



มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก. 2239 – 2548

ISO 15214 : 1998

จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ –
วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส

MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS – HORIZONTAL
METHOD FOR THE ENUMERATION OF MESOPHILIC LACTIC ACID
BACTERIA – COLONY – COUNT TECHNIQUE AT 30 °C

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 07.100.30

ISBN 974-1506-66-7

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ –
วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
โดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส

มอก. 2239 – 2548

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 122 ตอนที่ 117 ง
วันที่ 15 ธันวาคม พุทธศักราช 2548

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 957
มาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตรด้านจุลชีววิทยา

ประธานกรรมการ

นางเพ็ญศรี รอดมา

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรรมการ

นายปรีชา ธรรมนิยม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

นางสมคิด รื่นภาคภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

นางนิรชา วงษ์จินดา

กรมประมง

นางสุทธิพร พิริยานน

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์

นายพลายแก้ว ไชยเบญจวงศ์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

นางมาลัย บุญรัตน์กรกิจ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นางพรณี ตัญเต็มวงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นายธงชัย เฉลิมชัยกิจ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวเรณู ทวีชชาติวิทยากุล

สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

นางศศิธร คณะรัตน์

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บริษัท เซ้าท์อีสต์เอเซียเนลลาบอราทอรี จำกัด (ซีล)

สถาบันอาหาร

นางสาวอจจรา วีระยุทธวิไล

นางนิตยา พิระภักษ์สุริยา

นางสาวอรรธยา เกียรติสุนทร

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม

สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

กรรมการและเลขานุการ

นายณฤทธิ์ ฤกษ์ม่วง

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารและอาหารสัตว์มีความหลากหลาย มาตรฐานวิธีวิเคราะห์ที่กำหนดนี้ เป็นมาตรฐานที่ใช้ได้ทั่วไป ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์บางชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจงทำให้มีความจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างด้วยเหตุผลทางเทคนิค อย่างไรก็ตามวิธีมาตรฐานนี้ไปใช้ให้มากที่สุด ข้อมูลจากการนำมาตรฐานนี้ไปใช้ และเหตุผลที่ต้องใช้วิธีที่แตกต่างกันจะนำไปพิจารณาเมื่อมีการทบทวนมาตรฐานฉบับนี้ในครั้งต่อไป

การปรับวิธีวิเคราะห์ให้สอดคล้องกันนั้น ไม่อาจกระทำได้ทันทีเนื่องจากอาจมีมาตรฐานระหว่างประเทศและ/หรือมาตรฐานของประเทศสำหรับผลิตภัณฑ์หรือกลุ่มของผลิตภัณฑ์เฉพาะอยู่แล้ว ซึ่งไม่สอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานนี้ เป็นที่คาดว่าในการทบทวนมาตรฐานเหล่านั้นจะได้มีการปรับเปลี่ยนให้สอดคล้องกับมาตรฐานนี้ เพื่อให้มีความแตกต่างอันเนื่องมาจากความจำเป็นด้วยเหตุผลทางเทคนิคเท่านั้น

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 957 มาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตรด้านจุลชีววิทยา รับผิดชอบงานของคณะอนุกรรมการคณะที่ 9 ภายใต้กรรมการวิชาการคณะที่ 34 ขององค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน เป็นผู้จัดทำมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้จัดทำขึ้นเพื่อให้ทันกับความต้องการของผู้ใช้ และจักได้แปลเป็นภาษาไทยในโอกาสอันสมควร หากมีข้อสงสัยโปรดติดต่อสอบถามที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตาม มาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511



ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 3400 (พ.ศ. 2548)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์-วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

โดยเทคนิคการนับดิสก์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์-วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเทคนิคการนับดิสก์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มาตรฐานเลขที่ มอก. 2239-2548 ไว้ ดังมีรายละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2548

