МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 29981— 2013

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ

Подсчет презумптивных бифидобактерий

Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

(ISO 29981:2010, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. № 61-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
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1708-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 29981—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 29981:2010 Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria — Colony count technique at 37 °C (Продукты молочные. Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С).

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ИСО/ТК 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальных (государственных) органах по стандартизации указанных выше государств.

Степень соответствия — идентичная IDT

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

© Стандартинформ, 2014

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 метода 2
5 Питательные среды, разбавители и реактивы 3
6 Оборудование 4
7 Отбор проб 5
8 Проведение анализа 5
9 Расчет и обработка результатов 7
10 Прецизионность 8
11 Квалификация при применении данного метода 11
12 Протокол испытаний 11
Приложение А (справочное) Межлабораторное испытание 12
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам 13
Библиография 14

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ МОЛОЧНЫЕ

Подсчет презумптивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37 °С

Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria. Colony count technique at 37 °C

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод селективного подсчета презумптивных бифидобактерий в молочных продуктах, используя технику подсчета колоний при температуре 37 °С в анаэробных условиях.

Данный метод применим к молочным продуктам, к ферментированным и неферментированным продуктам, сухому молоку, детским молочным смесям и закваскам, к тем продуктам, где рассматриваемые микроорганизмы жизнеспособны и присутствуют наряду с другими молочнокислыми бактериями. (Критерии качества молочных продуктов [6].)

Бифидобактерии, используемые в молочных продуктах, относятся к следующим видам ([7], [8], [16]):

a) Bifidobacterium adolescentis;
b) B. animalis subsp. *animalis;*
c) B. animalis subsp. *lactis;*
d) B. bifidum;
e) B. breve;
f) B. infantis;
g) B. longum.

2 Нормативные ссылки

Приведенные ниже ссылочные нормативные документы являются обязательными для применения настоящего стандарта. Датированные ссылки предполагают возможность использования только указанного издания документа. В случае недатированных ссылок используют последнее издание документа, включая любые изменения.

ISO 6887-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений)

ISO 6887-5 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 5. Специальные правила для приготовления молока и молочных продуктов)

Издание официальное

ISO 7218 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям)

ISO 7889|IDF 117 Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony-count technique at 37 °C (Йогурт. Подсчет характеристических микроорганизмов. Метод определения количества колоний при 37 °С)

ISO/TS 11133-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории)

ISO 14461-1|IDF 169-1 Milk and milk products — Quality control in microbiological laboratories — Part 1: Analyst performance assessment for colony counts (Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка работы аналитика при подсчете числа колоний)

ISO 14461-2|IDF 169-2 Milk and milk products — Quality control in microbiological laboratories — Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps (Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчета числа колоний при посеве на параллельных чашках Петри с последующими стадиями разведений)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **бифидобактерии** (bifidobacterium): анаэробные микроорганизмы, которые образуют колонии двояковыпуклой или круглой формы белесого цвета, частично в форме звездочки или трехлопастной формы диаметром от 1 мм до 4 мм на питательной среде, приготовленной на основе олигосахаридов, обработанных трансгалактозой с добавлением литиевой соли мупироцина (TOS-MUP), в условиях, установленных в настоящем стандарте.

4 Сущность метода

4.1 Антибиотик, литиевая соль мупироцина (MUP), подавляет рост большинства молочнокислых бактерий, обычно используемых в ферментированных и неферментированных молочных продуктах.

Благодаря доказанной избирательности антибиотика MUP при добавлении его в питательную среду обычно не происходит роста типичных йогуртовых бактерий (*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), мезофильных культур (например, *Lactococcus lactis*), *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* и *Lactobacillus rhamnosus* на установленной среде.

Это свойство протестировано на репрезентативном количестве контрольных штаммов и выделенных культур.

Среда TOS-на агаре способствует росту бифидобактерий, используемых в молочных продуктах [17].

Примечания

1 Фазово-контрастная микроскопия с применением 100-кратного увеличения и масляной иммерсии показывает палочки очень разнообразных форм, обычно искривленные и с утолщениями, зачастую ветвистые, растущие по отдельности, парами, группами, располагающиеся клином (V-образная форма расположения колоний), цепочками, столбиками из параллельно расположенных клеток или розетками, порою демонстрирующими форму набухшей сферы (кокка).

2 Бифидобактерии не являются кислотоустойчивыми, спорообразующими микроорганизмами, они — грамположительные, немобильные и каталаза-отрицательные хемоорганотрофы, которые выделяют уксусную кислоту и молочную кислоту. Глюкоза разлагается полностью и характерным образом посредством фруктоза-6-фосфатного шунта, в котором фруктоза-6-фосфат-фосфокетолаза (F6PPK, ЕС 4.1.2.22) расщепляет фруктоза-6-фосфат на ацетилфосфат и эритроза-4-фосфат.

3 Температура оптимального роста находится в интервале от 37 °С до 41 °С. Дополнительная информация приведена в [9].

