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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33924— 2016

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения бифидобактерий

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 октября 2016 г. № 92-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 ноября 2016 г. № 1826-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33924—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 сентября 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

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

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ

Методы определения бифидобактерий

Milk and milk products. Methods for determination of the bifidobacterium

Дата введения — 2017—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и молочную продукцию и устанавливает метод селективного подсчета бифидобактерий с использованием техники подсчета колоний при температуре 37 °С в анаэробных условиях.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

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

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

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

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

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

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 32901 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 **бифидобактерии** (Bifidobacterium): Грамположительные, неподвижные, неспорообразующие, каталазоотрицательные бактерии, которые имеют форму раздвоенной палочки и характеризуются облигатными анаэробными свойствами.

Примечания

1 Бифидобактерии являются хемоорганотрофами и сбраживают сахар, продуцируя уксусную и молочную кислоты в молярном соотношении 3:2. Оптимальная температура их роста от 37 °С до 41 °С. Палочки располагаются поодиночке, парами, V-образно, цепочками, столбчатыми ячейками или розетками, иногда показывая вздутые кокковые формы.

2 Основные виды бифидобактерий: *B.bifidum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.lactis* и др.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

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

- анаэростат, обеспечивающий поддержание анаэробной атмосферы, содержащей от 10 % до 20 % диоксида углерода по массе по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт;
- газ-пакеты;
- анаэробный инкубатор, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С, обеспечивающий анаэробную атмосферу по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт;
- стерилизационная аппаратура для стерилизации фильтрованием по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт;
- шприц вместимостью 10 $см^3$, оснащенный стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт;
- диклоксациллин;
- мупироцин;
- неомицин;
- питательная среда ГМК-1;
- питательная среда MRS;
- питательная среда TOS-MUP;
- питательная среда для определения бифидобактерий ОББ;
- питательная среда Блаурокка для определения бифидобактерий;
- хлористый литий;
- L-цистеин гидрохлорид.

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

5 Отбор проб

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

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Подготовка посуды и материалов — по ГОСТ 32901.

6.2 Приготовление реактивов и питательных сред

6.2.1 Приготовление дистиллированной воды и растворов хлористого натрия и фосфатного буфера для разведений продуктов, а также гидроокиси натрия и молочной кислоты для доведения pH питательных сред — по ГОСТ 32901.

6.2.2 Приготовление раствора хлористого цистеина

3 г L-цистеин гидрохлорида растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды и стерилизуют фильтрацией. Раствор разливают по 10 см^3 в стерильные пробирки.

Срок хранения раствора 15 суток при температуре (4 ± 2) °С.

6.2.3 Приготовление 30 %-ного раствора хлористого лития

15 г хлористого лития вносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и добавляют дистиллированную воду до 50 см^3, перемешивают, разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Срок хранения раствора 30 суток при температуре (4 ± 2) °С.

6.2.4 Приготовление раствора диклоксациллина

25 мг диклоксациллина вносят в колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 50 см^3 дистиллированной воды, перемешивают. Полученный раствор стерилизуют фильтрацией при помощи шприца со стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм.

Срок хранения раствора 15 суток при температуре (4 ± 2) °С. В момент использования готовят разведение 1:10.

6.2.5 Приготовление раствора Li-Mupirocin (MUP)

50 мг Li-Mupirocin вносят в колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 50 см^3 дистиллированной воды, перемешивают. Полученный раствор стерилизуют фильтрацией при помощи шприца со стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм.

6.2.6 Приготовление раствора неомицина

0,5 г неомицина (сульфата или основания) растворяют в 500 см^3 стерильной дистиллированной воды и кипятят в течение (2—3) мин. Массовая концентрация неомицина в растворе — 1,0 г/дм^3.

Водные растворы антибиотиков добавляют к расплавленной и охлажденной до температуры (46 ± 1) °С питательной среде.

6.2.7 Приготовление питательных сред для учета количества клеток бифидобактерий в чистой культуре

Допускается при использовании готовой сухой питательной среды уточнение массы навески в соответствии с рекомендацией производителя.

