ГОСТ 29185—91

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СУЛЬФИТРЕДУЦИРУЮЩИХ КЛОСТРИДИЙ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 663/.664:543.9:006.354 Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий

Food products. Methods for detection and quantity determination of sulphite-reducing clostridium

ГОСТ 29185—91

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления в определенной навеске пищевого продукта сульфитредуцирующих клостридий и два метода определения их количества: метод наиболее вероятного числа (НВЧ) и метод посева в агаризованную среду.

Методы основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в железосульфитсодержащие среды, инкубировании посевов при (37 ± 1) °С не более 72 ч, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам к сульфитредуцирующим клостридиям.

Метод определения количества сульфитредуцирующих клостридий посевом в агаризованную среду предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г более 150 или в 1 $см^3$ более 15 сульфитредуцирующих клостридий.

Метод определения НВЧ предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г менее 150, но в 10 г более 3 или в 1 $см^3$ менее 15, но в 100 $см^3$ более 3 сульфитредуцирующих клостридий.

Требования настоящего стандарта являются обязательными.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Отбор и подготовка проб пищевых продуктов — по ГОСТ 26668, ГОСТ 26669.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Для проведения испытания применяют аппаратуру, материалы и реактивы по ГОСТ 10444.1 со следующими дополнениями:

весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104* с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и пределом допускаемой погрешности ± 2 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания до 1 кг и пределом допускаемой погрешности ± 10 мг (для взвешивания продукта);

микроскоп световой биологический, обеспечивающий увеличение 900—1000×;

стекла предметные по ГОСТ 9284;

стекла покровные по ГОСТ 6672;

железа (III) цитрат ($C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$);

железа (III) аммония цитрат $C_6H_5O_7Fe \cdot C_6H_6O_7(NH_4)_2$ или $C_6H_5O_7Fe \cdot C_6H_7O_7NH_4$;

железо треххлористое, 6-водное ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$).

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 (здесь и далее).

Издание официальное ★ **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1992
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление растворов и реактивов

3.1.1. Раствор сульфата железа ($FeSO_4$) концентрацией 80 г/дм^3: 8,0 г сульфата железа переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки. При использовании соли в виде кристаллогидратов проводят соответствующий пересчет на безводную соль.

3.1.2. Раствор аммония железа (III) сульфата $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ концентрацией 50 г/дм^3: 5,0 г аммония железа (III) сульфата переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

3.1.3. Раствор железа (III) аммония цитрата концентрацией 50 г/дм^3: 5,0 г железа (III) аммония цитрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

3.1.4. Раствор железа треххлористого ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) концентрацией 80 г/дм^3: 8,0 г железа трехлористого гексагидрата переносят в колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

3.1.5. Раствор сульфита натрия (натрия сернистокислого), концентрацией 100 г/дм^3: 10,0 г натрия сернистокислого переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки.

3.1.6. Растворы, приготовленные по пп. 3.1.1—3.1.5, стерилизуют текучим паром в течение 1 ч.

3.1.7. Раствор железа (III) цитрата ($C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$) концентрацией 50 г/дм^3: 5,0 г железа (III) цитрата пентагидрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки. Раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

3.1.8. Растворы и реактивы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

3.1.9. Растворы и реактивы для окраски бактериальных спор готовят по ГОСТ 10444.1.

3.1.10. Реактив для определения каталазы готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2. Приготовление питательных сред

3.2.1. Голодный агар готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.2. Мясную воду готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.3. Мясо-пептонный агар (бульон) с 0,1 % глюкозы и дрожжевым экстрактом готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.4. Среду из сухого питательного агара с глюкозой готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.5. Железосульфитная среда: к 1 дм^3 дистиллированной воды добавляют 10,0 г триптона, 0,5 г сульфита натрия, 0,5 г железа (III) цитрата, 15,0 г агара (при приготовлении агаризованной среды) или 1,5 г агара (при приготовлении вязкой среды). Растворяют компоненты при нагревании, после этого смесь охлаждают до (50 ± 5) °С. Устанавливают pH среды таким образом, чтобы он составлял (7,1 ± 0,1) (в пересчете на (25 ± 1) °С). Среду разливают в пробирки по 10—12 см^3 или колбы и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Триптон может быть заменен на равноценную навеску сухого панкреатического гидролизата казеина или на десятикратный объем жидкого панкреатического гидролизата казеина, а триптон и 1 дм^3 воды могут быть заменены на 1 дм^3 мясной воды, приготовленной по п. 3.2.2.