4.2 Посев десятичных разведений однородной пробы в TOS-агар с добавлением MUP, с использованием чашечного метода, с последующей анаэробной инкубацией при температуре 37 °С в течение 72 ч.

4.3 Подсчет колоний

Примечание — Выбранные культуры из чашек можно подтвердить соответствующими тестами по [14], [15].

4.4 Количество бифидобактерий в грамме пробы рассчитывают по числу колоний, полученных в чашках с разведениями такой концентрации, чтобы получить значимый результат.

5 Питательные среды, разбавители и реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний, и дистиллированную или деминерализованную воду, или воду равноценной чистоты.

5.1 Основные материалы

Основные материалы — по ISO 6887-5 и ISO/TS 11133-1.

5.2 Разбавители

Приготовление разбавителей — по ISO 6887-5.

Чтобы обеспечить сопоставимость результатов в установленных колониеобразующих единицах (КОЕ), соблюдают следующие правила.

Используют раствор Рингера (Ringer's) с 1/4 концентрации или любой другой подходящий разбавитель, установленный в ISO 6887-5 и подтвержденный как эквивалентный.

Стерилизуют и используют подходящий стерильный дозатор.

Доводят разбавитель до температуры (22 ± 2) °С. Переносят разбавитель стеканием каплями, не захватывая воздух.

Неопределенность измерения используемых объемов должна соответствовать требованиям ISO 6887-1.

5.3 Питательная среда (среда TOS-MUP)

Используют свежеприготовленную среду на основе обработанных трансгалактозой олигосахаридов с добавлением литиевой соли мупироцина (TOS-MUP), защищенную от прямого солнечного света.

5.3.1 Основная среда (среда TOS-пропионат на агаре [10])

5.3.1.1 Состав:

пептон триптиказа — 10,0 г;

дрожжевой экстракт — 1,0 г;

KH_2PO_4 — 3,0 г;

K_2HPO_4 — 4,8 г;

$(NH_4)_2SO_4$ — 3,0 г;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2 г;

(R)-Цистеин · HCl · H_2O — 0,5 г;

пропионат натрия — 15,0 г;

TOS (см. 5.3.1.2) — 10,0 г;

агар-агар — 15,0 г;

вода — 950 $см^3$.

5.3.1.2 Смесь олигосахаридов — трансгалактозы

Смесь TOS получают ферментативным гидролизом лактозы, используя β-галактозидазу *Aspergillus oryceae*. Смесь TOS содержит галактозу (Gal) и глюкозу (Glc), вычисляемых по формуле

$$[\mathrm{Gal} \xrightarrow{x} (\mathrm{Gal})_n \xrightarrow{y} \mathrm{Glc}], \qquad (1)$$

где $n = 1 \ldots 4$;

$x = \beta - 1,6 > \beta - 1,4$ и $\beta - 1,3$;

$y = \beta - 1,4 >> \beta - 1,3$ и $\beta - 1,6$.

Смесь TOS очищают с помощью хроматографии в определенных условиях по [18], [19]. Общее содержание сахара (> 97 % по массе) включает определенную часть три-, тетра-, пента- и гексасахаридов. (Изменение соотношения олигосахаридов не оказывает заметного влияния на потенциал среды.)

5.3.1.3 Приготовление

Суспендируют ингредиенты в 950 $см^3$ воды при осторожном нагревании (например, на нагревательной плитке или водяной бане) при частом помешивании до полного растворения.

Распределяют по склянкам вместимостью 250 см^3 по 190 см^3 в каждую. Регулируют pH (6.6), при необходимости, так чтобы после обработки в автоклаве установился pH на уровне 6,3 ± 0,2 единиц при температуре 25 °С.

Обрабатывают в автоклаве основную среду при температуре 115 °С в течение 15 мин.

Если среду не используют сразу, то ее охлаждают. Хранят среду при температуре от 2 °С до 4 °С не более одной недели в условиях, не вызывающих изменения состава среды.

Среда TOS чувствительна к теплу, поэтому избыточная тепловая обработка может отрицательно сказаться на свойствах среды. Полные среды TOS-пропионат имеются в продаже и имеют состав, соответствующий настоящему стандарту. Если среду готовят в лаборатории, то результаты могут существенно отличаться для сред, приготовленных в разное время. Поэтому среды рекомендуется подтверждать, чтобы убедиться, что рост бифидобактерий, указанный в единицах КОЕ, остается на сопоставимом уровне (см. также ISO/TS 11133-1).

5.3.2 Вспомогательный раствор MUP [11]

Непосредственно перед применением, растворяют, например, 50 мг MUP в 50 см^3 воды или другие количества в тех же пропорциях. Стерилизуют полученный раствор фильтрацией через мембрану (размер пор 0,22 мкм) в соответствии с 5.3.3.

5.3.3 Полная среда

Непосредственно перед применением расплавляют порции по 190 см^3 приготовленной основной среды (5.3.1) с помощью пара или аналогичным способом. Охлаждают на водяной бане (6.5) до температуры (48 ± 1) °С. Добавляют 10 см^3 вспомогательного раствора MUP (5.3.2) в каждую склянку шприцем, оснащенным стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм (6.11) незадолго до разливки. Тщательно перемешивают, без образования пузырьков воздуха.

