода.

Если в посевах обнаружены газообразующие микроорганизмы, то при определении их каталазной активности ставят контрольную пробу аналогично пробе на каталазу, но без добавления перекиси водорода. В данном случае газообразующие микроорганизмы относят к каталазаположительным при отсутствии пузырьков газа в контрольной пробе или при явно повышенном газообразовании в пробе с перекисью водорода по сравнению с контрольной пробой.

9.4 Определение подвижности

Определение подвижности микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах, проводят по ГОСТ 10444.11.

9.5 Биохимические исследования фенотипических свойств штаммов

9.5.1 Исследования проводят при необходимости подтверждения принадлежности к роду и дифференциации видов пробиотических микроорганизмов с помощью биохимических диагностических тест-панелей (планшет) одноразового использования промышленного производства по ГОСТ ISO 7218.

Каждую партию тест-панелей контролируют при использовании чистых культур типовых штаммов пробиотических микроорганизмов — типичных представителей родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, а также штаммов вида *Streptococcus thermophilus*.

9.5.2 Из чистых 18–24-часовых культур анализируемых пробиотических микроорганизмов асептично готовят суспензию в прилагаемом разбавителе, входящим в набор диагностической тест-панели, тщательно гомогенизируют и доводят до определенной мутности по шкале МакФарланда прилагаемых стандартов (в соответствии с инструкцией) в зависимости от вида анализируемого штамма. Неправильно приготовленная суспензия (слишком густая или очень жидкая) может привести к получению ложных результатов.

При необходимости параллельно суспензию тестируемого штамма и контрольного штамма высевают на питательные среды для проверки чистоты культуры, ее ростовых свойств и/или постановки дополнительных тестов.

Планшет для идентификации извлекают из упаковки и на прилагаемом к планшету бланке регистрируют номер анализируемого штамма.

Суспензию бактерий тщательно перемешивают круговыми движениями и в каждую лунку инокулируют определенный объем суспензии (0,1–0,2 $см^3$) в зависимости от требований фирмы-изготовителя и вида анализируемого штамма.

При необходимости после инокуляции для создания анаэробных условий в лунки вносят стерильное вазелиновое масло, полностью закрывая внесенную суспензию бактериальных клеток.

После инокуляции планшет накрывают крышкой и инкубируют 5–24 ч при оптимальной температуре и атмосфере для анализируемого вида микроорганизмов.

По окончании инкубации результаты учитывают визуально, отмечая цвет каждой лунки, и заносят в прилагаемые бланки. При необходимости вносят реактивы для проявления анализируемого признака. Учет результатов на бета-галактозидазу проводят дважды: через 3–5 ч и через 18–24 ч.

Интерпретацию результатов для определения родовой и видовой принадлежности анализируемого штамма проводят с помощью таблиц, книг-каталогов кодов, компьютерного обеспечения соответствующих фирм-изготовителей.

9.5.3 При получении вариабельных результатов тестов идентификации необходимо проверить стабильность биохимических свойств пробиотических микроорганизмов методом пассирования микроорганизма на жидких и плотных питательных средах (3–5 пассажей) и дальнейшим трехкратным тестированием на тест-панелях. Трехкратное совпадение всех исследованных биохимических реакций, выявленное после пассирования культур, будет свидетельствовать о стабильности фенотипических признаков, как указано в [7], [8].

Вариабельность результатов свидетельствует о нестабильности фенотипических признаков у пробиотического микроорганизма.

9.5.4 Для ориентировочной идентификации видовой принадлежности бифидобактерий допускается применение тест-систем промышленного изготовления. Для тестирования бифидобактерий предпочтительно использовать параллельно не менее двух наборов тест-панелей по 5.3. Ферментативные свойства бифидобактерий, наиболее часто используемых при производстве функциональных пищевых продуктов (*B. bifidum*, *B.longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. adolescentis, B. animalis*), приведены в приложении Б.

10 Обработка результатов

10.1 Окончательный подсчет числа КОЕ или количества клеток пробиотических микроорганизмов в 1,0 см^3 (г) анализируемого функционального пищевого продукта проводят после подтверждения принадлежности выросших колоний к искомому виду пробиотических микроорганизмов на основе изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств.

10.2 Подсчет количества пробиотических микроорганизмов, выросших на плотных агаризованных средах на чашках Петри

Подсчитывают количество характерных колоний на каждой чашке Петри. Для подсчета используют чашки, на которых выросло от 10 до 300 колоний. Выросшие колонии пробиотических микроорганизмов просматривают в проходящем свете. Для ускорения подсчета можно использовать специальное оборудование для подсчета колоний.

