

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
19 марта 2010 г.
Регистрационный № 071-0210

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ
В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-
практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.П. Филонов, канд. мед. наук
И.А. Застенская, канд. мед. наук, доц. И.П. Щербинская, канд. биол. наук
Л.А. Мельникова, Н.В. Дудчик, С.А. Янецкая, О.Е. Шедикова, В.В. Трейлиб

Минск 2010

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая Инструкция по применению (далее — Инструкция) устанавливает метод определения количества бифидобактерий в пищевых продуктах; продуктах кисломолочных, продуктах детского, лечебного и диетического питания, а также биологически активных добавках к пище, заквасках, бактериальных концентратах и препаратах (далее — продуктах).

Настоящая Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, организаций и учреждений, осуществляющих производственный контроль качества при разработке новых видов продуктов, постановке их на производство, в процессе промышленного выпуска, а также в лабораториях иных организаций, аккредитованных на право проведения испытаний указанной продукции для целей ее сертификации.

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, РЕАКТИВЫ

Аппаратура

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (pH-метр)	ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках (шуттель-аппарат)	ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру 0–100 °С с погрешностью ± 5 °С	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г	ГОСТ 24104-88Е
Весы лабораторные квадрантные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-88Е
Гомогенизатор перистальтического типа «Стомайкер» или других наименований	
Дистиллятор электрический	
Дозаторы автоматические	
Лупа измерительная	ГОСТ 25706-93
Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000 ^x	ГОСТ 8284-78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89
Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220) °С	ГОСТ 24437-89
Термометр (0–100) °С, цена деления 1 °С	ГОСТ 28498-90
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ± 1 °С	ТУ 64-1-1382-83
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87.
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83

Материалы

Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-09-1181-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-81
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82 Е
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Наконечники к дозаторам	
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239-89
Палочки стеклянные	
Петли бактериологические	
Пипетки разной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 29227-91
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241-90
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Скальпель хирургический	ГОСТ 21240-89
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90Е
Стекла предметные	ГОСТ 6672-75
Стекла покровные	ГОСТ 6672-75
Ступки фарфоровые с пестиком	ГОСТ 9147-80
Цилиндры на 100–250 мл	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 мл	ГОСТ 10782-85
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932-90 Е

Питательные среды и реактивы

Агар микробиологический	ГОСТ 17206-84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
D-глюкоза	ГОСТ 6038-79
Калий фосфорнокислый двухзамещенный 3-водный	ГОСТ 2493-75
Кислота аскорбиновая	ГФ РБ 2006
Кислота уксусная	ГОСТ 61-75
L-цистин или L-цистеин солянокислый	ТУ 6-093252-80
Магний сернокислый 7-водный	ГОСТ 4523-77
Метиленовый голубой краситель	МРТУ 6-09-6045-69
Молоко коровье обезжиренное сухое	ГОСТ 10970-87
Набор реактивов для окраски по Граму	
Натрия гидрокарбонат	ГОСТ 4201-79
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77
Натрий лимоннокислый трехзамещенный 5,5-водный	ГОСТ 22280-87
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77
Неомицин	ГФ РБ 2006

Панкреатин медицинский активностью 50 ЕД	ГФ РБ 2006
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805-76
Печень крупного рогатого скота свежая или замороженная или согласно ветеринарному свидетельству установленного образца	ГОСТ 19342
Среда гидролизатно-молочная (ГМС)	ТУ 10-02-02-789-192-95
Среда кукурузно-лактозная (ГМК-1)	ТУ 9229-357-00419785-04
Среда питательная для выделения и культивирования бифидобактерий (Бифидум-среда)	
Хлороформ технический	ГОСТ 20015-76
Экстракт кукурузы сгущенный	ТУ 10-04.08.14-88
Этиловый спирт ректифицированный технический	ГОСТ 18300-87

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000. Питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться в соответствии с нормативной документацией, утвержденной в установленном порядке.

ОТБОР ПРОБ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Отбор проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26668-85 «Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа», а также в соответствии с действующими ГОСТ и ТНПА на конкретные виды продуктов.

От продукции в потребительской таре в мелкой фасовке пробы отбирают в количестве одной или нескольких единиц в зависимости от массы или объема потребительской тары, с тем чтобы количество было достаточным для проведения анализа.