Снова помещают полную среду на водяную баню (6.5) при температуре 48 °С и держат, пока она не будет готова к разливке.

Полная среда TOS-MUP должна иметь конечную концентрацию MUP, равную 50 мг/дм^3.

6 Оборудование

Стерилизация оборудования, которое контактирует с анализируемой пробой, разбавителем, разведениями или питательной средой, должна осуществляться в соответствии с требованиями ISO 6887-5, а также ISO/TS 11133-1. Стеклянная посуда должна выдерживать многократную стерилизацию.

Используют оборудование микробиологических лабораторий (ISO 7218), для приготовления проб для анализа и разведений, в соответствии с требованиями ISO 6887-5.

6.1 Оборудование для инкубирования (термостатирования), обычно применяемые сосуды, или анаэробный инкубатор

6.1.1 Инкубатор (термостат), обеспечивающий поддержание температуры (37 ± 1) °С.

6.1.2 Анаэробные культуральные склянки, обеспечивающие поддержание анаэробной атмосферы, содержащей от 10 % до 20 % диоксида углерода по массе; приблизительно от 70 % до 90 % азота по объему и приблизительно 10 % водорода по объему (необязательно). Газовая смесь не должна содержать более 1 % кислорода по объему.

Допускается применять другие безопасные низкотемпературные каталитические системы.

6.1.3 Анаэробный инкубатор, поддерживающий температуру на уровне (37 ± 1) °С, обеспечивая анаэробную атмосферу (см. 6.1.2).

6.2 Механическая мешалка, обеспечивающая перемешивание содержимого пробирок, например вихревой смеситель.

6.3 Оборудование для подсчета колоний, в соответствии с ISO 7218.

6.4 Лупа, от 8- до 10-кратного увеличения.

6.5 Водяные бани, обеспечивающие поддержание температур (20 ± 1) °С, (45 ± 1) °С, (48 ± 1) °С.

6.6 pH-метр, с температурной компенсацией, точностью до ±0,1 pH при температуре 25 °С.

6.7 Колбы и склянки, вместимостью 250 см^3 с плотными пробками или крышками (для помещения питательной среды и приготовления начального разведения анализируемой пробы).

6.8 Пробирки, высотой порядка 150 см^3 и диаметром примерно 15 мм с подходящими крышками.

6.9 Мерные пипетки, для бактериологических исследований, стерилизованные и калиброванные до кончика, обеспечивающие подачу (1 ± 0,02) см^3 и (10 ± 0,2) см^3 (ISO 6887-1), соответственно, по [20], класс А.

6.10 Чашки Петри, из прозрачного неокрашенного стекла или пластика, диаметром 90 мм и минимальной внутренней глубины 10 мм. На дне не должно быть неровностей, которые могли бы помешать подсчету колоний.

6.11 Стерилизационная аппаратура, для стерилизации фильтрованием, шприц вместимостью 10 см^3, оснащенный стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм.

6.12 Автоклав, обеспечивающий поддержание температуры на уровне (115 ± 3) °С с короткими циклами нагревания-охлаждения.

7 Отбор проб

Необходимо, чтобы проба, поступающая в лабораторию, была представительной и не была испорчена при транспортировании или хранении.

Отбор проб не входит в метод, установленный в настоящем стандарте. Рекомендованный метод отбора проб — по [1].

8 Проведение анализа

8.1 Общие положения

Следующие процедуры основаны на соответствующих стандартах с учетом рекомендаций [8], [12].

Выполняют процедуры, описанные в 8.2—8.5, при осторожном помешивании, избегая образования или захвата воздушных пузырьков и защищая от прямого солнечного света.

Прежде чем открыть контейнер с пробой, необходимо очистить поверхность вокруг зоны, в которой будут извлекать пробу, чтобы удалить материал, который может загрязнить пробу. Например, протирают стол 70 %-ным (по объему) этанолом, чтобы предотвратить загрязнение. Контейнер открывают, соблюдая правила асептики.

8.2 Подготовка пробы для анализа и первичное разведение

8.2.1 Сухие молочные продукты, сухие молочные смеси для детского питания

Выполняют процедуры a)—i) (ISO 6887-5).

a) Тщательно перемешивают содержимое закрытой упаковки, встряхивая и переворачивая ее несколько раз.

b) Открывают упаковку, извлекают требуемую порцию стерильным шпателем и переходят к следующему. Сразу же закрывают пакет. Рекомендуется использовать воздухонепроницаемый зажим и помещать пакет внутрь герметично закрывающегося стеклянного сосуда для хранения при 4 °С.

c) Берут навеску (90 ± 0,1) г разбавителя и помещают в каждую из предварительно стерилизованных склянок вместимостью 250 см^3 (6.7). Склянки закрывают.

d) Нагревают склянки вместимостью 250 см^3, содержащие 90 г разбавителя на водяной бане (6.5) при температуре 45 °С.