(นายสุริยะ จึงรุ่งเรืองกิจ)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์ -
วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
โดยเทคนิคการนับจำนวนโคโลนีที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนดขึ้นโดยรับมาตรฐาน ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-Colony count technique at 30 °C มาใช้โดยวิธีพิมพ์ซ้ำในระดับเหมือนกันทุกประการ

มาตรฐานฉบับนี้กำหนดวิธีวิเคราะห์โดยการตรวจนับจำนวนโคโลนีมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต และเป็นชนิดที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน สำหรับการวิเคราะห์อาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไป

ข้อสังเกต ผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดอาจมีเชื้อประเภทไซโคโทรฟิกรหรือเทอร์โมฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิในการเพาะเชื้อที่ต่างไปจาก 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดไม่เจริญบน เอ็มอาร์เอส อะการ์ที่มีค่าพีเอช 5.7 และบางชนิดเจริญได้ไม่ดี

หลักการมีดังนี้

- 1) เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มอาร์เอส อะการ์ ที่มีค่าพีเอช 5.7 โดยเทคนิค poured plate หรือ spread plate โดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่แน่นอน
- 2) บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง
- 3) คำนวณจำนวนเชื้อของมีโซฟิลิกแลคติกแบคทีเรียเชื้อของมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อตัวอย่าง 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 °C

1 Scope

This International Standard specifies a horizontal method for the enumeration of viable mesophilic lactic acid bacteria by counting the colonies growing in a solid medium after incubation at 30 °C for 3 days.

NOTE In some food products, there exist psychotrophic or thermophilic lactic acid bacteria necessitating culture temperatures different from 30 °C. Moreover, not all lactic acid bacteria grow on MRS agar at pH 5,7 and some grow only weakly.

Subject to the limitations discussed in the introduction and in the note above, this International Standard is applicable to products intended for human consumption or animal foodstuffs.

2 Normative references

The following standards contain provisions which, through reference in this text, constitute provisions of this International Standard. At the time of the publication, the editions indicated were valid. All standards are subject to revision, and parties to agreement based on the International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of the standards indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 6887-1:—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.*

ISO 7218:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations.*

3 Definitions

For the purposes of this International Standard, the following definition applies.

3.1

mesophilic lactic acid bacteria

bacteria which form colonies at 30 °C in a solid selective medium (MRS at pH 5,7) under the test conditions specified in this International Standard

¹⁾ To be published. (Revision of ISO 6887:1983)

4 Principle

4.1 Preparation of two dishes using MRS agar at pH 5,7 contained in Petri dishes. Poured-plate or possibly surface²⁾ inoculation of the dishes with a specified quantity of the test sample if the initial product is liquid, or with a specified quantity of the initial suspension in the case of other products.

4.2 Inoculation of other pairs of dishes, under the same conditions, using decimal dilutions of the test sample or of the initial suspension.

Incubation of the dishes at 30 °C for 72 h.

4.3 Calculation of the number of mesophilic lactic acid bacteria (3.1) per gram or per millilitre of test sample from the number of colonies obtained in 4.2 in the dishes selected, and possibly confirmed³⁾.

5 Diluent and culture medium

5.1 General

For current laboratory practice, see ISO 7218.

5.2 Diluent

See ISO 6887-1.

NOTE The buffered peptone water does not always allow satisfactory resuscitation of lactic acid bacteria (see annex A, references [1], [2], [3]).

5.3 Culture medium: MRS medium (de Man, Rogosa and Sharpe) at pH 5,7 (see reference [4])

NOTE The use of commercially available ready-to-use media is acceptable. However, attention is drawn to the fact that variations in composition and pH may occur between products from different manufacturers and could therefore give results different from the ones obtained with the medium as specified in this International Standard.

5.3.1 Composition

| | |
|---|----------------------------|
| Enzymatic digest of casein | 10,0 g |
| Meat extract | 10,0 g |
| Yeast extract | 4,0 g |
| Triammonium citrate [(NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇] | 2,0 g |
| Sodium acetate (CH ₃ COONa) | 5,0 g |
| Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0,2 g |
| Manganese sulfate tetrahydrate (MnSO ₄ ·4H ₂ O) | 0,05 g |
| Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄) | 2,0 g |
| Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 20,0 g |
| Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80) | 1,08 g |
| Agar | 12 g to 18 g ¹⁾ |
| Water | 1 000 ml |
| 1) Depending on the gel strength of the agar. | |

²⁾ See note 1 in 9.2.