6.2.7.1 Приготовление питательной среды ГМК-1

Состав питательной среды ГМК-1:

- гидролизат казеина — 14,25 г;
- кукурузный экстракт — 0,75 г;
- пептон — 15 г;
- лактоза — 9 г;
- аскорбиновая кислота — 1,25 г;
- натрий лимоннокислый (трехзамещенный) — 6 г;
- магний сернокислый — 0,12 г;
- калий фосфорнокислый (однозамещенный) — 2 г;
- натрий фосфорнокислый (двузамещенный) — 1 г;
- агар — 3 г;
- дистиллированная вода — 1000 см^3.

Все компоненты вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. При наличии осадка раствор фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают pH (7,2 ± 0,2).

При использовании готовой питательной среды 50 г питательной среды вносят в колбу, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. При наличии осадка раствор фильтруют через ватный фильтр. Устанавливают pH (7,2 ± 0,2).

Среду разливают в пробирки высоким столбиком по (20 ± 0,5) см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 2) мин.

Перед использованием пробирки со средой помещают в водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 20 мин для регенерации среды. Затем среду охлаждают до температуры (48 ± 1) °С и используют для посева.

6.2.7.2 Приготовление питательной среды MRS

Состав питательной среды MRS:

- пептон — 10 г;
- мясной экстракт — 10 г;
- дрожжевой экстракт — 5 г;
- глюкоза — 20 г;

- твин 80 — 1 см^3;
- фосфат калия однозамещенный — 2 г;
- ацетат натрия тригидрат — 5 г;
- диаммоний цитрат — 2 г;
- сернокислый магний — 0,2 г;
- сернокислый марганец — 0,5 г;
- агар — 15 г;
- дистиллированная вода — 1000 см^3.

Все компоненты (кроме твин 80) вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,5 ± 0,2) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают по 100 см^3 в бутылочки вместимостью 250 см^3 или по (20 ± 0,5) см^3 в пробирки высоким столбиком. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды 60 г питательной среды вносят в колбу, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Добавляют 1 см^3 твин 80. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH (6,4 ± 0,2). Готовую среду разливают по 100 см^3 в бутылочки вместимостью 250 см^3 или по (20 ± 0,5) см^3 в пробирки высоким столбиком. Стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение (15 ± 1) мин.

6.2.7.3 Приготовление питательной среды TOS

Состав питательной среды TOS:

- трипсиновый пептон — 10,0 г;
- дрожжевой экстракт — 1,0 г;
- калий фосфорнокислый (двузамещенный) — 3,0 г;
- калий фосфорнокислый (однозамещенный) — 4,8 г;
- аммония сульфат — 3,0 г;
- магний сернокислый — 0,2 г;
- хлористый цистеин — 0,5 г;
- натрия пропионат — 15,0 г;
- смесь олигосахаридов (TOS) — 10,0 г;
- агар — (12—18) г
- дистиллированная вода — 950 см^3.

Все компоненты питательной среды вносят в колбу, перемешивают и нагревают до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,3 ± 0,2) при температуре 25 °С, среду разливают по 190 см^3 в бутылочки вместимостью 250 см^3. Стерилизуют в автоклаве при температуре (115 ± 3) °С в течение 15 мин.

Срок хранения основной среды при температуре (4 ± 2) °С не более 7 дней.

При использовании готовой питательной среды 62,5 г питательной среды вносят в колбу, добавляют 1000 см^3 дистиллированной воды и нагревают при перемешивании до полного растворения. Смесь охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации pH составил (6,3 ± 0,2) при температуре 25 °С. Готовую среду разливают по 190 см^3 в бутылочки вместимостью 250 см^3 и стерилизуют в автоклаве при температуре (115 ± 3) °С в течение 15 мин.

Приготовление смеси олигосахаридов-трансгалактозы (TOS) — по ГОСТ ISO 29981.

6.2.7.4 Приготовление питательной среды ОББ

Состав питательной среды ОББ:

- лактопептон — 17,5 г;
- дрожжевой автолизат сухой — 5,0 г;
- лактоза или сахар молочный рафинированный мелкокристаллический — 7,5 г;
- цистеин-L гидрохлорид — 0,15 г;
- калий фосфорнокислый (двузамещенный) — 2,8 г;
- сульфат железа — 0,1 г;
- натрий лимоннокислый — 5,0 г;
- агар — 12,0 г;
- дистиллированная вода — 1000 см^3.