e) Берут навеску пробы с точностью 0,05 г массой (10 ± 0,1) г. Добавляют навеску в разбавитель в каждую склянку при температуре 45 °С. В другом варианте берут навеску пробы массой 10 г непосредственно в склянку с разбавителем при температуре 45 °С.

f) Чтобы растворить пробу для анализа, медленно помешивают склянку круговыми движениями, чтобы смочить порошок. Затем встряхивают склянку 10 раз движением с амплитудой 300 мм за 7 с.

g) Помещают склянки на водяную баню (6.5) при температуре 45 °С в течение 5 мин, периодически их встряхивая.

h) Сразу же охлаждают склянки в струе водопроводной воды, встряхивая в течение 2 мин. Быстро доводят до комнатной температуры. Например, на водяной бане (6.5) при температуре 20 °С.

i) Исследование начинают незамедлительно (8.5).

ВНИМАНИЕ — Чтобы получить приемлемую повторяемость метода, необходимо строго следовать процедурам, установленным в a)—i).

8.2.2 Пробиотический йогурт или аналогичные йогуртам продукты

Переходят к процедурам a)—g) (ISO 7889|IDF 117).

a) Доводят разбавитель до комнатной температуры.

b) Берут навеску разбавителя массой (90 ± 0,1) г в каждую из предварительно стерилизованных склянок (6.7) вместимостью 250 см^3. Склянки закрывают.

c) Тщательно перемешивают содержимое закрытой упаковки пробы многократным встряхиванием и переворачиванием (предпочтительно 10 раз, движением амплитудой 300 мм в течение 7 с), или тщательно перемешивают содержимое стерильным шпателем или чем-либо подобным, после того как упаковка открыта, чтобы получить гомогенную пробу.

d) Открывают упаковку, извлекают требуемое количество пробы стерильным шпателем или пипеткой и переходят к следующему.

e) Берут навеску пробы с точностью 0,05 г массой (10 ± 0,1) г. Добавляют навеску к разбавителю в каждую склянку.

f) Встряхивают склянку 10 раз, движением с амплитудой 300 мм в течение приблизительно 7 с.

g) Исследование начинают незамедлительно (8.5).

После приготовления первичного разведения (суспензия пробы — 1-е десятичное разведение, D1; 100 см^3) немедленно готовят следующие разведения.

8.3 Исследование под микроскопом

Выполняют предварительное исследование под микроскопом в нескольких полях мазка жидкости первичного разведения (8.2) высушенных и твердых проб, чтобы выбрать нужный диапазон разведений для использования, особенно в тех случаях, когда изготовитель не дает информации о продукте.

В качестве альтернативы можно использовать фазово-контрастную микроскопию без выполнения мазков.

8.4 Приготовление десятичных разведений

Общие требования приведены в ISO 6887-1. Специальные требования к выращиванию бифидобактерий учитывают следующее.

Описанную операцию требуется выполнять путем осторожного перемешивания в стандартизованных условиях, установленных ниже.

Разведения готовят следующим образом:

a) Встряхивают первичное разведение (8.2) предпочтительно 10 раз, движением руки с амплитудой примерно 300 мм, приблизительно в течение 7 с для достижения гомогенности.

b) Пипеткой (6.9) переносят 1 см^3 первичного разведения (исходная бактериальная суспензия) в пробирку (6.8), содержащую 9 см^3 стерильного разбавителя при соответствующей температуре (5.2).

c) Тщательно перемешивают разведение в течение 3 с с помощью вихревого смесителя (6.2). Для последующих разведений поступают аналогичным образом, пока не будет получена требуемая рабочая плотность от 200 КОЕ/см^3 до 500 КОЕ/см^3. Перемешивают всегда одинаковым образом, например, в течение периода в 3 с. Для каждого этапа разбавления используют свежую стерильную пипетку (6.9).

Необходимо избегать попадания в пипетку воздушных пузырьков. Необходимо позаботиться о том, чтобы из пипетки было полностью слито содержимое, особенно при переносе пор с более высокой концентрацией.

8.5 Посев

Переносят стеканием по капле 1 см^3 каждого из соответствующих этапов разведения (рекомендуется четыре десятичных разведения в рамках каждой области подсчета) в каждую пустую чашку Петри, используя по две параллельных чашки на разведение. Наливают в чашки Петри питательную среду в объеме от 12 см^3 до 15 см^3 (5.3.3). Осторожно перемешивают разбавитель в чашках Петри круговыми движениями, не захватывая воздух.

Примечание — Чтобы ограничить диапазон подсчета до заданного интервала, особенно если предполагается большое количество микроорганизмов [6], можно высеивать только те десятичные разведения (как минимум, два последовательных разведения), которые необходимы для облегчения правильного подсчета (ISO 7218).

В качестве альтернативы применяют технику автоматического распределения препарата, подтвержденную со ссылкой на настоящий стандарт.

8.6 Продолжительность опыта

Время с момента приготовления первичного разведения (при готовом исходном разведении) до момента добавления питательной среды не должно превышать 15 мин по [8].