Подсчет производят путем умножения числа выросших колоний на чашке на соответствующее разведение. При поверхностном посеве дополнительно учитывают объем инокулята, внесенный на чашку, используя коэффициент ×5 (коэффициент пересчета на 1 см^3 суспензии при посеве 0,2 см^3). При глубинном посеве коэффициент ×5 при расчете не применяют.

Количество N пробиотических микроорганизмов при подсчете на двух параллельных чашках Петри, КОЕ/см^3 (г), вычисляют по формуле

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

где C — сумма колоний микроорганизма, подсчитанных на соответствующих чашках;

k — коэффициент пересчета на 1 см^3 разведения суспензии, при посеве 0,2 см^3 на чашку $k = 5$;

n_1 — количество чашек, подсчитанных в самом низком разведении;

n_2 — количество чашек, подсчитанных в самом высоком разведении;

d — величина самого низкого разведения, взятого для подсчета (например, при проведении подсчета в шестом и седьмом разведениях, $d = 10^{-6}$).

10.3 Подсчет количества пробиотических микроорганизмов, выросших на полужидких средах в пробирках

Подсчитывают количество характерных колоний в каждой пробирке. Для подсчета используют пробирки с последними разведениями, в которых присутствует от 3 до 10 типичных колоний.

Количество пробиотических микроорганизмов (КОЕ в 1 г/см^3) функционального пищевого продукта N, вычисляют по формуле

$$N = C \cdot 10^n, \quad (2)$$

где C — среднее количество колоний микроорганизма в последнем разведении продукта, засеянном в двух рядах;

n — показатель последнего разведения продукта, в котором отмечен рост;

10 — коэффициент кратности разведения продукта.

10.3.1 Подсчет наиболее вероятного числа пробиотических микроорганизмов в пробирках

Для подсчета наиболее вероятного числа (НВЧ) пробиотических микроорганизмов в 1 г или 1 см^3 продукта при посеве в жидкие или полужидкие среды в пробирках используют таблицу и указания к таблице по ГОСТ 26670.

10.3.2 Подсчет количества бифидобактерий в 1 г или 1 см^3 при посеве в два ряда пробирок по 8.1.2.2 осуществляют по ГОСТ Р 52687.

Приложение А
(обязательное)

Признаки роста пробиотических микроорганизмов на питательных средах

А.1 Признаки роста пробиотических микроорганизмов на питательных средах приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Микроорганизм	Питательная среда	Характеристика колоний на плотных/полужидких средах или характер роста на жидкой среде
Бактерии рода *Lactobacillus*	МРС (MRS) -агар	Колонии мелкие, диаметром 1–3 мм, гладкие или зернистые, плоские или слегка выпуклые, бесцветные или слабо пигментированные. При глубинном посеве колонии могут быть в форме «птичек», «лодочек»
	МРС (MRS) -бульон	Помутнение среды, образование осадка, пристеночный рост
Бактерии рода *Bifidobacterium*	Среды Блаурокка и кукурузно-лактозный агар	Колонии от белого и серого до темно-коричневого цвета, в виде крупинок, гречишных зерен, гвоздиков или дисков, иногда комето- или веретенообразные
	Тиогликолевая среда	Кометы, гвоздики, шарики, иголочки различной длины и конфигурации
	МРС (MRS) – агар с диклоксациллином	Колонии небольшого размера — от 1 до 3 мм, молочно-белые, блестящие с серым или бежевым оттенком. Встречаются прозрачные, неокрашенные колонии
	TOS-MUP агар	Белые колонии диаметром 1–4 мм с запахом уксусной кислоты. Морфология — от чечевицеобразных до круглых колоний в агаре и от звездообразных до клевероподобных колоний на поверхности агара
Термофильные молочнокислые стрептококки (*S. thermophilus*)	М-17	Чечевицеобразные колонии диаметром 1–2 мм
	Среда Ли (Lee)	Колонии желтые, круглые или эллипсовидные, вокруг которых наблюдаются зоны просветления
Бактерии рода *Lactococcus*	М-17	Бесцветные, мелкие, круглые, точечные колонии
Бактерии рода *Propionibacterium*	Кукурузно-лактозный агар	Мелкие, выпуклые полупрозрачные блестящие колонии белого, серого, розового, красного, желтого или оранжевого цвета
	Агаризованная питательная среда для определения бактерий рода *Propionibacterium*	Колонии в виде крупных дисков или гречишных зерен, обычно светло-кремового цвета. Колонии могут быть белыми, серыми, розовыми, красными, желтыми или оранжевыми