Все компоненты питательной среды вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH до стерилизации (7,4 ± 0,2). Среду

разливают в пробирки по 20 см^3, закрывают пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды навеску среды (50 ± 1) г вносят в 1 дм^3 холодной воды, тщательно перемешивают, нагревают, не допуская пригорания, и кипятят (3—5) мин. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют до значения (7,4 ± 0,2) ед. pH. Среду разливают в пробирки по 20 см^3, закрывают пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Срок хранения основной среды при температуре (4 ± 2) °С не более трех месяцев.

6.2.7.5 Приготовление питательной среды Блаурокка

Состав питательной среды Блаурокка:

- экстракт печени говяжьей — 14,4 г;
- пептон сухой ферментативный — 10,0 г;
- лактоза — 10,0 г;
- натрий хлористый — 5,0 г;
- агар микробиологический — 0,5 г;
- цистин — 0,1 г;
- дистиллированная вода — 1000 см^3.

Все компоненты питательной среды вносят в колбу, перемешивают, нагревают до полного растворения. Охлаждают до температуры (50 ± 2) °С и устанавливают pH до стерилизации (7,7 ± 0,1). Среду разливают в пробирки по 20 см^3, закрывают пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

При использовании готовой питательной среды навеску среды (40 ± 1) г вносят в 1 дм^3 холодной дистиллированной воды, тщательно перемешивают, нагревают, не допуская пригорания, и кипятят (2—3) минуты, фильтруют. В полученной среде проверяют активную кислотность и при необходимости корректируют до значения (7,7 ± 0,1) ед. pH. Среду разливают в пробирки по 20 см^3, закрывают пробками и стерилизуют при температуре (121 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин.

Срок хранения основной среды при температуре (4 ± 2) °С не более двух месяцев.

6.2.8 Приготовление питательных сред для определения бифидобактерий в смешанной культуре с молочнокислыми бактериями

Для определения бифидобактерий в кисломолочных продуктах применяют следующие питательные среды: ГМК-1 с добавлением диклоксациллина, хлористого лития, хлористого цистеина; MRS с добавлением диклоксациллина, хлористого лития, хлористого цистеина; TOS-MUP; ОББ с добавлением диклоксациллина; среда Блаурокка с добавлением диклоксациллина. Допускается применение среды ОББ и среды Блаурокка с добавлением неомицина.

6.2.8.1 Приготовление питательной среды ГМК-1 с диклоксациллином, хлористым литием и хлористым цистеином

Пробирки со средой ГМК-1 по 6.2.7.1 помещают на водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 20 мин для регенерации. Затем среду охлаждают до температуры (48 ± 1) °С. В каждую пробирку с 20 см^3 питательной среды добавляют по 0,2 см^3 растворов диклоксациллина (6.2.4), хлористого цистеина (6.2.2) и хлористого лития (6.2.3).

Содержимое пробирок осторожно перемешивают и используют для проведения посева.

6.2.8.2 Приготовление питательной среды MRS с диклоксациллином, хлористым литием и хлористым цистеином

Бутылочки или пробирки со средой MRS по 6.2.7.2 помещают на водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 20 мин для регенерации. Затем среду охлаждают до температуры (48 ± 1) °С.

В каждую пробирку с 20 см^3 питательной среды добавляют по 0,2 см^3 растворов диклоксациллина (6.2.4), хлористого цистеина (6.2.2) и хлористого лития (6.2.3).

В каждую бутылочку со 100 см^3 питательной среды добавляют по 1,0 см^3 растворов диклоксациллина (6.2.4), хлористого цистеина (6.2.2) и хлористого лития (6.2.3).

Содержимое пробирок и бутылочек осторожно перемешивают и используют для проведения посева.