8.7 Инкубирование

Сразу после застывания среды переворачивают все чашки Петри и ставят в анаэробный сосуд для инкубации или в анаэробный инкубатор (6.1) и выдерживают при температуре 37 °С в течение (72 ± 3) ч.

8.8 Подсчет колоний

Подсчитывают колонии после инкубации, учитывая только этапы разведения в рамках обсчитываемой области (т. е. разведения, для которых ожидаемое среднее количество на чашку $\bar{x} \leq 300$ КОЕ по ISO 7218).

Выполняют подсчет на чашках выбранных разведений, учитывая все колонии на чашке непосредственно после инкубации.

Чашки обследуют в затененном освещении. Для облегчения счета используют подходящее оборудование подсчета колоний (6.3). При подсчете точечных колоний следует не путать их с нерастворенными частицами пробы или осажденным материалом. Тщательно обследуют не вызывающие сомнений объекты с помощью лупы большего увеличения, если требуется, чтобы отличить колонии от постороннего материала.

После инкубации сразу же обследуют чашки. Чашки держат в холодильнике в течение максимум 48 ч (ISO 7218).

8.9 Считывание чашек Петри — подтверждение

Идентифицируют колонии бифидобактерий по белесому цвету. Выбирают типичные колонии (3.1) из чашек, используемых для подсчета колоний, и исследуют под микроскопом.

Дополнительно можно провести анализ с помощью F6PPK, чтобы подтвердить результаты [14], [15].

Примечание — Некоторые штаммы бифидобактерий могут давать колонии разных размеров и внешнего вида на одной и той же чашке. Большинство колоний бифидобактерий выделяют запах уксусной кислоты.

9 Расчет и обработка результатов

9.1 Расчет

Используют все подсчеты на чашках разведений в рамках обсчитываемой области, полученные в 8.7. Обсчитываемая область включает все разведения, для которых ожидаемое среднее количество колоний на чашку $\bar{x} \leq 300$ КОЕ.

Рассчитывают число КОЕ презумптивных бифидобактерий на грамм продукта N по формуле

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

где $\sum x_i$ — сумма колоний, подсчитанных на всех оставшихся чашках (8.8);

n_1 — число оставшихся чашек в первом обсчитываемом разведении;

n_2 — число оставшихся чашек во втором обсчитываемом разведении;

n_3 — число оставшихся чашек в третьем обсчитываемом разведении;

d — коэффициент разбавления, соответствующий первому обсчитываемому оставшемуся разведению.

Если осталось только два обсчитываемых разведения, формула принимает вид:

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0{,}1 n_2)\, d}. \qquad (3)$$

Определяют надежность подсчета колоний, полученных на параллельных чашках, и последующие разведения в соответствии с ISO 14461-2|IDF 169-2. Для вычисления результата используют только достоверный подсчет (ISO 7218).

9.2 Обработка результатов

Результаты выражают до двух значащих цифр как число КОЕ бифидобактерий на грамм продукта, представляют число от 1,0 до 9,9, умноженное на 10 в соответствующей степени. Достоверность результата по 10.4.

Если последняя цифра меньше 5, предыдущую цифру оставляют без изменений. Если последняя цифра равна или больше 5, увеличивают предыдущую цифру на единицу. Поступают так поэтапно, пока не останется две значащие цифры (ISO 7218).

Пример 1 — Допустим, что подсчет бифидобактерий на среде дал результаты, приведенные ниже (две чашки Петри на инкубированное разведение), тогда конечный результат можно рассчитать следующим образом.

Таблица 1 — Пример 1

Разведение	Чашка 1	Чашка 2
D4 (десятичное разведение 10^{-4})	300	298
D5 (десятичное разведение 10^{-5})	30	25
D6 (десятичное разведение 10^{-6})	2	3

Пример расчета по формуле 1 дает

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)\,d} = \frac{300 + 298 + 30 + 25 + 2 + 3}{(2 + 0{,}1 \cdot 2 + 0{,}01 \cdot 2) \cdot 10^{-4}} = \frac{658}{2{,}22 \cdot 10^{-4}} = 296 \cdot 10^4 = 3{,}0 \cdot 10^6.$$

Пример 2 — Допустим, что подсчет бифидобактерий на среде дал результаты, приведенные ниже (две чашки Петри на инкубированное разведение), тогда конечный результат можно рассчитать следующим образом.

Таблица 2 — Пример 2

Разведение	Чашка 1	Чашка 2
D5 (десятичное разведение 10^{-5})	311	286
D6 (десятичное разведение 10^{-6})	27	21
D7 (десятичное разведение 10^{-7})	2	0

Пример расчета по формуле (1) дает

$$N = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)\,d} = \frac{311 + 286 + 27 + 21 + 2 + 0}{(2 + 0{,}1 \cdot 2 + 0{,}01 \cdot 2) \cdot 10^{-5}} = \frac{647}{2{,}22 \cdot 10^{-5}} = 291 \cdot 10^5 = 2{,}9 \cdot 10^7$$

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторное испытание

Подробное описание результатов межлабораторных испытаний, проведенных в 2006 г., по определению прецизионности метода сведены в Приложение А и [12],[13]. Пределы повторяемости и воспроизводимости были определены при использовании сухой пробиотической молочной смеси для детского питания, а также шести различных пробиотических йогуртовых продуктов, содержащих различные штаммы бифидобактерий, имеющихся в продаже в Европе и Японии.