Приложение Б
(справочное)

Характерные ферментативные реакции для штаммов бифидобактерий, наиболее часто используемых при производстве функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами

Б.1 Характерные ферментативные реакции для штаммов бифидобактерий, наиболее часто используемых при производстве функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, обогащенных пробиотическими микроорганизмами приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Активный ингредиент	API 50 CHL						ANAEROtest-23					
	B. bifdum 791	*B. longum B* 379 M	*B. breve* 79-88	*B. infantis* 73-15	*B. adolescentis* ГО-13	*B. animalis*	*B. bifdum* 791	*B. longum B* 379 M	*B. breve* 79-88	*B. infantis* 73-15	*B. adolescenti* ГО-13	*B. animalis*
L-рамноза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Дульцитол	0	0	0	0	0	н/о	0	0	0	0	0	н/о
Эритрол	0	0	0	0	0	н/о	0	0	0	0	0	н/о
D-галактоза	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	±
D-глюкоза	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-фруктоза	+	±	+	0	+	±	+	+	+	0	+	±
D-лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-сахароза	0	±	±	0	0	+	0	+	+	0	+	+
D-мальтоза	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+
D-мелибиоза	0	+	+	+	+	+	Нет в тест-системе					
D-раффиноза	0	+	+	+	0	+	±	+	+	+	+	+
L-арабиноза	0	+	0	0	+	±	±	+	0	±	±	±
D-ксилоза	0	+	0	±	0	±	±	0	±	±	±	±
Салицин	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0	±
D-целлобиоза	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
D-манноза	0	0	н/о	0	0	±	0	0	+	0	0	±
D-трегалоза	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	+	0
D-мелецитоза	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	+	±
Инулин	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-маннит	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0
D-сорбитол	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0
Инозит	0	0	0	0	0	н/о	0	0	0	0	0	н/о

Примечание — В данной таблице приведены следующие обозначения:
«+» — положительная;
«0» – отрицательная;
«±» — вариабельная, слабая, с задержкой или непостоянная реакция одного и того же штамма или близких штаммов;
«н/о» — не определено.

Библиография

[1] ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции», принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67

[2] ТР ТС 021/2011 Технический регламент таможенного союза «О безопасности пищевой продукции», утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 г. № 880

[3] Стандарты мутности МакФарланда. Регистрационное удостоверение номер ФСЗ 2011/10309 , зарегистрированное Росздравнадзором 02.08.2011

[4] Стандарты мутности МакФарланда. Регистрационное удостоверение номер РЗН 2013/543, зарегистрированное Росздравнадзором 12.08.2013

[5] СП 1.3.2322–08 Санитарно-эпидемиологические правила. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней, утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 28.01.2008 г.

[6] МР 2.3.2.2327–08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов), утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 07.02.2008 г.

[7] МУ 2.3.2.1830–2004 Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов, утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 09.01.2004 г.

[8] МУ 2.3.2.2789–2010 Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов, утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 06.12.2010 г.

УДК 579.67:006.354 ОКС 67.220.20
67.050 Н59

Ключевые слова: функциональные пищевые продукты, биологически активные добавки к пище, пробиотические микроорганизмы, бактерии рода *Lactobacillus*, бактерии рода *Bifidobacterium*, бактерии рода *Propionibacterium*, бактерии рода *Lactococcus*, бактерии вида *Streptococcus thermophilus*, методы определения и подсчета количества пробиотических микроорганизмов

Подписано в печать 03.03.2015. Формат 60х84⅛.
Усл. печ. л. 3,26. Тираж 31 экз. Зак. 1098

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

ОКС 67.220.20
67.050

Изменение № 1 ГОСТ Р 56139—2014 Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28.01.2020 № 12-ст

Дата введения — 2020—04—01

Титульный лист, первая страница. Наименование стандарта после слов **«Продукты пищевые»** дополнить словами: **«специализированные и»**.

Первая страница. Наименование стандарта на английском языке. Заменить слова: «Functional foods» на «Functional foods and foods for special dietary uses».

Содержание. Приложение Б. Наименование после слов «при производстве» дополнить словами: «специализированных и».

Раздел 1 после слов «распространяется на» дополнить словами: **«специализированные и»**.

