ГОСТ 10444.1—84

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОНСЕРВЫ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ, КРАСОК, ИНДИКАТОРОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ПРИМЕНЯЕМЫХ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 664.8/.9:543.9:006.354 Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОНСЕРВЫ

Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе

Canned food. Preparation of reagent solutions, dyes, indicators and culture media for microbiological analysis

ГОСТ 10444.1—84

Взамен ГОСТ 10444.1—75

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.01.84 дата введения установлена

01.07.85

Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 4—94)

Настоящий стандарт распространяется на методы приготовления растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Для приготовления растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред (если нет специальных указаний) применяют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72;

реактивы квалификации х. ч. и ч. д. а. по ГОСТ 13867—68;

вспомогательные реактивы и растворы по ГОСТ 4517—87;

растворы индикаторов по ГОСТ 4919.1—77.

1.2. Растворы реактивов, красок, индикаторов приготовляют, используя стеклянную, лабораторную, мерную посуду, вымеренную для слива, класса А; для приготовления питательных сред (если нет специальных указаний) используют стеклянную лабораторную мерную посуду, вымеренную для слива, класса Б.

1.3. Питательные среды приготовляют в эмалированной или стеклянной посуде. Новую стеклянную посуду, в том числе колбы, пробирки, пипетки, бактериологические чашки Петри, перед употреблением выдерживают в течение 12—24 ч в растворе соляной кислоты $c(HCl) = 0{,}25—0{,}50$ моль/дм^3, промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой и автоклавируют при температуре (121±1) °С в течение 1 ч.

1.4. Если в технологии приготовления питательных сред не указаны условия растворения питательных сред или компонентов, то их растворяют при перемешивании в воде комнатной температуры до полного растворения не менее 15 мин и затем, при необходимости, нагревают до растворения среды или ее компонентов.

1.5. Необходимое значение pH питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроокиси натрия концентрации 100 г/дм^3 или раствора лимонной кислоты концентрации 200 г/дм^3, или раствора соляной кислоты концентрации 36,5 г/дм^3, по каплям прибавляя при перемешивании раствор к питательной среде и определяя значение pH в периодически отбираемой пробе потенциометрически или с помощью индикатора. Значение pH питательных сред при стерилизации может изменяться. При подщелачивании среды щелочью pH после кипячения и стерилизации снижается примерно на 0,2, а при приготовлении сред с настоем печени — на 0,3—0,4. Поэтому при приготовлении сред устанавливают pH на 0,2—0,4 выше заданного, кипятят, пока pH не понизится на

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

★

Издание (апрель 2010 г.) с Изменением № 1, утвержденным в июле 1990 г. (ИУС 11—90)

© Издательство стандартов, 1984
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

0,2—0,3, снова проверяют pH, исправляют, при необходимости, и стерилизуют в автоклаве. Обязательно проверяют pH после стерилизации.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

1.6. Питательные среды, если нет специальных указаний, стерилизуют по ГОСТ 26668—85.

1.7. Готовые питательные среды хранят, если нет специальных указаний, при комнатной температуре не более 3 сут и при температуре около 4 °С не более одного месяца.

2. АППАРАТУРА

Для приготовления растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред применяются:

автоклав для стерилизации питательных сред;

стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569—89*;

пластины асбестовые фильтрующие и стерилизующие по ГОСТ 480—78;

баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру от 20 до 100 °С с отклонением до 1 °С от заданной;

весы лабораторные по ГОСТ 24104—88**;

воронки для горячего фильтрования;

воронки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

гомогенизатор или смеситель лабораторный;

горелка газовая или спиртовка по ГОСТ 25336—82;

дистиллятор электрический марки Д № 9;

капельницы;

кастрюли разные;

колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости по ГОСТ 25336—82;

кюветы разные для окрашивания препаратов;

марля медицинская по ГОСТ 9412—93;

мясорубка по ГОСТ 4025—95;

ножи;

ножницы;

палочки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

пинцеты по ГОСТ 21241—89;

пипетки Мора;

пипетки разной вместимости;

плитка электрическая по ГОСТ 14919—83;

pH-метр;

пробирки разной вместимости по ГОСТ 25336—82;

промывалка;

рефрактометр;

ареометр по ГОСТ 18481—81;

сетки асбестовые;

стекла часовые;

ступки фарфоровые по ГОСТ 9147—80;

термометры химические от 0 до 50 °С и от 50 до 100 °С по ГОСТ 28498—90;

термостаты, позволяющие поддерживать температуру в пределах от 28 до 55 °С с отклонением до 0,5 °С от заданной;

фильтры Зейтца;

фильтры мембранные № 2;

флаконы вместимостью 100—200 $см^3$;

холодильник по ГОСТ 16317—87;

центрифуга, обеспечивающая частоту вращения 50 $с^{-1}$ (3000 об/мин);

цилиндры разной вместимости по ГОСТ 1770—74;

часы песочные ОСТ 25—11—38—84;

чашки Петри бактериологические по ГОСТ 25336—82;

шкаф сушильный;

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51935—2002.

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

шпатели металлические;
шпатели стеклянные;
шприцы по ГОСТ 22967—90.

3. РЕАКТИВЫ, РАСТВОРЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для приготовления растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред применяются:
агар микробиологический по ГОСТ 17206—96;
агар сухой питательный;
аммоний лимоннокислый;
аммоний щавелевокислый 1-водный по ГОСТ 5712—78;
ацетон по ГОСТ 2603—79;
бром по ГОСТ 4109—79;
бромкрезолпурпур;
бромтимоловый синий;
водорода пероксид по ГОСТ 10929—76;
бумага фильтровальная по ГОСТ 12026—76;
вата гигроскопическая медицинская по ГОСТ 5556—81;
вода дистиллированная по ГОСТ 6709—72;
глицин;
глицерин по ГОСТ 6824—96;
глюкоза по ГОСТ 6038—79;
дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171—81;
желатин пищевой по ГОСТ 11293—89;
железоаммонийные квасцы;
железо (II) сернокислое 7-водное по ГОСТ 4148—78;
железо треххлористое 6-водное по ГОСТ 4147—74;
инфузорная земля;
йод по ГОСТ 4159—79;
калий азотнокислый по ГОСТ 4217—77;
калий двухромовокислый по ГОСТ 4220—75;
калий сернокислый по ГОСТ 4145—74;
калий йодистый по ГОСТ 4232—74;
калий углекислый по ГОСТ 10690—73;
калия теллурит;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75 или двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493—75;
кальций углекислый по ГОСТ 4530—76;
капуста по ГОСТ 1724—85;
картофель по ГОСТ 7176—85;
кислота аскорбиновая;
кислота лимонная пищевая по ГОСТ 908—2004;
кислота молочная пищевая по ГОСТ 490—2006;
кислота серная по ГОСТ 4204—77;
кислота соляная по ГОСТ 3118—77;
кислота уксусная по ГОСТ 61—75;
крахмал растворимый по ГОСТ 10163—76;
кристаллический фиолетовый;
кровь кролика;
кровь крупного рогатого скота, лошади или барана;
лакмус или лакмоид;
лактоза;
литий хлористый 6-водный;
маннит;

масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164—78;
медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165—78;
молоко коровье пастеризованное по ГОСТ 13277—79*;
мясо говядина по ГОСТ 779—55, мясо баранина по ГОСТ 1935—55**;
мясо-телятина по ГОСТ 779—55;
мясо-конина по ГОСТ 27095—86;
мука кукурузная по ГОСТ 14176—69;
натрия гидроокись по ГОСТ 4328—77;
натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280—76;
натрия пируват;
натрий сернистокислый;
натрий углекислый по ГОСТ 83—79;
натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773—76 и однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245—76;
натрий уксуснокислый 3-х водный по ГОСТ 199—78;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—77;
натрия азид;
1-нафтол;
парадиметиламинобензальдегид;
парафин по ГОСТ 23683—89;
панкреатин (порошок, в 1 г — 25 ед.);
поджелудочная железа убойного скота;
пирогаллол;
плазма крови кроличья или человеческая;
пепсин;
пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805—76;
печень говяжья, телячья, кроличья, не содержащая ингибиторов, роста микроорганизмов;
рыба треска или пикша, судак, щука по ГОСТ 814—96;
сахароза по ГОСТ 5833—75;
сафранин: О или Т;
солод ячменный;
соль закиси железа и аммония двойная сернокислая — соль Мора по ГОСТ 4208—72;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962—67***;
спирт этиловый сырец по ГОСТ 131—67*[4];
сок томатный по ГОСТ 937—91*[5];
трипсин;
триптон;
триптический гидролизат казеина;
триптофан;
2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорид;
уголь активный по ГОСТ 4453—74;
фенолфталеин (индикатор);
фуксин (основной и кислый);
хлороформ по ГОСТ 20015—88;
цистеина гидрохлорид;
экстракт дрожжевой сухой;
экстракт мясной;
яйца куриные по ГОСТ 27583—88*[6].

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52090—2003.
** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52843—2007.
*** На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000.
*[4] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52193—2003.
*[5] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52183—2003.
*[6] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 52121—2003.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РЕАКТИВОВ, КРАСОК, ИНДИКАТОРОВ И КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

4.1. Агар голодный

2,0 г агара растворяют в 98 см^3 дистиллированной воды, стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для наслаивания на посевы с целью предотвращения соприкосновения посевов с кислородом воздуха.

4.2. Взвесь (эмульсия) яично-желточная в физиологическом растворе.

Из яйца, протертого с поверхности спиртом с объемной долей 70 %, извлекают пипеткой желток и смешивают его со 100 см^3 физиологического раствора. Желточную эмульсию приготовляют аналогично, но берут два желтка и смешивают их с 10 см^3 физиологического раствора.

Добавляют к питательным средам для определения лецитиназной активности микроорганизмов.

Допускается яично-желточную эмульсию приготовлять следующим образом: свежие куриные яйца моют, ополаскивают холодной водой, опускают в раствор этилового спирта с объемной долей 70 % и высушивают. Соблюдая правила асептики, разбивают каждое яйцо в стерильную чашку Петри и отделяют желток от белка. Помещают желток в стерильную колбу или флакон с четырьмя объемами стерильной воды и энергично перемешивают. Нагревают смесь на водяной бане при температуре (45±1) °С в течение 2 ч, оставляют на 18—24 ч при температуре от 0 до плюс 5 °С для формирования осадка.

Соблюдая правила асептики, собирают эмульсию над осадком. Эмульсию хранят при температуре от 0 до плюс 5 °С не более 72 ч.

4.3. Вода бромная

3—3,5 см^3 брома растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Приготовляют бромную воду в вытяжном шкафу. Хранят в темной склянке с притертой пробкой в защищенном от света месте.

Применяют в качестве индикатора при определении содержания триптофана в питательных средах. При наличии триптофана в присутствии 3—4 капель бромной воды жидкость принимает розово-фиолетовую окраску.

4.2, 4.3. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

4.4. Вода пептонная

1 г пептона растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды, разливают по 10 см^3 в пробирки и по 100 см^3 в колбы. Затем стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С.

4.5. Глюкоза концентрации 5, 10, 100 и 200 г/дм^3, водные растворы

0,5; 1; 10; 20 г глюкозы переносят, смывая стерильной дистиллированной водой, в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки. Разливают приготовленный раствор глюкозы в стерильные пробирки и стерилизуют при температуре (112±1) °С в течение 15 мин или при температуре (100±1) °С в течение 3 сут по 30 мин, или фильтрованием через мембранный фильтр.

Применяют в качестве источника углеводов в питательных средах и восстанавливающего вещества в питательных средах для анаэробных микроорганизмов.

4.6. Индикатор Андреде

0,5 г кислого фуксина растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды, прибавляют 16,4 см^3 раствора гидроокиси натрия *с* (NaOH) = 1 моль/дм^3 и стерилизуют при температуре (100±1) °С в течение 5 мин. Индикатор должен иметь соломенно-желтый цвет. Хранят во флаконе из темного стекла (с притертой пробкой).

Применяют для приготовления среды Гисса.

4.7. Индикатор бромкрезолпурпур — щелочной раствор, готовят по ГОСТ 4919.1—77.

Применяют для определения кислотообразующей способности микроорганизмов.

4.8. Индикатор бромтимоловый синий – щелочной раствор, готовят по ГОСТ 4919.1—77.

Применяют для контроля pH питательных сред.

4.9. Кальций углекислый стерильный

Фасуют от 2 до 100 г углекислого кальция в пробирки колбы или флаконы и стерилизуют воздухом по ГОСТ 26668—85.

Добавляют к питательным средам, предназначенным для посева в них кислотных продуктов.

4.10. Раствор аскорбиновой кислоты концентрации 50 г/дм^3 готовят по ГОСТ 4517—87 и стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр № 2.

Применяют в качестве восстановителя, связывающего кислород в питательных средах для анаэробных микроорганизмов.

4.11. Раствор лимонной кислоты концентрации 200 г/дм^3.

20 г лимонной кислоты переносят в мерную колбу, доводят водой объем до 100 см^3, растворяют и разливают в пробирки или колбы, стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для подкисления питательных сред.

4.10, 4.11. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

4.12. Кусочки мяса, фарша, мясная вода, мясной отвар

Освобожденное от костей, жира, сухожилий мясо говядины или конины для приготовления мясного отвара режут на мелкие кусочки или для приготовления мясной воды пропускают через мясорубку, заливают водой из расчета 1 дм^3 воды на 500 г мяса и оставляют на ночь в холодильнике. На следующий день смесь мяса с водой медленно нагревают до кипения и кипятят до готовности, периодически помешивая и доливая воду до первоначального объема. Небольшое количество смеси (до 5 дм^3) можно кипятить на открытом огне, часто помешивая, чтобы не произошло пригорания частичек мяса.

Большое количество лучше кипятить в котлах с паровой рубашкой. Для определения готовности смеси фильтруют сначала небольшое количество ее в пробирку через бумажный фильтр; если жидкость прозрачна, кипячение прекращают. Смесь вновь оставляют до следующего дня в холодильнике. pH охлажденной смеси доводят до 7,0—7,2, фильтруют через ткань, отжимая из кусочков мяса или фарша всю жидкость. Мясную воду или мясной отвар и кусочки мяса или фарша стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют в качестве компонентов питательных сред.