Значения, полученные в ходе межлабораторных испытаний, нельзя применять к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от использованных. Анализируемые диапазоны концентраций штаммов бифидобактерий в выбранных продуктах являются репрезентативными на мировом рынке и соответствуют стандарту [6].

10.2 Повторяемость

Повторяемость (сходимость) представляет собой близость согласования между последовательными и независимыми результатами, полученными одним и тем же методом, на идентичном испытуемом материале, в одинаковых условиях (аппаратура, оператор, лаборатория и короткие интервалы времени); т. е. в *условиях повторяемости.*

Предел повторяемости r представляет собой значение, являющееся верхней границей области, в которую с вероятностью 95 % попадет (включая эту границу) абсолютная разность между двумя резуль-

татами испытания (число презумптивных бифидобактерий на грамм, преобразованное в логарифм по основанию 10), полученными в условиях повторяемости ([2], [3], [4], [5]).

Таблица 3, второй столбец справа, показывает повторяемость различных молочных продуктов, полученную в испытаниях по круговой системе, проведенных в 2006 г., выраженную как предел повторяемости *r*. Эти результаты были вычислены с применением робастных анализов по [5], с учетом всех вариаций (отклонений), отражающих обычные и практические условия.

10.3 Воспроизводимость

Воспроизводимость представляет собой близость согласования между отдельными результатами испытания на идентичном материале, одним и тем же методом, полученные операторами в разных лабораториях на разном оборудовании, т. е. в *условиях воспроизводимости*.

Предел воспроизводимости *R* представляет собой значение, являющееся верхней границей области, в которую с вероятностью 95 % попадет (включая эту границу) абсолютная разность между двумя результатами испытания (число презумптивных бифидобактерий на грамм, преобразованное в логарифм по основанию 10), полученными в условиях воспроизводимости — [2], [3], [4], [5].

Таблица 3, крайний правый столбец, показывает воспроизводимость различных молочных продуктов, полученную в испытаниях по круговой системе, проведенных в 2006 г., выраженную как предел воспроизводимости *R*. Эти результаты были вычислены с применением робастных анализов по [5], с учетом всех вариаций (отклонений), отражающих обычные и практические условия.

Таблица 3 — Пределы повторяемости *r* робастные и пределы воспроизводимости *R* робастные

Продукт	Описание	Тип	*r* lg(КОЕ/г)	*R* lg(КОЕ/г)
Йогурт 1	Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis, L. acidophilus, S. thermophilus*	Жидкий	0,115	0,227
Йогурт 2	Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*	Плотный	0,182	0,389
Йогурт 3	Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis, L. casei, S. thermophilus*	Жидкий	0,123	0,538
Йогурт 4	Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. breve, L. casei, S. thermophilus*	Жидкий	0,118	0,400
Йогурт 5	Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. longum, L. gasseri, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*	Плотный	0,543	0,543
Йогурт 6	Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis , L. acidophilus, S. thermophilus*	Плотный	0,213	0,291
Молоко для детского питания	Имеющийся в продаже пробиотический молочный продукт для детского питания, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis*	Сухая смесь	0,221	0,529

10.4 Показатели прецизионности, совместно определенные для молочных продуктов

На основе подобия результатов, полученных для некоторых продуктов, были определены показатели прецизионности метода, вследствие чего были выделены три различных типа продуктов, приведенных в таблице 4.

Результаты, полученные для йогурта 5, продемонстрировали отклонения, возможно за счет неоднородности, и были исключены из расчетов ([12], [13]).

В зависимости от типа продукта применяют следующие показатели прецизионности (пределы повторяемости, а также пределы воспроизводимости, таблица 4):

a) Жидкие йогурты, включая все питьевые йогурты и аналогичные продукты;

b) Плотные или мягкие густые йогурты (включая йогурты термостатного способа производства);

c) Сухие продукты, включая сухие молочные смеси для детского питания или аналогичные.

Таблица 4 — Показатели прецизионности, совместно определенные для укуазанных типов продукции

Тип продукта	s_r совместное определение lg(КОЕ/г)	s_R совместное определение lg(КОЕ/г)	r lg(КОЕ/г)	R lg(КОЕ/г)
Жидкий	0,042	0,139	0,12	0,39
Плотный	0,071	0,144	0,20	0,40
Сухой	0,079	0,189	0,22	0,53

Дальнейшие пояснения со ссылкой на практическое применение приведены в примере.