3.2.6. Триптозо-сульфит-циклосериновый агар готовят по ГОСТ 10444.9.

3.2.7. Дифференциальная улучшенная клостридиальная среда: в 800 см^3 воды вносят 10,0 г пептона, 1,5 г дрожжевого экстракта или 7,5 см^3 дрожжевого экстракта, приготовленного по ГОСТ 10444.1, 5,0 г уксуснокислого натрия. Отдельно 1,0 г растворимого крахмала вносят в небольшую порцию воды и при непрерывном помешивании переносят в кипящую воду, доводя объем до 200 см^3 и получая крахмальный клейстер. Полученный клейстер смешивают с 800 см^3 смеси, содержащей остальные компоненты, добавляют 15,0 г агара при приготовлении плотной среды или 1,5 г агара при приготовлении вязкой среды и кипятят 30 мин. Доводят объем среды до 1 дм^3, добавляют 1,0 г глюкозы и 0,5 г *L*-цистеина гидрохлорида, охлаждают среду до (50 ± 5) °С. Устанавливают pH таким образом, чтобы он составлял (7,1 ± 0,1) (в пересчете на (25 ± 1) °С). Среду разливают мерно в колбы и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Перед использованием к 100 см^3 среды добавляют 0,4 см^3 раствора сульфита натрия, приготовленного по п. 3.1.5, и 2 см^3 раствора железа (III) цитрата, приготовленного по п. 3.1.7. При необходимости среду разливают в пробирки по 10—12 см^3.

3.2.8. Среда Вильсон-Блера (агаризованная), измененная для анаэробов: к 1 дм^3 стерильного, расплавленного и охлажденного до (80 ± 1) °С мясо-пептонного агара, приготовленного по п. 3.2.3, или среды, приготовленной по п. 3.2.4, добавляют 10 см^3 раствора сульфита натрия, приготовленного по п. 3.1.5, и 1 см^3 раствора аммония железа (III) сульфата, приготовленного по п. 3.1.2. Среду хранят в защищенном от света месте при (6 ± 2) °С не более 7 сут.

Допускается заменять раствор аммония железа (III) сульфата раствором железа (III) аммония цитрата или раствором сульфата железа ($FeSO_4 \cdot 5H_2O$), или раствором железа (III) цитрата, при этом также используют растворы концентрацией 50 г/дм^3.

Если использовать раствор сульфата железа, приготовленный по п. 3.1.1, то на 1 дм^3 среды его добавляют 0,4 см^3.

3.2.8.1. Среда Вильсон-Блера (вязкая), измененная для анаэробов: к 1 дм^3 мясо-пептонного бульона с 0,1 % глюкозы и дрожжевым экстрактом, приготовленным по п. 3.2.3, добавляют 1,5 г агара. Нагревают до расплавления агара, затем охлаждают до (50 ± 5) °С. Устанавливают pH среды таким образом, чтобы он соответствовал (7,1 ± 0,1) (в пересчете на (25 ±1) °С). Среду разливают мерно в колбы и стерилизуют при (121 ±1) °С в течение 20 мин, затем к среде добавляют растворы, указанные в п. 3.2.8, для определения сульфитредуцирующей способности.

3.2.8.2. При приготовлении среды Вильсон-Блера агаризованной или вязкой допускается вместо растворов, указанных в п. 3.2.7, использовать на 100 см^3 среды для определения сульфитредуцирующей способности 4 см^3 раствора сульфита натрия, приготовленного по п. 3.1.5, и 1 см^3 раствора железа треххлористого, приготовленного по п. 3.1.4. В этом случае готовая среда не подлежит хранению.