От продукции в транспортной или потребительской таре больших размеров или неупакованной пробы отбирают из разных мест с различной глубины, включая поверхность.

Для микробиологического анализа пробы отбирают до взятия проб на физико-химические и органолептические анализы стерильным инструментом в стерильную емкость.

ПОДГОТОВКА К МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ

Подготовка посуды

Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа проводят согласно требованиям СТБ ГОСТ Р 51446-2001 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

Приготовление реактивов и питательных сред

При выполнении микробиологического анализа предпочтительно использовать стандартизированные сухие питательные среды промышленного производства, которые приготавливают в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке.

Приготовленные питательные среды проверяют на стерильность путем выдержки при температуре 37 ± 1 °С в течение 2 сут.

Приготовленные питательные среды хранят не более 1 мес. при температуре 4 ± 2 °С, если нет специальных указаний.

1. Приготовление раствора хлористого натрия — по ГОСТ 9225-84.
2. Приготовление раствора двууглекислого натрия для нейтрализации проб — по ГОСТ 9225-84.
3. Приготовление раствора метиленового голубого — по ГОСТ 9225-84.
4. Приготовление реактивов для окраски по Граму (модификация Г.П. Калины) — по ГОСТ 9225-84.

5. Приготовление раствора неомицина: 500 мг неомицина вносят стерильную мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 10–20 мл стерильной дистиллированной воды при температуре (35–40) °С, перемешивают до растворения, затем доливают стерильной дистиллированной водой до метки. Массовая концентрация неомицина в растворе — 5 г/л.

6. Приготовление модифицированной печеночной среды Блаурокка. Свежую говяжью печень в количестве 500 г очищают от пленок и протоков, измельчают, заливают 1 л дистиллированной воды и кипятят в течение 1,5–2,0 ч. Отвар фильтруют, доводят до 1 л дистиллированной водой. Добавляют на 1 л раствора: хлористого натрия — 5 г, пептона — 10 г. Устанавливают активную кислотность рН ($8,15\pm 0,05$) с помощью 10%-го раствора гидроксида натрия. Кипятят 10 мин. Стерилизуют при температуре 120 ± 2 °С в течение 15 мин или при температуре 112 ± 2 °С в течение 30 мин. На следующий день печеночный бульон сливают, освободив от осадка, доливают дистиллированной водой до 1 л. Вносят на 1 л бульона: глюкоза — 5 г, агар — 0,8 г, цистеин — 0,3 г. Кипятят 10 мин, доводят рН до $7,7\pm 0,1$. Разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение 15 мин или при температуре 112 ± 2 °С — в течение 20 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4 ± 2 °С.

Среду Блаурокка из сухого концентрата готовят следующим образом: препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят в течение 2–3 мин, фильтруют. Разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре

112±2 °С в течение 30 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4±2 °С.

7. Приготовление Бифидум-среды. Ее готовят из сухого концентрата следующим образом: препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят в течение 2–3 мин, фильтруют. Разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 112±2 °С в течение 30 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4±2 °С.

8. Приготовление кукурузно-лактозной среды (плотной): в небольшом объеме дистиллированной воды расплавляют агар в количестве 2,5 г из расчета на 1 л приготовляемой среды. К остальному количеству дистиллированной воды добавляют 10 г пептона, 40 мл водного раствора кукурузного экстракта, разбавленного 1:2, 6,6 г натрия лимоннокислого трехзамещенного, 0,12 г магния сернокислого, 2 г калия фосфорнокислого двухзамещенного. Смесь нагревают до температуры 80±2 °С, после чего соединяют с расплавленным агаром, добавляют 10 г лактозы и 0,15 г цистеина солянокислого или 0,5 г аскорбиновой кислоты. Цистеин предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, в которой устанавливают рН 8,5±0,1 с помощью 10%-го раствора натрия гидроксида, и нагревают на водяной бане до полного растворения. Всю смесь доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема (1 л) и устанавливают рН 7,0±0,1 с помощью 10%-го раствора натрия гидроксида. Среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре 112±2 °С в течение 30 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4±2 °С.

Кукурузно-лактозную среду для выращивания бактерий из сухого концентрата (ГМК-1) готовят следующим образом: препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, нагревают до полного растворения, фильтруют. Разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 112±2 °С в течение 15 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4±2 °С.