³⁾ See note 2 in 9.3.

5.3.2 Preparation

5.3.2.1 Dissolve the components or the dehydrated complete medium in the water by boiling.

Using the pH-meter (6.7), adjust the pH so that after sterilization it is $5,7 \pm 0,1^4$ at 25 °C.

Transfer the medium to bottles of appropriate capacity.

Sterilize for 15 min in the autoclave (6.1) set at 121 °C.

If the medium is to be used immediately, cool it before use to approximately 47 °C in the water bath (6.5), or by any other technique giving equivalent results (see ISO 7218).

If not, in order to avoid any delay when pouring the medium before beginning the microbiological examination, completely melt the medium, in a boiling water bath (6.6), then cool it to approximately 47 °C in the water bath (6.5).

5.3.2.2 If there is a risk of extensive yeast contamination (e.g. in dried sausage), add sorbic acid to the MRS medium as follows.

Dissolve 1,4 g of sorbic acid in about 10 ml of a 1 mol/l solution of sodium hydroxide. Sterilize by filtration. Add this solution to 1 000 ml of sterilized MRS agar, previously cooled to approximately 47 °C. The final pH of the medium shall be $5,7 \pm 0,1$ at 25 °C.

6 Apparatus and glassware

Usual microbiological laboratory apparatus (see ISO 7218) and, in particular, the following.

6.1 Apparatus for dry sterilization (oven) or wet sterilization (autoclave)

See ISO 7218.

6.2 Incubator, capable of operating at $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Petri dishes, made of glass or plastic, of diameter 90 mm to 100 mm.

6.4 Total-delivery graduated pipettes, of nominal capacity 10 ml and 1 ml, graduated respectively in 0,5 ml and 0,1 ml divisions.

6.5 Water bath, or similar apparatus, capable of operating at $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.6 Boiling water bath.

6.7 pH-meter, capable of being read to the nearest 0,01 pH unit at 25 °C, enabling measurements to be made which are accurate to $\pm 0,1$ pH unit.

7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this International Standard. If there is no specific International Standard dealing with sampling of the product concerned, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

⁴⁾ In order that the pH-value does not fall below 5,6, the tolerance here is $\pm 0,1$ instead of $\pm 0,2$ as usual.

It is important that the laboratory receive a sample which is truly representative and has not been damaged or changed during transport or storage (see ISO 7218).

8 Preparation of test sample

Prepare the test sample in accordance with the specific International Standard appropriate to the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

9 Procedure

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

Prepare the initial suspension and dilutions in accordance with ISO 6887-1.

9.2 Inoculation and incubation

NOTE 1 Surface plating in combination with incubation under anaerobic or microaerobic conditions can be applied instead of the pour-plating procedure described. Candle jars may be used to obtain appropriate conditions.

NOTE 2 It is also possible to use a double-layer MRS medium.

9.2.1 Take two sterile Petri dishes (6.3). Using a sterile pipette (6.4), transfer to each dish 1 ml of the test sample if the product is liquid, or 1 ml of the initial suspension in the case of other products.

Take two other sterile Petri dishes. Using a fresh sterile pipette, transfer to each dish 1 ml of the first decimal dilution of the test sample if the product is liquid, or 1 ml of the first decimal dilution of the initial suspension in the case of other products.

Repeat the procedure described with the further dilutions, using a fresh sterile pipette for each decimal dilution.

NOTE If high numbers of lactic acid bacteria are expected, it is possible to inoculate only those dilutions necessary to be able to enumerate according to the general case (see 10.1).

9.2.2 Pour into each Petri dish approximately 15 ml of the MRS medium (5.3) which has been prepared then cooled to approximately 47 °C in the water bath (6.5).