3.2.9. Среду Китт-Тароцци без добавления агара, вазелинового масла готовят по ГОСТ 10444.1.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Определение количества сульфитредуцирующих клостридий

4.1.1. Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669 так, чтобы можно было определить в 1 г (см^3) предполагаемое количество сульфитредуцирующих клостридий или их количество, указанное в нормативно-технической документации на конкретный продукт.

4.1.2. При определении количества спор сульфитредуцирующих клостридий навеску продукта или его исходное разведение перед посевом или приготовлением десятикратных разведений прогревают при температуре (80 ± 1) °С в течение 20 мин. Для прогрева 50 см^3 исходного разведения или жидкого продукта помещают в стерильную колбу вместимостью 100 см^3 таким образом, чтобы анализируемая проба не размазывалась по стенкам колбы.

Колбу с продуктом или его исходным разведением помещают в предварительно нагретую до (80 ± 1) °С водяную баню. При этом уровень находящейся в колбе пробы должен быть на 2—3 см ниже, чем уровень воды в бане. Одновременно в водяную баню помещают контрольную колбу, содержащую 50 см^3 исходного разведения или продукта, и термометр.

Время термообработки начинают отсчитывать с того момента, когда содержащееся в колбе исходное разведение или продукт достигнут указанной температуры. После термообработки колбу немедленно охлаждают под струей водопроводной воды.

4.1.3. При определении количества сульфитредуцирующих клостридий по методу НВЧ высевают три последовательных навески продукта и (или) его разведения, отличающиеся друг от друга по количеству высеваемого продукта в 10 раз. Каждую навеску продукта и (или) его разведение высевают в пробирки с одной из вязких питательных сред, приготовленных по п. 3.2.5 или 3.2.7, или 3.2.8.1, или 3.2.8.2. Соотношение количества высеваемого продукта или его разведения к питательной среде 1:9.

4.1.4. При определении количества сульфитредуцирующих клостридий методом посева в агаризованные среды по 1 см^3 навески продукта или его разведения вносят в две чашки Петри. Посевы заливают по ГОСТ 26670 одной из агаризованных сред, приготовленных по п. 3.2.5 или 3.2.7, или 3.2.8, или 3.2.8.2, или 3.2.6.

После затвердения среды в чашки Петри для образования второго слоя вливают еще 10 см^3 голодного агара.

4.2. Определение присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий

При определении присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий в определенной

навеске продукта или его эквивалентном разведении эту навеску или разведение вносят в одну из вязких питательных сред, приготовленных по п. 3.2.5 или 3.2.7, или 3.2.8.1, или 3.2.8.2.

4.3. Посевы по пп. 4.1.3, 4.1.4 и 4.2 инкубируют при (37 ± 1) °С не более 72 ч. Посевы на чашках Петри инкубируют в анаэробных условиях по ГОСТ 30425. Ежедневно посевы просматривают для обнаружения признаков роста сульфитредуцирующих микроорганизмов — почернения сульфитной среды.

4.4. Из посевов в вязкие среды отбирают пробки с признаками роста – отдельными черными колониями или полностью почерневшей питательной средой на глубине свыше 1 см. Из отобранных пробирок проводят пересевы петлей в чашки Петри на поверхность одной из агаризованных сред, приготовленных по п. 3.2.5 или 3.2.6, или 3.2.7, или 3.2.8, или 3.2.8.2 так, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют в анаэробных условиях при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

4.5. Из посевов на агаризованные среды (см. п. 4.1.4) отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 150 характерных колоний.

4.6. Не менее 5 овальных черных или окруженных черным или серым ореолом колоний диаметром 4—5 мм, отобранных по п. 4.4 или 4.5, высевают раздельно в свежерегенерированную по ГОСТ 30425 среду, приготовленную по п. 3.2.9.

Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С не более 48 ч.