4.13. Кусочки печени, печеночная вода, печеночные отвар и бульон

Свежую печень освобождают от пленок и жира. Для приготовления печеночного отвара режут на кусочки массой 30—40 г, для приготовления печеночной воды пропускают через мясорубку. Печень заливают водой из расчета 1 дм^3 воды на 500 г печени, выдерживают при температуре от 4 до 8 °С в течение 2 ч и кипятят в течение 20 мин. После кипячения устанавливают pH 7,0—7,2 и вновь кипятят в течение 10 мин. Смесь процеживают через ткань, жидкость используют для приготовления воды, отвара или бульона. Устанавливают pH жидкости 7,0—7,2 и доводят объем жидкости до первоначального. Печеночные воду или отвар стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Для приготовления печеночного бульона к печеночной жидкости перед стерилизацией добавляют пептон из расчета 1 г на 100 см^3 жидкости и поваренную соль из расчета 0,5 г на 100 см^3 печеночной жидкости (контролируя pH 7,0—7,2), разливают во флаконы, колбы или пробирки и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Кусочки печени разрезают на более мелкие по 1,5—3 г, заливают раствором двууглекислого натрия и кипятят в течение 10—15 мин (не допуская бурного кипения). После этого кусочки печени промывают в дуршлаге под струей водопроводной воды в течение 1 ч и несколько раз дистиллированной водой. Кусочки печени должны иметь pH 7,0—7,2; значение pH печени контролируют погружением кусочков в индикатор; бромтимоловый синий индикатор должен иметь сине-зеленую окраску. Кусочки печени фасуют в пробирки, колбы или флаконы и стерилизуют при (121±1) °С в течение 20 мин. Применяют в качестве компонентов питательных сред для анаэробных микроорганизмов.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.14. Лакмус водно-спиртовой раствор (лакмусовая настойка), приготовляют по ГОСТ 4919.1—77.

Добавляют в питательные среды для определения способности микроорганизмов к редукции лакмуса.

4.15. Масло вазелиновое

Масло разливают по 20—50 см^3 в пробирки или колбы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для наслаивания на жидкие питательные среды для анаэробных микроорганизмов.

4.16. Молоко обезжиренное

Молоко доводят до кипения, оставляют на сутки в холодильнике, освобождают от сливок, вторично доводят до кипения, вновь оставляют на 1 сут в холодильнике и вторично снимают верхний слой. Обезжиренное молоко может быть приготовлено путем сепарирования. Обезжиренное

молоко разливают в стерильную посуду и стерилизуют при температуре 100 °С в течение 3 сут по 30 мин или однократно при температуре (116±1) °С в течение 20 мин. После стерилизации молоко не должно принимать коричневый оттенок.

Обезжиренное молоко применяют в качестве компонента питательных сред.

4.17. Раствор гидроокиси натрия концентрации 100 г/дм^3 готовят по ГОСТ 4517—87.

Применяют для подщелачивания питательных сред.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.18. Пептонно-солевой раствор, готовят по ГОСТ 26669—85.

Применяют для приготовления разведений.

4.19. Пирогаллол, щелочной раствор, готовят по ГОСТ 4517—87.

Применяют для поглощения кислорода в емкостях, предназначенных для анаэробных микроорганизмов.

4.20. Цитратная плазма крови

5 см^3 свежеполученной крови, взятой из сердца кролика, помещают в центрифужную пробирку с 1 см^3 раствора лимоннокислого натрия концентрации 50 г/дм^3 (5 г лимоннокислого натрия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки). Центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин или оставляют на холоде. Плазму отделяют, разводят физиологическим раствором 1:4 и разливают в стерильные пробирки по 0,5 см^3.

Плазма кролика может быть заменена человеческой. Не допускается использовать плазму крови человека, которому незадолго до взятия крови вводилась глюкоза.

Человеческая плазма не может быть использована, если исследуемая культура выращивалась в атмосфере углекислоты. В обоих случаях происходит угнетение реакции плазмокоагуляции. Допускается использовать сухую цитратную плазму кролика.

Применяют для определения коагулазной способности микроорганизмов.

4.21. Растворы для определения сульфитредуцирующей способности клостридий: сернистокислый натрий – раствор концентрации 10 г/дм^3, сернокислое железо – раствор концентрации 4 г/дм^3.

Оба раствора стерилизуют раздельно при температуре (115±1) °С в течение 30 мин.

Добавляют по 5 см^3 каждого раствора в 100 см^3 охлажденной, регенерированной питательной среды для клостридий непосредственно перед посевом.

4.22. Раствор Люголя

2 г йодистого калия растворяют в 5—10 см^3 воды в мерной колбе вместимостью 300 см^3, добавляя 1 г кристаллического йода, оставляют на несколько часов до полного растворения йода и после этого доводят водой объем раствора до метки.

Применяют для контроля степени осахаривания сусла.

4.23. Раствор 1-нафтола

5 г 1-нафтола, имеющего точку плавления 92,5 °С, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доливают этиловым спиртом с объемной долей 96 % до метки.

Раствор применяют свежеприготовленным для контроля ацетилметилкарбинола.

4.24. Раствор панкреатина

4 г панкреатина растворяют в 100 см^3 физиологического раствора и оставляют при температуре (4±1) °С на 16—17 ч. Перед применением полученную жидкость фильтруют через плотный бумажный фильтр, а затем через стерилизующую пластинку фильтра Зейтца до получения прозрачной опалесцирующей жидкости. Готовый раствор панкреатина может сохраняться при температуре (4±1) °С в течение двух недель.

Полученный раствор в объеме 0,5 см^3 не должен убивать белую мышь массой 16—18 г при внутривенном введении. При подкожном введении морским свинкам 0,2 см^3 раствора обычно появляется некроз участка кожи размером 0,5×0,5 см.

Раствор применяют для активации протоксина возбудителей ботулизма.

4.25. Растворы и реактивы для окраски по Граму

4.25.1. Основной красящий раствор по Хукеру

2 г кристалл-виолета с массовой долей сухих веществ 85—90 % растворяют в 20 см^3 спирта;

0,8 г щавелевокислого аммония растворяют в 80 см^3 воды; растворы смешивают и выдерживают в течение 24 ч при комнатной температуре перед употреблением.

4.25.2. Йодный раствор по Бурке

2 г йодистого калия растворяют в 5—10 см^3 воды в мерной колбе вместимостью 100 см^3, добавляют 1 г кристаллического йода, оставляют на несколько часов до полного растворения йода и после этого доводят водой объем раствора до метки.

4.25.3. Контрастный красящий раствор

0,25 г сафранина растворяют в 10 см^3 спирта и полученный раствор смешивают со 100 см^3 воды.

4.25.4. Допускается использовать: в качестве основного красящего раствора – водный раствор кристаллического фиолетового концентрации 10 г/дм^3; в качестве контрастного красящего раствора – водный раствор сафранина Т концентрации 5 г/дм^3 или спиртовой раствор основного фуксина концентрации 5 г/дм^3.

Спиртовой раствор основного фуксина концентрации 5 г/дм^3 используют для выявления глобул в бациллярных клетках.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.25.5. Для удаления закрепленного основного красящего раствора используют этиловый спирт (при окраске по Хукеру) и ацетон (при окраске водным раствором кристаллического фиолетового).

4.26. Растворы и реактивы для окраски бактериальных спор

5 г малахитовой зелени растворяют в 100 см^3 воды.

Отдельно 0,5 г сафранина растворяют в 100 см^3 воды.

4.27. Раствор соляной кислоты концентрации 36,5 г/дм^3

Концентрированная соляная кислота имеет плотность 1,18—1,19 г/см^3.

При плотности концентрированной соляной кислоты 1,18 г/см^3 ее концентрация составляет 427,7 г/дм^3, поэтому для приготовления 100 см^3 раствора концентрации 36,5 г/дм^3 отбирают 8,5 см^3 концентрированной соляной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и содержащую 50—70 см^3 дистиллированной воды, а затем раствор доливают до метки дистиллированной водой.