Carefully mix the inoculum with the medium and allow the mixture to solidify.

9.2.3 Invert the prepared dishes and incubate them in the incubator (6.2) set at 30 °C for 72 h ± 3 h.

Avoid desiccation of the agar during incubation so that the medium does not become too inhibitory.

9.3 Counting of colonies

After the specified period of time (see 9.2.3), count the colonies in each dish (see notes 1 and 2).

Retain dishes containing fewer than 300 colonies at two successive dilutions, and more than 15 colonies on at least one dish.

NOTE 1 Some *Leuconostoc* spp. may form large slimy colonies which may hinder the development of other colonies, thus causing an underestimation of the number of lactic acid bacteria.

NOTE 2 Due to the possible development of microorganisms other than lactic acid bacteria on MRS medium, as described in 9.2, it may be necessary in some cases and for some products to confirm the colonies obtained in 9.2 by simple techniques (such as Gram staining, or the test for catalase). Such a procedure, if conducted, should be mentioned in the test report.

10 Expression of results

10.1 General case

Calculate the number N of mesophilic lactic acid bacteria present in the test sample, as the weighted mean from two successive dilutions, using the equation:

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

where

- $\sum C$ is the sum of the colonies counted on all the dishes from two successive dilutions, at least one of which contains at least 15 colonies;
- V is the volume of inoculum applied to each dish, in millilitres;
- n_1 is the number of dishes retained at the first dilution;
- n_2 is the number of dishes retained at the second dilution;
- d is the dilution factor corresponding to the first dilution retained.

Round off the results calculated to two significant figures (see ISO 7218).

Take as the result the number of mesophilic lactic acid bacteria per millilitre (liquid products) or per gram (other products), expressed as a number between 1,0 and 9,9 multiplied by the appropriate power of 10.

EXAMPLE

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\,182$$

Rounding off to two significant figures gives 19 000 or $1,9 \times 10^4$ mesophilic lactic acid bacteria per gram of product.

10.2 Estimation of low numbers

10.2.1 If the two dishes, at the level of the test sample (liquid products) or of the initial suspension (other products) contain less than 15 colonies, calculate the arithmetical mean y of the colonies counted on two dishes.

Express the results as follows:

- for liquid products: estimated number of mesophilic acid bacteria per millilitre $N_E = y$;
- for liquid products: estimated number of mesophilic lactic acid bacteria per gram $N_E = y/d$;

where d is the dilution factor of the initial suspension.

10.2.2 If the two dishes, at the level of the test sample (liquid products) or of the initial suspension (other products) do not contain any colonies, express the results as follows:

- less than 1 mesophilic lactic acid bacterium per millilitre (liquid products);
- less than $1/d$ mesophilic lactic acid bacterium per gram (other products);

where d is the dilution factor of the initial suspension.

11 Confidence limits

For calculation of the confidence intervals, see ISO 7218.

12 Test report

The test report shall specify:

- all information necessary for the complete identification of the sample;
- the sampling method used, if known;
- the test method used, with reference to this International Standard;
- all operating details not specified in this International Standard, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the test result(s);
- the test result(s) obtained;
- if the repeatability has been checked, the final quoted result obtained.

Annex A (informative)

Bibliography

- [1] HARTMAN, P.A. and HUNTSBERGER, D.V. Influence of subtle differences in plating procedure on bacterial counts of prepared frozen foods. *J. Appl. Microbiol.*, **9**, 1961, p. 32.
- [2] JAYN-WILLIAMS, D.J. Report of a discussion on the effect of the diluent on the recovery of bacteria *J. Appl. Bacteriol.*, **26**, 1963, p. 398.
- [3] KING, W.L. and HURST, A. A note on the survival of some bacteria in different diluents. *J. Appl. Bacteriol.*, **26**, 1963, p. 504.
- [4] Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: de De Man, Rogosa and Sharpe agar with sorbic acid (MRS-S agar). *Int. J. Food Microbiol.*, **5**, 1987, pp. 230-232.