6.2.8.3 Приготовление питательной среды TOS-MUP

Бутылочки или пробирки со средой TOS по 6.2.7.3 помещают на водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 20 мин для регенерации. Затем среду охлаждают до температуры (48 ± 1) °С. В каждую бутылочку со 190 см^3 питательной среды вносят по 10 см^3 раствора MUP по

6.2.5 при помощи шприца со стерильным фильтром с размером пор 0,22 мкм, приготовленного непосредственно перед применением. Тщательно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха.

Содержание антибиотика MUP в питательной среде составляет 50 мкг/см^3.

6.2.8.4 Приготовление питательной среды ОББ с диклоксациллином или с неомицином

Непосредственно перед применением в каждую пробирку со средой ОББ по 6.2.7.4 вносят 0,2 см^3 раствора диклоксациллина по 6.2.4 или неомицина по 6.2.6. Пробирки помещают на водяную баню, нагревают до температуры 100 °С и выдерживают в течение (25 ± 5) мин. По окончании тепловой обработки среду тщательно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и охлаждают до температуры (45 ± 1) °С.

6.2.8.5 Приготовление питательной среды Блаурокка с диклоксациллином или с неомицином

Непосредственно перед применением в каждую пробирку со средой Блаурокка по 6.2.7.5 вносят 0,2 см^3 раствора диклоксациллина по 6.2.4 или неомицина по 6.2.6. Пробирки помещают на водяную баню, нагревают до температуры 100 °С и выдерживают в течение (25 ± 5) мин. По окончании тепловой обработки среду тщательно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха, и охлаждают до температуры (45 ± 1) °С.

7 Условия проведения анализа

При выполнении анализа в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

температура окружающего воздуха ..... (20 ± 5) °С;

относительная влажность воздуха ..... от 30 % до 80 %;

атмосферное давление ..... от 84 кПа до 106 кПа.

8 Методы анализа

8.1 Метод определения бифидобактерий в чистой культуре

8.1.1 Сущность метода

Метод основан на высеве определенного количества продукта и (или) его разведения в агаризованные селективные питательные среды, культивировании посевов при температуре (37 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч, учете результатов по подсчету типичных колоний. При необходимости подтверждения результатов подсчета проводят определение морфологических свойств учитываемых микроорганизмов.

8.1.2 Проведение анализа

8.1.2.1 Выбор разведений для посева

Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного содержания этих микроорганизмов в продукте.

8.1.2.2 Посев

Посев осуществляют двумя способами:

- посев в чашки Петри с последующим термостатированием в анаэробных условиях:

в две чашки Петри засевают по 1 см^3 из трех последних разведений продукта. В каждую чашку Петри заливают по (12—15) см^3 регенерированной среды MRS (6.2.7.2), или TOS (6.2.7.3), ОББ (6.2.7.4), Блаурокка (6.2.7.5) с температурой (45 ± 1) °С, тщательно перемешивают и оставляют для застывания. После застывания содержимого чашки Петри переворачивают дном вверх и помещают в анаэростат, в который вкладывают анаэробный агент, извлеченный из индивидуальной упаковки, и плотно закрывают;

- посев в пробирки с высоким столбиком с последующим термостатированием в аэробных условиях:

в две пробирки с высоким столбиком регенерированной питательной среды ГМК-1 (6.2.7.1), или MRS (6.2.7.2), или TOS (6.2.7.3), ОББ (6.2.7.4), Блаурокка (6.2.7.5) засевают по 1 см^3 из трех последних разведений продукта. При проведении посева необходимо создавать анаэробные условия, избегая взбалтывания и попадания воздуха внутрь среды. Засев среды проводят соответствующим разведением посевного материала пипеткой, которую опускают до дна пробирки и медленно поднимают вращательными движениями до поверхности среды, стараясь равномерно распределить посевной материал в ее объеме. Посевной материал при этом должен свободно истекать из пипетки без принудительного выдувания.

8.1.2.3 Выращивание

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

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

8.1.3 Обработка результатов

После завершения инкубации подсчитывают количество колоний на чашках Петри или пробирках. Для подсчета используют чашки, на которых выросло от 10 до 300 колоний, или пробирки, на которых выросло от 5 до 150 колоний.