Раздел 2 изложить в новой редакции:

«В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 490 Добавки пищевые. Кислота молочная Е270. Технические условия

ГОСТ 975 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2156 Натрий двууглекислый. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4159 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4232 Реактивы. Калий йодистый. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6687.0 Продукция безалкогольной промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 10444.1 Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

ГОСТ 10444.11 (ISO 15214:1998) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества мезофильных молочнокислых микроорганизмов

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13646 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 15113.0 Концентраты пищевые. Правила приемки, отбор и подготовка проб

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 19908 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

ГОСТ 21239 (ИСО 7741—86) Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 21240 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 22280 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23932 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 24363 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 25706 Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26670 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов

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

ГОСТ 26809.2 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 27987 Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия

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

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

ГОСТ 31598 (EN 285:1996) Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31725 Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 32901 Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа

ГОСТ 33491 Продукты кисломолочные, обогащенные бифидобактериями бифидум. Технические условия

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO 29981 Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37°С

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 57233 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р ЕН 13060 Стерилизаторы паровые малые

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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку».

Раздел 4. Первый абзац после слов «на высеве» дополнить словами: «специализированных и»;

второй абзац после слов «содержания в» дополнить словами: «специализированных и».

Подраздел 5.1. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 51935» на «ГОСТ 31598».

Подраздел 5.3. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 51652» на «ГОСТ 5962»; исключить слова: «Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300».

Подраздел 6.1. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 53430» на «ГОСТ 32901».

Пункт 6.2.3. Третий абзац после слова «разведений» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 6.2.4. Второй абзац после слова «разведений» дополнить словами: «специализированных и».

Подпункты 6.3.3.1, 6.3.3.3, 6.3.5.1. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 52687» на «ГОСТ 33491».

Подраздел 7.3. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 53430» на «ГОСТ 32901».

Пункт 7.3.1. Второй абзац после слова «наименований» дополнить словами: «специализированных и»; заменить ссылки: «ГОСТ 26809» на «ГОСТ 26809.1», «ГОСТ 28495» на «ГОСТ Р 57233»; дополнить ссылкой: «ГОСТ 26809.2».

Пункт 7.3.2 после слова «жидкие» дополнить словами: «специализированные и»; после слов «Перед вскрытием поверхность упаковки» дополнить словами: «специализированного и»; после слов «проплавленными инструментами.» дополнить словами: «Специализированный и».

Пункт 7.3.3 после слов «и сухих», «для жидких» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 7.3.4 после слова «твердые» дополнить словами: «специализированные и».

Пункт 7.3.5. Первый абзац после слов «и пастообразных», «сухих» дополнить словами: «специализированных и»;

второй абзац. Заменить слова: «функционального пищевого» на «исследуемого».

Пункт 7.3.6 после слова «многокомпонентных» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 7.3.9 после слова «Нейтрализацию» дополнить словами: «специализированных и».

Пункты 7.4.3, 7.4.4 после слов «При анализе» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 7.4.5 после слов «десятикратные разведения», «по 1 $см^3$ предыдущего разведения» дополнить словами: «специализированного и».

Пункт 7.4.6. Примечание к таблице 1. После слов «микроорганизмов в» дополнить словами: «специализированных и».

Пункт 8.2.1. Исключить слова: «функционального пищевого» (2 раза); заменить слово: «Анализируемую» на «Исследуемую».

Пункт 8.2.2. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 52687» на «ГОСТ 33491».

Пункт 8.3.1. Первый абзац. Исключить слова: «функционального пищевого».

Пункт 8.3.2. Первый и третий абзацы. Исключить слова: «функционального пищевого».

Подпункт 8.4.1.1. Исключить слова: «функциональном пищевом».

Пункт 9.5.4 после слов «при производстве» дополнить словами: «специализированных и».

Подраздел 10.1. Исключить слово: «функционального».

Подраздел 10.3. Второй абзац изложить в новой редакции:

«Количество пробиотических микроорганизмов (КОЕ в 1 $г/см^3$), содержащихся в анализируемом пищевом продукте *N*, вычисляют по формуле».

Пункт 10.3.2. Заменить ссылку: «ГОСТ Р 52687» на «ГОСТ 33491».

Приложение Б. Наименование после слов «**при производстве**» дополнить словами: «**специализированных и**»;

пункт Б.1 после слов «при производстве» дополнить словами: «специализированных и».

Код ОКС. Заменить: «67.220.20» на «67.040».

Ключевые слова. Заменить слово: «функциональные» на «специализированные и функциональные».

(ИУС № 4 2020 г.)

gost.e-ecolog.ru