Пример — Исследование йогуртного продукта:

Таблица 5 — 1-е обследование

Разведение	Чашка 1	Чашка 2
D5 (десятичное разведение 10^{-5})	128	145
D6 (десятичное разведение 10^{-6})	9	11
D7 (десятичное разведение 10^{-7})	0	0

Пример расчета по формуле (1)

$$N_1 = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)\,d} = \frac{128 + 145 + 9 + 11}{(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-5}} = 133{,}2 \cdot 10^5 = 1{,}332 \cdot 10^7;$$

$$\lg N_1 = \lg(1{,}332 \cdot 10^7) = 7{,}13.$$

Таблица 6 — 2-е обследование

Разведение	Чашка 1	Чашка 2
D5 (десятичное разведение 10^{-5})	186	171
D6 (десятичное разведение 10^{-6})	17	21
D7 (десятичное разведение 10^{-7})	1	0

Пример расчета по формуле (1)

$$N_2 = \frac{\sum x_i}{(n_1 + 0{,}1n_2 + 0{,}01n_3)\,d} = \frac{186 + 171 + 17 + 21 + 1 + 0}{(2 + 0{,}1 \cdot 2 + 0{,}01 \cdot 2) \cdot 10^{-5}} = 178{,}4 \cdot 10^5 = 1{,}784 \cdot 10^7;$$

$$\lg N_2 = \lg(1{,}784 \cdot 10^7) = 7{,}25.$$

Чтобы проверить, согласуется ли повторяемость с определенными показателями прецизионности настоящего стандарта, поступают следующим образом.

a) Рассчитывают разность логарифмов двух полученных отдельных результатов обследования (N_1 и N_2):

$|\lg N_1 - |\lg N_2| = |7{,}12 - 7{,}25| = 0{,}13.$

b) Сравнивают рассчитанное абсолютное значение с пределом прецизионности r, приведенным в таблице 4. В условиях повторяемости должно выполняться следующее требование:

$|\lg N_1 - \lg N_2| \le r.$

В зависимости от типа продукта приходят к следующему решению:

1) Для жидкого йогурта: $0{,}13 > r_{\text{Tab4}} = 0{,}12$ ▶ **не достоверно!!**
Если возможно, повторяют обследование после выяснения причин исключительных отклонений.

2) Для плотного или мягкого густого йогурта: $0{,}13 \le r_{\text{Tab4}} = 0{,}20$ ▶ **достоверно!!**

c) Результаты выражают следующим образом.

1) Для достоверных результатов (согласование с установленными показателями прецизионности подтверждено) объявляют конечный(е) результат(ы), рассчитав среднеарифметическое значение по результатам анализа.

2) Если это требование, как показано выше, не выполняется, данный анализ предпочтительно повторить. Если повторение невозможно, сообщают отдельные результаты анализа с указанием «данные не достоверны».

11 Квалификация при применении данного метода

Для выполнения требований надлежащей лабораторной практики рекомендуется проверить квалификацию каждого аналитика в применении техники чашечного метода (ISO 14461-1).

12 Протокол испытаний

Протокол испытания должен включать следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) использованный метод отбора проб, если он известен;

c) использованный метод анализа, со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все детали работы, не установленные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, а также подробное описание всех случайностей, которые могли повлиять на результат(ы);

e) отдельные полученные результаты испытания или, если повторяемость согласуется с показателями прецизионности, полученные конечные результаты.

Приложение А
(справочное)

Межлабораторное испытание

Международное совместное исследование, в котором приняли участие 23 лаборатории из 11 стран, было выполнено для оценки имеющихся в продаже молочных пробиотических продуктов (ферментированных и неферментированных). Исследование было подразделено на этапы: этап А, оценка квалификации аналитиков всех участников программы (международной); этап В, исследование сухой молочной смеси для детского питания и этап С, исследование выбранных пробиотических йогуртовых продуктов. Этап С был осуществлен как исследование двух регионов, рассмотрев типичные йогуртовые продукты, репрезентативные для европейского и азиатского рынков.

Исследование по круговой системе было организовано Департаментом науки и технологии пищевой промышленности, Университетом природных ресурсов и прикладных естественных наук (BOKU), Вена, Австрия в 2005 г. и 2006 г. Метод, включающий все соответствующие инструкции, был предложен всем сторонам-участникам. После сбора и подготовки результатов был выполнен статистический анализ BOKU, в тесном сотрудничестве с Институтом биометрии и обработки данных, а также Институтом статистики и эконометрики, Открытым университетом Берлина, Берлин, Германия [12], [13].

Таблица А.1 — Результаты межлабораторного исследования

Параметр	Проба						
	Международная	Европа			Азия		
	Детское молоко K, L, N	Йогурт 1 A, B	Йогурт 2 C, D	Йогурт 3 E, F	Йогурт 4 A, B	Йогурт 5 C, D	Йогурт 6 E, F
Количество участников	23	17	17	17	6	6	6
Объем пробы	3	2	2	2	2	2	2
Всего анализов на участника	12	4	4	4	4	4	4
Среднее значение [lg(КОЕ/г)]	7,344	6,337	7,813	6,723	7,262	7,674	7,824
Оставшиеся наборы данных	23	17	16	17	6	6	6
Результаты, использованные для оценки r, R	69	34	32	34	12	12	12
Стандартное отклонение повторяемости s_r robust[a]	0,079	0,041	0,065	0,044	0,042	0,194	0,076
Предел повторяемости r robust[a]	0,221	0,115	0,182	0,123	0,118	0,543	0,213
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R robust[a]	0,189	0,081	0,139	0,192	0,143	0,194	0,104
Предел воспроизводимости R_{robust}[a]	0,529	0,227	0,389	0,538	0,400	0,543	0,291

[a] На основе робастных анализов в соответствии с ISO 16140 [5], ни один из наборов данных исключать не потребовалось.