4.7. Подтверждение принадлежности выделенных сульфитредуцирующих микроорганизмов к роду Clostridium

4.7.1. Микроскопирование

Из культур выросших, как указано в п. 4.6, готовят два препарата и окрашивают по ГОСТ 30425, первый — по Граму, второй — для выявления бактериальных спор.

Сульфитредуцирующие клостридии представляют собой грамположительные палочки, располагающиеся в одиночку, попарно, в виде цепочек или скоплений параллельных клеток. При спорообразовании споры сульфитредуцирующих клостридий овальные или сферические, субтерминальные или терминальные.

4.7.2. Определение отсутствия каталазы

Отсутствие каталазы в культурах, выросших, как указано в п. 4.6, определяют по ГОСТ 30425.

Сульфитредуцирующие клостридии каталазу не образуют.

4.7.3 Подтверждение анаэробного роста

Подтверждение анаэробного роста проводят посевом по ГОСТ 30425 культур, выросших, как указано в п. 4.6, в чашки Петри под стекло или в трубки Вейона. Для посева используют одну из агаризованных питательных сред, приготовленных по п. 3.2.5 или 3.2.6, или 3.2.7, или 3.2.8, или 3.2.8.2. Посевы инкубируют в аэробных условиях при (37 ± 1) °С в течение 18—72 ч.

Для сульфитредуцирующих клостридий характерен анаэробный рост.

Допускается взамен подтверждения анаэробного роста проводить определение отсутствия роста в аэробных условиях. При этом культуры высевают в чашки Петри на поверхность агаризованной среды.

Посевы инкубируют в аэробных условиях при (37 ± 1) °С в течение 18—72 ч.

5. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Результаты испытания оценивают по каждой пробе отдельно.

5.2. Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств обнаружены сульфитредуцирующие грамположительные, каталазоотрицательные, способные расти в анаэробных условиях микроорганизмы, то дают заключение о том, что эти микроорганизмы относятся к сульфитредуцирующим клостридиям.

5.3. Если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, то есть не менее чем в 4 из 5 колоний подтвержден рост сульфитредуцирующих клостридий, то считают, что все характерные колонии, выросшие на чашке Петри (см. п. 4.5), принадлежат к этой группе. В остальных случаях количество сульфитредуцирующих клостридий определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для подтверждения.

5.4. При определении НВЧ или при определении присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий в определенной навеске продукта посевы в вязкие среды считают положительными,

если при последующем пересеве и подтверждении характерных колоний хотя бы в одной колонии будут обнаружены сульфитредуцирующие клостридии.

5.5. Пересчет количества сульфитредуцирующих клостридий на 1 г ($см^3$) продукта проводят по ГОСТ 26670.

5.6. НВЧ сульфитредуцирующих клостридий в 1 г ($см^3$) продукта определяют по количеству положительных пробирок, пользуясь таблицей, приведенной в ГОСТ 29184.

5.7. Результаты определения количества сульфитредуцирующих клостридий записывают по ГОСТ 26670.

5.8. Результаты выявления присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий с указанием навески продукта записывают следующим образом: сульфитредуцирующие клостридии обнаружены (или не обнаружены).

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Всесоюзным научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП), ТК 93 «Продукты переработки плодов и овощей»

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 23.12.91 № 2050

3. Настоящий стандарт соответствует ИСО 7937—85 в части выявления колоний, характерных для сульфитредуцирующих микроорганизмов

4. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта, подпункта
ГОСТ 6672—75	2
ГОСТ 9284—75	2
ГОСТ 10444.1—84	2; 3.1.8; 3.1.9; 3.1.10; 3.2.1; 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4; 3.2.7; 3.2.9
ГОСТ 10444.9—88	3.2.6
ГОСТ 24104—88	2
ГОСТ 26668—85	1
ГОСТ 26669—85	1; 4.1.1
ГОСТ 26670—91	3.1.7; 4.1.4; 5.5; 5.7
ГОСТ 29184—91	5.6
ГОСТ 30425—97	4.3; 4.6; 4.7.1; 4.7.2; 4.7.3

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2010 г.

gost.e-ecolog.ru