Подсчету подлежат типичные для бифидобактерий колонии:

- на плотных питательных средах (MRS, TOS и ОББ) — в виде «дисков» или «гречишных зерен»;
- на полутвердых питательных средах (ГМК-1, Блаурокка) — в виде «гвоздиков», «вытянутых веретен», иногда в виде «полос», расположенных вдоль пробирки.

Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к бифидобактериям проводят методом микроскопирования.

В микроскопическом препарате бифидобактерии имеют следующий вид: тонкие палочки различной конфигурации, изогнутые или утолщенные, частично разветвленные, одинарные или парами, расположенные в V-образной форме, в виде цепочек, частокол параллельных клеток.

Количество бифидобактерий в пробе N определяют по формуле:

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

где N — количество бифидобактерий в пробе, КОЕ/г;

C — сумма колоний, подсчитанных на чашках (пробирках);

n_1 — количество чашек (пробирок), подсчитанных в самом низком разведении;

n_2 — количество чашек (пробирок), подсчитанных в самом высоком разведении;

d — величина первого разведения, взятого для подсчета.

Пример — Если в 10^{-6} разведении 295 и 245 колоний и в 10^{-7} разведении 33 и 40 колоний, то $N = (295 + 245 + 33 + 40)/[(2 + 0{,}1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}] = 278{,}6 \cdot 10^6$

8.2 Метод определения бифидобактерий в смешанных с молочнокислыми бактериями культурах

8.2.1 Сущность метода — по 8.1.1.

8.2.2 Проведение анализа

8.2.2.1 Выбор разведений для посева — по 8.1.2.1.

8.2.2.2 Посев

Посев осуществляют двумя способами:

- посев в чашки Петри с последующим термостатированием в анаэробных условиях:

в две чашки Петри засевают по 1 см^3 из трех последних разведений продукта. В каждую чашку Петри заливают по (12—15) см^3 регенерированной среды MRS с диклоксациллином, хлористым литием и хлористым цистеином (6.2.8.2), или TOS-MUP (6.2.8.3), ОББ с диклоксациллином или неомицином (6.2.8.4), Блаурокка с диклоксациллином или неомицином (6.2.8.5) с температурой (45 ± 1) °С, тщательно перемешивают и оставляют для застывания. После застывания чашки Петри переворачивают донышком вверх и помещают в анаэростат, в который вкладывают анаэробный агент, извлеченный из индивидуальной упаковки, и плотно закрывают, не допуская доступа воздуха;

- посев в пробирки с высоким столбиком с последующим термостатированием в аэробных условиях:

в две пробирки с высоким столбиком регенерированной питательной среды ГМК-1 с диклоксациллином, хлористым литием и хлористым цистеином (6.2.8.1), или MRS с диклоксациллином, хлористым литием и хлористым цистеином (6.2.8.2), или TOS-MUP (6.2.8.3) или ОББ с диклоксациллином или неомицином (6.2.8.4), или Блаурокка с диклоксациллином или неомицином (6.2.8.5) засевают по 1 см^3 из трех последних разведений продукта, избегая взбалтывания и попадания внутрь среды воздуха. Засев среды проводят соответствующим разведением посевного материала пипеткой, которую опускают до дна пробирки и медленно поднимают вращательными движениями до поверхности среды, стараясь равномерно распределить посевной материал в ее объеме. Посевной материал при этом должен свободно истекать из пипетки без принудительного выдувания.

8.2.2.3 Выращивание — по 8.1.2.3.

8.2.3 Обработка результатов — по 8.1.3.

9 Требования, обеспечивающие безопасность

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021;
- содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами — в соответствии с ГОСТ 12.1.007;
- требования техники безопасности при работе с электроустановками — в соответствии с ГОСТ 12.1.019;
- требования безопасности при работе в микробиологической лаборатории с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) — в соответствии с положениями нормативного документа, действующего на территории государства, принявшего соответствующий стандарт.

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

УДК 637.14.04/.07:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, бифидобактерии, метод селективного подсчета, отбор проб, метод определения бифидобактерий в чистой культуре, метод определения бифидобактерий в смешанных с молочнокислыми бактериями культурах

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 11.11.2019. Подписано в печать 05.12.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,10.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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