Описание использованных проб:

Молочная смесь — Имеющаяся в продаже пробиотическая детская молочная смесь, содержащая *B. animalis* subsp. *lactis*

Йогурт 1 — Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*

Йогурт 2 — Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*

Йогурт 3 — Имеющийся в продаже в Европе пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. casei*, *S. thermophilus*

Йогурт 4 — Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. breve*, *L. casei*, *S. thermophilus*

Йогурт 5 — Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. longum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*

Йогурт 6 — Имеющийся в продаже в Азии пробиотический йогуртовый продукт, содержащий *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 6887-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений	—	*
ISO 6887-5 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Приготовление проб для испытаний, исходных суспензий и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 5. Специальные правила для приготовления молока и молочных продуктов	—	*
ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям	IDT	ГОСТ ISO 7218—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям
ISO 7889 Подсчет характеристических микроорганизмов. Метод определения количества колоний при 37 °С	—	*
ISO 11133-1 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории	IDT	ГОСТ ISO 11133-1—2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории
ISO 14461-1 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 1. Оценка работы аналитика при подсчете числа колоний	—	*
ISO 14461-2 Молоко и молочные продукты. Контроль качества в микробиологических лабораториях. Часть 2. Определение достоверности подсчета числа колоний при посеве на параллельных чашках Петри с последующими стадиями разведений	—	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано условное обозначение степени соответствия стандартов:
- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] ISO 707|IDF 50, Milk and milk products — Guidance on sampling ISO 707:1997

[2] ISO 3534-1, Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability ISO 3534-1:2006

[3] ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions (ISO 5725-1:1994)

[4] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement (ISO 5725-2:1994)

[5] ISO 16140, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003)

[6] Codex Stan 243:2003, Codex standard for fermented milks. In: Codex Alimentarius, Vol. 13, pp. 1—8 (2003)/Amd.1 (2008). Available (2009-09-25) at: gost.e-ecolog.ru 400/CXS_243e. pdf

[7] Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., Swings, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 102, pp. 221—230

[8] IDF Group E104 — Lactic Acid Bacteria and Starters. Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Bull. Int. Dairy Fed.* 1999, (340), pp. 19—23

[9] Scardovi, V. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472AL. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, pp. 1418—1434. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986

[10] Expert Group on Selective Enumeration of Bifidobacteria. *Method of enumeration of bifidobacteria in fermented milks and fermented milk drinks*. Japanese Association of Fermented Milks and Fermented Milk Drinks, 2000

[11] Rada, V., Koc, J. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 2000, 55, pp. 65—67

[12] Zitz, U., Kneifel, W., Weiss, H., Wilrich, P.T. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: Development of a standard method. *Bull. Int. Dairy Fed.* 2007, (411), pp. 3—20

[13] Zitz, U. *Kulturelle Bestimmung der Bifidobakterienkeimzahl in Milchprodukten — Ein Leitfaden zur Standardisierung quantitativer mikrobiologischer Methoden* [Culture determination of the bifidobacteria count in milk products — A manual for the standardization of quantitative microbiological methods]. SVH (Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften), Saarbrücken, 2008. 242 p.

[14] Orban, J.I., Patterson, J.A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Meth.* 2000, 40, pp. 221—224

[15] Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J. Microbiol. Meth.* 2004, 57, pp. 9—16

[16] Holzapfel, W.H., Schillinger, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 2002, 35, pp. 109—116

[17] Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, S., Matsumoto, K., Kuroda, A., Mutai, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1983, 2, pp. 17-24

[18] Toba, T., Yokota, A., Adachi, S. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β-*galactosidase. Food Chem.* 1985, 16, pp. 147—162

[19] Yakult Honsha KK. *Composition for promoting growth of bifidobacteria*. Mutai, M., Terashima, T., Takahashi, T., Tanaka, R., Kuroda, A., Ueyama, S., Matsumoto, K. inventors. US Patent No. 4,435,389, 1984

[20] ISO 835, Laboratory glassware — Graduated pipettes (ISO 835:2007)

УДК 637.07:006.354 МКС 67.100.01 IDT

Ключевые слова: молочные продукты, бифидобактерии, подсчет колоний, микроорганизмы, десятичные разведения, питательная среда, сухие молочные продукты, сухие молочные смеси, инкубирование, подтверждение

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 28.10.2014. Подписано в печать 03.12.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,60. Тираж 39 экз. Зак. 4919.

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

gost.e-ecolog.ru