При плотности концентрированной соляной кислоты 1,19 г/см^3 ее концентрация составляет 455,8 г/дм^3, поэтому для приготовления 100 см^3 раствора концентрации 36,5 г/дм^3 отбирают 8 см^3 концентрированной соляной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и содержащую 50—70 см^3 дистиллированной воды, а затем раствор доливают до метки дистиллированной водой.

Раствор применяют для подкисления питательных сред.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.28. Смесь реактивов для создания анаэробных условий

Смешивают 1 г пирогаллола, 1 г углекислого безводного калия и 5 г инфузорной земли и фасуют в бумажные пакеты.

Применяют для создания анаэробных условий.

4.29. Физиологический раствор

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для приготовления растворов реактивов.

4.30. Реактив йодокрахмальный, готовят по ГОСТ 4517—87. Бумагу не пропитывают.

Используют в виде раствора для контроля отсутствия нитритов в питательных средах.

4.31. Парафиновая смесь

Растапливают равные количества парафина и вазелинового масла, смешивают и стерилизуют горячим воздухом при температуре (140±1) °С в течение 60 мин.

Применяют для наслаивания на жидкие питательные среды для анаэробных микроорганизмов.

4.32. Дрожжевой экстракт

100 г пекарских прессованных дрожжей нарезают небольшими кусочками и заливают 500 см^3 воды, подобрав посуду для приготовления экстракта с учетом того, чтобы смесь занимала $^1/_5$ вместимости. Смесь ставят в термостат (сушильный шкаф) при температуре от 58 до 60 °С на 2 сут и встряхивают 1—2 раза в сутки. Конец автолиза устанавливают по полному разжижению дрожжей. Экстракт должен иметь коричневый оттенок и приятный запах.

Добавляют в питательные среды как источник веществ, способствующих регенерации поврежденных микроорганизмов.

4.33. Раствор с объемной долей перекиси водорода 3 %

10 см^3 пироксида водорода с содержанием основного вещества 30 % (в случае, если пироксид водорода имеет другое содержание основного вещества, то делается пересчет) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем дистиллированной водой до метки.

Раствор применяют для определения каталазной активности.

(Введен дополнительно, Изм. № 1).

5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

5.1. Агар Байрд-Паркер

Основа среды: в 1 дм^3 дистиллированной воды вносят 10 г триптона или пептона, 17,9 г хлористого лития 6-водного, 5 г мясного экстракта и 5 см^3 дрожжевого экстракта.

При отсутствии мясного экстракта вместо дистиллированной воды и мясного экстракта используют 1 дм^3 мясной воды или бульона Хоттингера или 1 дм^3 мясо-пептонного бульона.

При использовании мясо-пептонного бульона триптон или пептон в среду не вносят.

Все компоненты, внесенные в 1 дм^3 дистиллированной воды (мясо-пептонного бульона или бульона Хоттингера), нагревают, помешивая до полного их растворения, охлаждают до 50—60 °С. Устанавливают pH 6,8—7,0, разливают в колбы по 90 см^3 и стерилизуют при (121±1) °С в течение 20 мин. К 90 см^3 основы среды добавляют асептически 5 см^3 желточной эмульсии и стерилизованные фильтрованием через мембранный фильтр растворы: 6,3 см^3 раствора глицина концентрации 200 г/дм^3, 5 см^3 раствора пирувата натрия концентрации 200 г/дм^3 и 1 см^3 раствора теллурита калия концентрации 10 г/дм^3.

После тщательного перемешивания приготовленную среду разливают в чашки Петри. Чашки со средой можно хранить не более 48 ч.

Применяют для культивирования стафилококков.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.2. Желточный агар с ТТХ

К 500 см^3 стерильного мясо-пептонного агара, расплавленного и затем охлажденного до температуры 45°, прибавляют 20 см^3 желточной эмульсии и 25 мг 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри, хранят в холодильнике не более 10 сут.

Применяют для культивирования Bac. cereus.

5.3. Капустный агар

200 г размельченной свежей капусты добавляют в 1 дм^3 водопроводной воды, смесь доводят до кипения, кипятят в течение 10—14 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Полученный фильтрат разводят водой в два раза, добавляют к нему 20 г глюкозы, 10 г пептона, 10 г углекислого кальция расплавляют в нем при нагревании 15—20 г агара. Устанавливают pH среды 7,0—7,4, разливают в стерильные колбы. Стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С.

5.4. Молочно-солевой агар

Непосредственно перед посевом к 1 дм^3 расплавленного и охлажденного до температуры 60—70 °С мясо-пептонного агара, содержащего 65 г хлористого натрия, добавляют 100 см^3 стерильного обезжиренного молока. Устанавливают pH (7,4±0,1), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Применяют для культивирования стафилококков.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.5. Печеночный агар

К 500 см^3 печеночной воды доливают 500 см^3 водопроводной воды, добавляют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия и 20—30 г агара. Среду кипятят на слабом огне до растворения агара, устанавливают pH 6,8—7,0, разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов.

5.6. Сахарный кровяной агар по Цейсслеру

К 100 см^3 расплавленного и охлажденного до температуры 50 °С мясо-пептонного агара добав-

ляют 10 см³ раствора глюкозы концентрации 200 г/дм³ и 15–20 см³ свежевзятой стерильной дефибринированной крови крупного рогатого скота, лошадей, овец. Смесь осторожно взбалтывают, избегая образования пены и пузырей и разливают по чашкам Петри, среду подсушивают по ГОСТ 26670—91 и хранят не более 2 сут при температуре (4±1) °С. Среда должна иметь pH 7,2—7,4.

Применяют для определения гемолитической активности микроорганизмов.

5.7. Яично-желточно-азидный агар

10 г пептона, 3 г хлористого натрия, 0,2 г двузамещенного фосфорнокислого натрия, 15 г агара, 5,5 г мясного экстракта растворяют при подогревании в 1 дм³ дистиллированной воды. При отсутствии мясного экстракта используют мясную воду. В этом случае все компоненты растворяют в 1 дм³ мясной воды. Устанавливают pH среды (7,6±0,1), стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 30 мин, охлаждают до температуры 50–60 °С, добавляют 0,15 г азида натрия, смешивают, вновь стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 30 мин, охлаждают до температуры 50 °С, добавляют 150 см³ яично-желточной взвеси, смешивают и разливают по 15 см³ в чашки Петри.

Применяют для культивирования стафилококков.

5.8. Яично-желточно-солевой агар

1 дм³ мясо-пептонного агара перед анализом расплавляют и растворяют в нем 95 г хлористого натрия, охлаждают до температуры (45±1) °С и добавляют 100 см³ яично-желточной взвеси. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. Чашки хранят в холодильнике не более 5 сут.

Применяют для культивирования стафилококков.

5.7; 5.8. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

5.9. Глюкозо-триптонный (агар) бульон

К 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 5 г триптона, 2,5 г дрожжевого экстракта или 12,5 см³ раствора дрожжевого экстракта и при приготовлении плотных сред 12—15 г агара кипятят до полного растворения, фильтруют, охлаждают до температуры 50—60 °С, доводят pH до (7,0±0,1), добавляют 1 г глюкозы и в среду для термофилов 0,04 г бромкрезолпурпура, фасуют в колбы (плотную среду) или в пробирки (жидкую среду) и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Применяют для культивирования мезофильных и кислотообразующих термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.10. Картофельно-пептонный (агар) бульон

200 г очищенного и нарезанного кусочками картофеля заливают 1 дм³ водопроводной воды, кипятят 15–20 мин, не допуская разваривания клубней, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доводят объем фильтрата до первоначального. В фильтрате растворяют 5 г пептона, 5 г хлористого натрия и расплавляют при нагревании 15—20 г агара. Устанавливают pH 7,0—7,2. Разливают в колбы и пробирки и стерилизуют при температуре (125±1) °С в течение 30 мин. Рекомендуется контролировать стерильность среды, термостатируя ее при (55±1) °С в течение 48 ч.