9. Приготовление гидролизатно-молочной среды

Гидролизованное молоко

Обычное или восстановленное обезжиренное молоко (обрат) доводят до кипения и кипятят 2 мин, охлаждают до 14±1 °С, устанавливают рН (7,8±0,1) 10%-м раствором натрия гидроксида. Добавляют панкреатин из расчета 1 г/л, предварительно разведенный в небольшом количестве нагретой до 44 °С воды, размешивают и ставят в термостат для инкубации при 40±1 °С под ватной пробкой. В течение первых 2 ч перемешивание и коррекцию рН до 7,8±0,1 проводят каждые 30 мин, в следующие 2 ч — через каждый час. Через 4 ч от начала гидролиза добавляют 1–2% хлороформа, закрывают резиновой пробкой и ставят в термостат. Через 4 ч доводят рН до 4,3±0,1 30%-м раствором уксусной кислоты, кипятят, помешивая, не менее 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Готовый гидролизат должен содержать

200–300 мг/% аминного азота.

Хранят гидролизат под хлороформом (1% к объему) при температуре 4 ± 2 °С.

В небольшом объеме разведенного гидролизата расплавляют агар в количестве 2,5 г на 1 л приготавливаемой среды. К остальному гидролизату добавляют 20 г пептона и 8,5 г хлористого натрия, смесь нагревают до температуры 80 ± 5 °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. В смеси устанавливают рН $7,5\pm 0,1$, кипятят в течение 15 мин, дают отстояться, сливают с осадка, не фильтруя, доливают горячей водой до заданного объема и добавляют в нее 10 г лактозы и 0,15 г солянокислого цистина. Среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре 112 ± 2 °С в течение 30 мин, рН готовой среды $7,1\pm 0,1$. Хранят не более 1 мес. при температуре 4 ± 2 °С.

Гидролизатно-молочную среду из сухого концентрата (ГМС) готовят следующим образом: препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды, нагревают до полного растворения, фильтруют, устанавливают рН $7,1\pm 0,1$, разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при 121 ± 2 °С в течение 15 мин. Хранят не более 1 мес. при температуре 4 ± 2 °С.

Подготовка проб

Подготовку проб продукции производят в соответствии с ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов», ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа», а также в соответствии с действующими ГОСТ и ТНПА на конкретные виды продуктов.

Перед вскрытием поверхность потребительской тары с продуктом обмывают для удаления грязи, протирают 70%-м этиловым спиртом. Вскрытие упаковки производят в асептических условиях.

Отобранные образцы перемешивают и измельчают или доводят до однородной консистенции.

Из подготовленного образца готовят навеску продукта массой 10 г.

При исследовании сухих заквасок, бактериальных препаратов и концентратов бифидобактерий из подготовленного образца отбирают навеску продукта массой 1 г.

Кисломолочные продукты перед исследованием нейтрализуют (на 10 г исследуемого продукта или первого разведения для сухого кисломолочного продукта либо закваски добавляют 1 мл стерильного раствора двууглекислого натрия с массовой концентрацией 100 г/л) и тщательно перемешивают.

Приготовление разведений продукта

Для определения количества бифидобактерий из пробы пищевого продукта или исходного разведения готовят ряд разведений в соответствии с

допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта.

Для получения первого разведения продукта в каждую емкость с 10 г навески продукта добавляют 90 мл физиологического раствора, после чего смесь тщательно перемешивают. Полученная смесь — первое разведение продукта — 10^{-1} .

При исследовании сухих бактериальных концентратов и бактериальных препаратов бифидобактерий для получения первого разведения продукта в каждую емкость с 1 г навески добавляют 9 мл физиологического раствора, после чего смесь тщательно перемешивают. Полученная смесь - первое разведение продукта — 10^{-1} .

Перед посевом готовят десятикратные разведения продукта в стерильном физиологическом растворе путем добавления в 9 мл физиологического раствора, налитого в стерильную пробирку, по 1 мл предыдущего разведения продукта, с таким расчетом, чтобы последнее разведение не содержало бифидобактерий. Для приготовления каждого разведения берут новую стерильную пипетку. При приготовлении разведений все перемешивания проводят максимально осторожно, чтобы исключить насыщение кислородом.

ПРОВЕДЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Сущность метода

Метод основан на способности бифидобактерий расти в питательных средах, разлитых высоким столбиком в пробирках при температуре 37 ± 1 °С и образовывать в них через 48–72 ч колонии с типичными для бифидобактерий морфологическими характеристиками.

Проведение анализа

Готовят два ряда питательных сред, каждый не менее 4 пробирок, содержащих одну из питательных сред (Блаурокка, Бифидум-среду, кукурузно-лактозную, гидролизатно-молочную) в количестве 10 мл для высева в них соответствующих разведений исследуемого продукта.

Перед употреблением питательные среды подвергают регенерации: разогревают на кипящей водяной бане в течение 15–20 мин для снижения в них содержания растворенного кислорода. При использовании плотных питательных сред перед исследованием их следует разогреть в кипящей водяной бане до полного расплавления агара. В момент использования температура питательных сред должна составлять 38 ± 1 °С.

При определении бифидобактерий в смешанных с молочнокислыми бактериями культурах в готовые среды перед расплавлением вносят 0,2 мл неомидина из расчета на 20 мл среды.

Не менее чем из 4-х последних разведений исследуемого продукта делают посева по 1 мл в два параллельных ряда пробирок с питательной средой.

При внесении разведений продукта в питательную среду проводят тщательное перемешивание способом, исключающим попадание пузырьков

воздуха (круговыми движениями руки или с помощью шуттель-аппарата, имитирующими центрифугирование). Для каждого посева берут новую стерильную пипетку.

Посевы выдерживают в термостате при температуре 37 ± 1 °С в течение 72 ч. Допускается предварительный учет через 48 ч с последующим окончательным учетом через 72 ч.

В случае определения бифидобактерий в смешанных с молочно-кислыми бактериями культурах посевы инкубируют от 3 до 5 сут.

Обработка результатов

По окончании инкубации учитывают последние пробирки, в которых выросли колонии, типичные для бифидобактерий, — в виде «гвоздиков», «тяжей», «комет», «зонтиков», «полос», крупных «дисков» или «гречишного зерна». Выросшие колонии подсчитывают.

Подтверждение наличия бифидобактерий осуществляют методом микроскопирования. Для этого из изолированных колоний готовят мазки, окрашенные по Граму или метиленовым голубым.

При приготовлении препарата на чистое предметное стекло наносят петлей материал из колонии или небольшую каплю предварительно суспендированного исследуемого материала и распределяют его на площади около 1 см^2 . Препарат высушивают при комнатной температуре, фиксируют на пламени горелки. Окрашивают по Граму или метиленовым голубым. Бифидобактерии окрашиваются по Граму положительно. В мазках они имеют вид тонких прямых или слегка изогнутых палочек с бифуркацией на одном или обоих концах, или без нее. Располагаются группами в виде снежинок, английской буквы V или скоплений в виде иероглифов, могут иметь вид тонких мелкозернистых палочек, образовывать короткие цепочки.

Количество бифидобактерий в анализируемом продукте N , КОЕ/г, вычисляют по формуле:

$$N = a10^n,$$

где a — среднеарифметическое количество колоний бифидобактерий в последнем, засеянном в двух рядах разведений продукта, КОЕ/г (см^3);

10 — коэффициент кратности разведения продукта;

n — показатель последнего разведения продукта, в котором отмечен рост бифидобактерий.

Для удобства подсчетов можно пользоваться указанной схемой:

Номера пробирок, в которых проводят учет роста бифидобактерий		Разведение продукта
1-й ряд	2-й ряд	
№ 1 ¹	№ 1 ²	10^{-4}
№ 2 ¹	№ 2 ²	10^{-5}
№ 3 ¹	№ 3 ²	10^{-6}
№ 4 ¹	№ 4 ²	10^{-7}
№ 5 ¹	№ 5 ²	10^{-8}

Пример расчета

При исследовании образца в пробирках № 3 выросло пять типичных колоний бифидобактерий в первом ряду, три колонии — во втором ряду. Вычисляют среднее из двух значений, и результат будет записан следующим образом: «Количество бифидобактерий составляет $4,0 \times 10^6$ КОЕ/г (см^3) продукта».

Для определения истинного количества бифидобактерий в средах с неомицином результат следует удвоить.