Применяют для культивирования термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.11. Кислый протеозо-пептонный (агар) бульон

5 г пептона, 500 мкг триптофана, 5 г глюкозы, 4 г двузамещенного фосфорнокислого калия растворяют при подогревании в 500 см³ дистиллированной воды и добавляют 135 см³ раствора дрожжевого экстракта. Устанавливают pH среды (5,0±0,1). Смесь разливают в колбы по 50 см³. В отдельную колбу к 500 см³ дистиллированной воды добавляют 20 г агара и нагревают при (100±1) °С до его растворения. Оба раствора стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С. Перед посевом агар расплавляют, охлаждают до (50±1) °С, смешивают с таким же объемом среды и заливают посевы на чашках.

Применяют для культивирования термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.12. Мясо-пептонный (агар) бульон

10 г пептона и 5 г хлористого натрия добавляют к 1 дм³ мясной воды. Устанавливают pH 7,0—7,2, кипятят, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. При выпадении осадка в мясо-пептонном бульоне его вторично фильтруют с последующей стерилизацией.

Для приготовления мясо-пептонного агара в 1 дм³ мясо-пептонного бульона перед стерилизацией добавляют 15—20 г агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного

растворения агара. Устанавливают pH 7,0—7,2, разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.13. Мясо-пептонный (агар) бульон с глюкозой

К 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона (агара) перед стерилизацией добавляют 1 г или 10 г глюкозы, устанавливают pH 7,0—7,2 и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и для определения общего количества микроорганизмов подсчетом на чашках Петри.

5.14. Мясо-пептонный (агар) бульон с глюкозой и дрожжевым экстрактом

К 1 $дм^3$ мясо-пептонного (агара) бульона с глюкозой добавляют асептически 2 г дрожжевого экстракта или 10 $см^3$ раствора дрожжевого экстракта.

Применяют для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.15. Мясо-пептонный бульон с растворимым крахмалом

10 г крахмала добавляют в небольшую порцию воды и при помешивании вносят в кипящую дистиллированную воду, получая 100 $см^3$ крахмального раствора. Полученный раствор смешивают с 900 $см^3$ мясо-пептонного бульона, содержащего триптофан (положительная качественная реакция на триптофан) и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Среда должна иметь pH (7,1±0,1).

Применяют для культивирования кислотообразующих термофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.16. Мясо-пептонный бульон с углекислым кальцием

В пробирки разливают по 5—6 $см^3$ мясо-пептонного бульона с раствором глюкозы концентрации 10 г/$дм^3$, добавляют 0,1 г стерильного углекислого кальция. Во флаконы со 100 $см^3$ среды добавляют 2 г углекислого кальция и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов при анализе кислотных консервированных продуктов.

5.17. Мясо-пептонный бульон с нитратами

К 100 $см^3$ мясо-пептонного бульона, свободного от нитритов (проверяют йодкрахмальным реактивом по п. 4.30, при наличии нитритов появляется слабо-розовое окрашивание), добавляют 0,2 г свободной от нитритов калийной селитры. Разливают среду по 5 $см^3$ в пробирки, промытые дистиллированной водой не менее пяти раз.

При анализе на выявление анаэробных микроорганизмов в среду вводят 1,5 г агара, растворяют его при нагревании, среду разливают в пробирки по 10 $см^3$. Стерилизацию проводят 15 мин при (121±1) °С.

Применяют для определения нитратредуцирующей способности микроорганизмов.

5.18. Рыбо-пептонный бульон

Рыбу, освобожденную от костей и жира, пропускают через мясорубку и заливают холодной водопроводной водой из расчета 1 $дм^3$ воды на 500 г рыбы. Смесь фарша с водой медленно нагревают до кипения и кипятят в течение 1,5 ч. Небольшое количество (до 5 $дм^3$) можно кипятить на открытом огне, часто помешивая, чтобы не произошло пригорания частичек рыбы. Большое количество лучше кипятить в котлах с паровой рубашкой. Для определения готовности рыбной воды сначала фильтруют небольшое количество ее в пробирку через бумажный фильтр. Если жидкость прозрачная, рыбная вода готова. Затем жидкость отцеживают через полотно, сюда же отжимают весь сок из вареной рыбы, добавляют кипяченой воды до первоначального объема и разливают.

Для приготовления рыбо-пептонного бульона к 1 $дм^3$ полученной рыбной воды добавляют 10 г пептона, 5 г хлористого натрия. Устанавливают pH 7,0—7,2. Стерилизуют при (121±1) °С 20 мин.

5.19. Рыбо-пептонный бульон с глюкозой

К 1 $дм^3$ рыбо-пептонного бульона перед стерилизацией добавляют 10 г глюкозы. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

5.20. Бульон Хоттингера и среды, его содержащие

5.20.1. Для приготовления основного раствора Хоттингера в 1 $дм^3$ кипящей воды на 20 мин опускают 1 кг мяса, нарезанного мелкими кусочками, затем мясо вынимают, измельчают на мясорубке и снова кладут в тот же отвар. Добавляют 30—40 г измельченной поджелудочной железы

(вместо поджелудочной железы можно брать 3—5 г панкреатина) и 20 см³ хлороформа. Бутылки плотно закрывают пробкой и энергично встряхивают (пробку надо придерживать), ставят в термостат при температуре 37 °С на 3—4 ч. Мясо в виде мелкозернистой массы осаждается на дно бутыли. Жидкость над мясом должна быть прозрачной. Жидкость сливают, фильтруют и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Готовый раствор должен давать положительную реакцию на триптофан (розовое окрашивание при прибавлении двух капель бромной воды в пробирку с пробой).

5.20.2. Для приготовления бульона Хоттингера смешивают 200 см³ основного раствора Хоттингера, 400 см³ мясного отвара и 400 см³ воды, добавляют 5 г хлористого натрия, 0,2 г фосфорнокислого двузамещенного натрия или фосфорнокислого двузамещенного калия, кипятят 10 мин и устанавливают pH (7,6±0,1). Бульон Хоттингера разливают высоким столбиком по пробиркам или флаконам, на дно которых кладут кусочки вареного мяса или фарша, наслаивают стерильное вазелиновое масло высотой около 2,0 см и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

5.20.3. Для приготовления плотной среды Хоттингера с триптоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом в 1 дм³ бульона Хоттингера вносят 0,5 г дрожжевого экстракта или 2,5 см³ раствора дрожжевого экстракта, 5 г глюкозы, 5 г триптона, 15—20 г агара, устанавливают pH среды (7,1±0,1) и стерилизуют ее при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленную стерильную среду асептически вносят 0,6 г аскорбиновой кислоты.

5.20.4. Плотную среду Хоттингера с глюкозой и дрожжевым экстрактом приготовляют по п. 5.19.3, но без триптона и аскорбиновой кислоты.

5.20.5. Бульон Хоттингера и плотную среду Хоттингера с триптоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов; плотную среду Хоттингера с глюкозой и дрожжевым экстрактом — для культивирования мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

5.21. Бульон (агар) V_1 с печенью

2 кг говядины, очищенной от жира, сухожилий и пленок и пропущенной через мясорубку, смешивают с 500 г фарша из печени и 9 дм³ воды в эмалированной посуде. Нагревают до температуры 50 °С и прибавляют 100 см³ раствора соляной кислоты концентрации 42,7 г/дм³ (для приготовления 100 см³ раствора соляной кислоты концентрации 42,7 г/дм³ в мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают 50—70 см³ дистиллированной воды, затем прибавляют 10 см³ концентрированной соляной кислоты с плотностью ρ = 1,18 г/см³, раствор доливают до метки дистиллированной водой. При использовании концентрированной соляной кислоты с другой плотностью делают пересчет на требуемую концентрацию 42,7 г/дм³).

Количество пепсина, прибавляемого к смеси мяса, печени и воды определяется его титром, но прибавляют его на 50 % больше, чем подсчитано. Например, при титре пепсина 1:10 для расщепления 2,5 кг белка требуется 0,25 г пепсина: в действительности же его прибавляют 0,375 г.

Пепсин оставляют действовать на смесь в течение 20 ч при температуре 50 °С в водяной бане. После 20 ч воздействия пепсина на смесь она должна давать положительную биуретовую реакцию и реакцию на триптофан.

Биуретовую реакцию проверяют с 5 см³ надосадочного слоя расщепленной смеси, в которую вносят для небольшого подщелачивания 1—2 капли раствора гидроокиси натрия концентрации 2 г/дм³ и прибавляют несколько капель раствора сернокислой (окисной) меди концентрации 10 г/дм³.

При положительной реакции образуется фиолетовая окраска. Реакцию на триптофан устанавливают с бромной водой (п. 5.20.1).

Расщепление прекращают нагреванием до температуры 85 °С. Фарш отделяют от смеси процеживанием через ткань. Добавлением гидроокиси натрия устанавливают pH (5,6±0,1). Смесь кипятят 5 мин. После охлаждения фильтруют через фильтровальную бумагу. Добавлением гидроокиси натрия устанавливают pH (7,4±0,1). Измеряют объем отвара и прибавляют к нему пептон из расчета 1,5 г на 100 см³ отвара и, если нужно, агар из расчета 1,5—2 г на 100 см³ отвара.

После растворения пептона и агара (при подогревании) вновь устанавливают pH (7,4±0,1). Бульон или агар разливают в колбы и стерилизуют при температуре (127±1) °С в течение 20 мин.

Для приготовления бульона с печенью кусочки вареной печени массой около 1—1,5 г вносят в пробирки и заливают бульоном до высоты 10—15 см. Стерилизуют при температуре (127±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для мезофильных анаэробных микроорганизмов.

5.22. Дифференциальная улучшенная клостридиальная среда (жидкая, вязкая или плотная)

В 800 см^3 дистиллированной воды вносят 10 г мясного экстракта (допускается заменять дистиллированную воду и мясной экстракт 800 см^3 мясной воды), 10 г пептона, 1,5 г дрожжевого экстракта или 7,5 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 5 г уксуснокислого натрия. Отдельно 1 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, и кипятят на водяной бане в течение 30 мин. После кипячения к раствору добавляют 1 г глюкозы и 0,5 г цистеин гидрохлорида и доводят pH раствора до 7,1—7,2. Горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр. Для приготовления вязкой среды в раствор добавляют 2 г агара на 1 дм^3 среды, для приготовления плотной среды — 15—20 г агара на 1 дм^3 среды. Среды стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Растворы сульфита натрия $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ концентрации 40 г/дм^3 и цитрата железа $FeC_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ с массовой концентрацией 70 г/дм^3 (при приготовлении последнего раствор нагревают в течение 5 мин) стерилизуют фильтрованием и хранят раздельно при температуре 3—5 °С в полностью заполненных флаконах в течение не более 14 сут. Перед использованием основную среду регенерируют и охлаждают. Растворы, сульфита натрия и цитрата железа смешивают в равных объемах и асептически добавляют в охлажденную среду из расчета 0,5 см^3 смеси на 25 см^3 основной среды.

Применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов.

5.21, 5.22. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

5.23. Лакмусовое молоко

К стерильному молоку добавляют лакмусовую настойку до получения сиреневатого окрашивания (на 100 см^3 молока примерно 1 см^3 лакмусовой настойки). Лакмусовое молоко разливают по стерильным пробиркам высоким столбиком, кипятят на водяной бане в течение 15—20 мин и охлаждают для посева до температуры 45 °С.

Применяют для мезофильных клостридий при анализе молочных консервов и при культивировании C. perfringens.

5.24. Пептонная среда с глюкозой (глюкозо-пептонный бульон)

5 г глюкозы, 5 г пептона, 5 г фосфорнокислого однозамещенного калия вносят в 1 дм^3 дистиллированной воды, нагревают до растворения всех ингредиентов, устанавливают pH 7,0—7,2 и разливают в пробирки по 5 см^3. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Применяют для культивирования микроорганизмов и определения их способности образовывать ацетилметилкарбинол.

5.25. Печеночно-глицериновая среда

К 1 дм^3 печеночного бульона добавляют 5 г глицерина, 5 г глюкозы, разливают в пробирки или флаконы с кусочками печени (20—30 г печени на 100 см^3 среды), устанавливают pH (7,0±0,1) и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов.

5.26. Плотная среда Бликфельдта

В 800 см^3 дистиллированной воды растворяют 10 г лактозы, 10 г глюкозы, 5 г пептона, кипятят и фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 40 г дрожжевого экстракта или 200 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 5 г углекислого кальция, растертого в ступке непосредственно перед употреблением, доводят pH до (7,3±0,1) и добавляют 15—20 г агара. Среду разливают в стерильные колбы, затем стерилизуют в автоклаве при температуре (117±1) °С не более 20 мин.

Применяют для культивирования молочнокислых бактерий.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.27. Жидкая среда Бликфельдта

В 800 см^3 дистиллированной воды растворяют 10 г лактозы, 10 г глюкозы, 5 г пептона, кипятят и фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют 4 г дрожжевого экстракта или 20 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 10 см^3 раствора бромкрезолпурпура, устанавливают pH (7,3±0,1), разливают в стерильную посуду и стерилизуют при температуре (117±1) °С не более 20 мин.

Применяют для культивирования молочнокислых бактерий.

5.28. Среда Вильсона-Блера, измененная для анаэробов

Раствор железоаммонийных квасцов концентрации 50 г/дм^3 и раствор сернистокислого натрия с массовой концентрацией 200 г/дм^3 готовят на стерильной дистиллированной воде extempore. Раствор сернистокислого натрия стерилизуют текучим паром в течение 1 ч. К 100 см^3 расплавленного и охлажденного до температуры 80 °С мясо-пептонного агара концентрации глюкозы 10 г/дм^3 добавляют 10 см^3 раствора сернистокислого натрия и 1 см^3 раствора железоаммонийных квасцов. Устанавливают pH 7,5—7,8. Среду разливают по чашкам Петри и чашки подсушивают в термостате по ГОСТ 26670—91.

Применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов и определения их сульфитредуцирующей способности.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.29. Среда Гисса

10 г пептона и 5 г хлористого натрия растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр так, чтобы раствор был прозрачным, прибавляют 10 г углевода (глюкозы, лактозы, мальтозы, маннита или сахарозы) в зависимости от выявляемой микрофлоры.

Устанавливают pH 7.0—7,2, прибавляют 10 см^3 раствора индикатора Андреде (п. 4.6). При анализе для выявления аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов среду разливают по 5 см^3 в стерильные пробирки с поплавками. Стерилизуют 20 мин при температуре (112±1) °С. Среда должна быть бесцветной или соломенно-желтого цвета без розового оттенка.

При выявлении анаэробных микроорганизмов в среду добавляют 1,5 г агара, расплавляют при нагревании и разливают в пробирки по 12—13 см^3.

Применяют для определения сахаролитической способности микроорганизмов.

5.30. Среда из вареного мяса (Cooked-Meat Medium)

500 г свежего, освобожденного от костей, жира и сухожилий мяса или сердца крупного рогатого скота помещают в 500 см^3 кипящей дистиллированной воды, содержащей 1,5 см^3 раствора c (NaOH) = 1 моль/дм^3 и кипятят в течение 20 мин; в конце кипячения в смесь добавляют молочную кислоту в количестве, необходимом для доведения pH смеси до (7,0±0,1). Горячую жидкость фильтруют через ватно-марлевый фильтр, к отфильтрованной жидкости добавляют пептон в количестве 0,5 г пептона на 100 см^3 жидкости и хлористый натрий в количестве 0,25 г хлористого натрия на 100 см^3 жидкости. Полученную жидкость вновь кипятят в течение 20 мин, добавляют в нее 1 см^3 соляной кислоты и фильтруют. Доводят pH фильтрата до (8,2±0,1) и кипятят его в течение 3 мин.

После кипячения устанавливают pH 7,7—7,8. Кусочки мяса фасуют в пробирки до 2,5 г и заливают 10 см^3 вышеприготовленной жидкости. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. После стерилизации среда должна иметь pH 7,4—7,5. Для выделения C. botulinum и сахаролитических анаэробных микроорганизмов в среду добавляют раствор глюкозы из расчета содержания ее в среде 0,5—1,0 %. На поверхность среды наслаивают голодный агар, вазелиновое масло или парафиновую смесь.

Применяют для культивирования анаэробных микроорганизмов.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.31. Среда из сухого питательного агара

50 г порошка сухого питательного агара высыпают в 1 дм^3 холодной водопроводной воды, тщательно перемешивают и кипятят на слабом огне 1—2 мин при помешивании до полного расплавления агара, не допуская пригорания в закрытом сосуде. Устанавливают pH среды 7,0—7,2. Расплавленный раствор фильтруют через вату, разливают в пробирки, флаконы или колбы и стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С.

5.32. Среда из сухого питательного агара с глюкозой

В 975 см^3 среды из сухого питательного агара непосредственно перед применением асептически добавляют 25 см^3 стерильного раствора глюкозы концентрации 200 г/дм^3.

5.33. Среда из томатного сока

К 700 см^3 воды добавляют 300 см^3 томатного сока, 2 г дрожжевого экстракта или 10 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 10 г глюкозы, доводят pH 5,5—5,6, фильтруют, разливают по 100 см^3 в стерильные колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (117±1) °С в течение 20 мин. Отдельно в 500 см^3 дистиллированной воды растворяют при нагревании 20 г агара, разливают по 100 см^3 в колбы и стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Перед посевом в

асептических условиях смешивают 100 см³ жидкой среды со 100 см³ расплавленного агара. Агаризованную среду вносят в чашки, содержащие 0,25 г стерильного углекислого кальция.

Применяют для культивирования молочнокислых бактерий.

5.34. Среда Китт-Тароцци

Для приготовления среды Китт-Тароцци стерильные пробирки заполняют на 1,0—1,5 см кусочками печени, мяса или рыбы и заливают приготовленным мясо-пептонным бульоном с глюкозой и агаром. В 1 дм³ мясо-пептонного, рыбо-пептонного или печеночного бульона вносят 10 г глюкозы и 1,5 г агара, который при нагревании постепенно расплавляют (высота слоя бульона в обычных пробирках 12—13 см, в высоких 15—18 см) и стерилизуют 20 мин при температуре (121±1) °С. Требуемую величину pH проверяют до и после стерилизации. pH среды после стерилизации должно быть (7,1±0,1).

При приготовлении среды впрок вместо добавления к ней агара на поверхность среды перед стерилизацией в пробирки наслаивают 0,5—1,0 см вазелинового масла.

При применении среды Китт-Тароцци без добавления в нее агара или вазелинового масла на поверхность среды после окончания посева наслаивают голодный агар или парафиновую смесь высотой 1,0—1,5 см.

При посевах в свежеприготовленную среду Китт-Тароцци (не более 3 сут с момента приготовления) добавлять агар, вазелиновое масло или наслаивать на ее поверхность голодный агар не обязательно.

Применяют для культивирования мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов.

5.35. Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием

В пробирки или флаконы, предназначенные для среды Тароцци, добавляют на дно щепотку углекислого кальция, стерилизуют горячим воздухом по ГОСТ 26668—85, закладывают в них кусочки мяса или печени и заливают мясо-пептонным бульоном с глюкозой, приготавливая среду Тароцци по вышеописанной технологии.

Применяют для анаэробных микроорганизмов, для посева кислотных консервированных продуктов.

5.36. Среда Китт-Тароцци с углекислым кальцием, дрожжевым экстрактом и аскорбиновой кислотой

Готовят среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием, но в мясо-пептонный бульон перед фасовкой вносят 2 г дрожжевого экстракта или 10 см³ раствора дрожжевого экстракта. Перед анализом в регенерированную среду Китт-Тароцци с углекислым кальцием и дрожжевым экстрактом асептически вносят аскорбиновую кислоту из расчета 100 мкг на 1 дм³ среды.

Применяют для мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов.

Для внесения аскорбиновой кислоты в среду раствор, приготовленный по п. 4.10, разводят в стерильной дистиллированной воде в 100 раз и 0,2 см³ приготовленного раствора вносят на 1 дм³ среды.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

5.37. Среда Мак-Кланг и Мак-Кой (модифицированная)

В 1 дм³ водопроводной воды добавляют 20 г порошкообразной печени, при отсутствии сухой порошкообразной печени применяют печеночную воду — 1 дм³, но в этом случае водопроводная вода из среды исключается, 50 г кукурузной муки (белой или желтой), все хорошо размешивают, чтобы не было комков. Нагревают в течение 1 ч в текучем паре до полного растворения всех компонентов. Устанавливают pH 7,0—7,2, разливают и стерилизуют 1 ч при (121±1) °С.

Применяют для выявления мезофильных анаэробных и микроорганизмов при анализе консервов с pH 4,4 и ниже.

5.38. Пептонная среда с триптофаном

10 г пептона растворяют в небольшом количестве водопроводной воды, добавляют 5 г растворимого крахмала, предварительно растворенного в 50 см³ воды, и доводят объем водопроводной водой до 1 дм³, устанавливают pH 6,7—6,8. Фильтруют через бумажный фильтр, добавляют 500 мкг триптофана, 5 г глюкозы, 20 г агара, нагревают до полного растворения агара и добавляют индикатор бромкрезол-пурпур и бромтимоловый синий (пп. 4.7, 4.8). Разливают в стерильную посуду и стерилизуют 20 мин при температуре (116±1) °С

5.39. Среда Роберта

В 1 дм^3 дистиллированной воды вносят 2 г азотнокислого калия, 2 г двузамещенного фосфорнокислого калия, 1 г агара, 30 г желатина, дают набухнуть желатину и нагревают на водяной бане до полного растворения желатина и агара, добавляют 25 см^3 стерильного мясо-пептонного бульона и 10 см^3 раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида концентрации 10 г/дм^3, устанавливают pH (7,1±0,1), стерилизуют 3 сут подряд при температуре (100±1) °С в течение 20 мин или однократно при температуре (110±1) °С в течение 15 мин. Среда должна быть бесцветной.

Применяют для культивирования C. perfringens.

5.40. Среда Сабуро

В 1 дм^3 горячей дистиллированной воды растворяют 10 г пептона и 40 г глюкозы или мальтозы, разливают в стерильную посуду и стерилизуют 20 мин при температуре (112±1) °С.

Применяют для дрожжей и плесневых грибов.

5.41. Среда Смис-Лоренца

5 г глюкозы, 10 г пептона или триптона, или триптозы (Дифко), 20 г агара растворяют при подогревании в 950 см^3 воды; отдельно 5 г растворимого крахмала растворяют в 50 см^3 воды и раствор вносят в среду, устанавливают pH (7,1±0,1) и стерилизуют при температуре (117±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных кислотообразующих термофильных микроорганизмов.

5.42. Крахмало-пептонная среда, обогащенная триптофаном

10 г пептона растворяют в небольшом количестве воды, добавляют 5 г растворимого крахмала, предварительно растворенного в 50 см^3 воды, доводят объем водой до 1 дм^3, устанавливают pH (6,2±0,1). Фильтруют через бумажный фильтр, добавляют 500 мкг триптофана, 5 г глюкозы, 20 г агара, нагревают до полного растворения агара и добавляют 10 см^3 раствора бромкрезолпурпура концентрации 0,4 г/дм^3, разливают в стерильную посуду и стерилизуют при температуре (116±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования кислотообразующих аэробных и факультативно-анаэробных термофильных микроорганизмов.

5.43. Сульфат-лактатная (плотная, вязкая) среда

5 г пептона растворяют в 1 дм^3 воды, добавляют 4 г дрожжевого экстракта или 20 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 1,5 г сульфата натрия, 1,5 г сульфата магния, 3,5 г лактата натрия, устанавливают pH 7,2—7,4 и добавляют для приготовления плотной среды 20 г агара, вязкой — 1,5 г агара; подогревают до полного растворения, фасуют и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленную или регенерированную среду вносят раствор соли Мора (двойная сернокислая соль закиси железа и аммония) из расчета 4 мг/см^3. Для этого перед использованием раствор соли Мора концентрации 100 г/дм^3 стерилизуют фильтрованием и вносят асептически в каждую пробирку по 4—5 капель. Лактат натрия может быть заменен молочной кислотой, нейтрализованной гидроокисью натрия.

Применяют для культивирования термофильного анаэроба D. nigrificans.

5.44. Солодовое сусло

Солодовое неохмеленное сусло готовят следующим образом.

К 1 дм^3 водопроводной воды, подогретой до (50±1) °С, прибавляют 200 г молотого ячменного солода. Смесь тщательно перемешивают в течение 30 мин, подогревают на водяной бане со скоростью 1 °С в минуту до (55±1) °С, выдерживают паузу 15 мин, затем вновь с той же скоростью поднимают температуру до 63—65 °С и удерживают ее на этом уровне в течение 1 ч. Температуру поднимают со скоростью 1 °С в минуту до (72±1) °С и выдерживают сусло при этой температуре до полного осахаривания. Степень осахаривания сусла проверяют раствором Люголя. Для этого каплю сусла переносят в фарфоровую чашку и осторожно прибавляют к нему каплю раствора Люголя. Окончательно осахаренное сусло не должно менять окраску в присутствии индикатора. Полученное сусло фильтруют через полотно или фильтровальную бумагу, доливают до 1 дм^3 и стерилизуют 30 мин в автоклаве при 107—110 °С. Затем сусло декантируют.

Прозрачное сусло разбавляют водой до массовой доли сухих веществ 7—8 %, разливают в стерильную посуду, стерилизуют 20 мин при (116±1) °С. Солодовое сусло можно заменить виноградным суслом, доводя массовую долю сухих веществ этого раствора до 7—8 %.

Применяют для культивирования дрожжей и плесневых грибов.

5.45. Солодовое агаризованное сусло

К 1 дм^3 солодового неохмеленного сусла с массовой долей сухих веществ 7—8 % прибавляют 20 г агара. Среду расплавляют на водяной бане или текучим паром и фильтруют через гигроскопическую вату или фильтровальную бумагу. Фильтрат разливают по стерильным колбам или пробиркам и стерилизуют при температуре (116±1) °С в течение 15 мин или 3 сут по 30 мин текучим паром при температуре (100±1) °С. Для выявления дрожжей и плесневых грибов из продуктов, обильно обсемененных микроорганизмами, сусло перед использованием подкисляют 2—3 см^3 стерильного раствора лимонной кислоты с массовой концентрацией 200 г/дм^3 до pH 3,5.

Применяют для культивирования дрожжей и плесневых грибов.

5.46. Солодовое агаризованное сусло с углекислым кальцием

К 1 дм^3 солодового неохмеленного сусла с массовой долей сухих веществ 7—8 % добавляют 15—20 г агара (в зависимости от его желирующей способности), растворяют его на водяной бане при нагревании, и вносят 15—20 г стерильного углекислого кальция. Устанавливают pH среды 6,6—6,8. При постоянном помешивании разливают в стерильную посуду и стерилизуют при температуре (116±1) °С в течение 20 мин.

Применяют для культивирования дрожжей, плесеней и молочнокислых бактерий.

5.47. Улучшенная клостридиальная среда (R. C. M.)

В 1 дм^3 дистиллированной воды помещают 3 г дрожжевого экстракта или 15 см^3 раствора дрожжевого экстракта, 10 г мясного экстракта, 10 г пептона, 1 г растворимого крахмала, 5 г глюкозы, 0,5 г цистеина гидрохлорида, 5 г хлористого натрия, 3 г уксуснокислого натрия или 5 г водного уксуснокислого натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) 0,5 г агара для вязкой среды или 15 г агара для плотной среды, нагревают при непрерывном помешивании до кипения и кипятят до полного растворения всех компонентов; раствор охлаждают до температуры 50—60 °С, доводят его реакцию до pH (7,0±0,1). Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Вязкую среду непосредственно перед использованием регенерируют, плотную — после розлива по чашкам Петри подсушивают. Допускается использовать 1 дм^3 мясной воды вместо мясного экстракта и воды.

Применяют для культивирования мезофильных анаэробных микроорганизмов.

5.48. Среда питательная для контроля стерильности, сухая.

В 33,0 г сухого порошка среды входят:

ферментативный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления 15,0 г;

витаминный препарат экстракта кормовых дрожжей — 5,0 г;

натрий хлористый — 6,4 г;

глюкоза — 5,0 г;

тиогликолят натрия — 0,3 г;

цистеина гидрохлорид — 0,75 г;

агар — 0,6 г;

натрий углекислый — 0,5—0,95 г.

Приготовление:

33,0 г сухого порошка растворяют в 1000 см^3 воды, тщательно перемешивают, доводят до кипения, кипятят 2—3 мин при помешивании, фильтруют, разливают в пробирки по п. 5.34. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Готовая среда должна иметь pH 7,0±0,2 и храниться при комнатной температуре не более 7 сут.

Среду применяют для культивирования мезофильных и термофильных анаэробных микроорганизмов.

(Введен дополнительно, Изм. № 1).

gost.e-ecolog.ru