МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МУКА КОРМОВАЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Методы бактериологического анализа

ГОСТ 25311—82

Feeding flour of animal origin.
Methods of bacteriological analysis

ОКСТУ 9209

Дата введения 01.07.83

Настоящий стандарт распространяется на кормовую муку животного происхождения и устанавливает методы бактериологического анализа:

определение общего количества микробов;

определение присутствия бактерий группы кишечной палочки;

определение присутствия бактерий из рода сальмонелл;

определение присутствия бактерий анаэробов.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Отбор проб для бактериологического анализа проводят по ГОСТ 17536 сухим стерильным щупом в сухую стерильную стеклянную банку.

1.2. Масса точечной пробы должна быть не менее 100 г. Масса объединенной пробы должна быть не менее 500 г.

1.3. Объединенную пробу тщательно перемешивают и делят пополам. Каждую часть упаковывают в стерильную стеклянную банку. Одну банку направляют в лабораторию, а другую сохраняют на предприятии до окончания анализа.

1.4. При отборе проб составляют акты в двух экземплярах, которые должны содержать следующие данные: наименование предприятия-изготовителя, номер партии, вид и массу продукта, количество упаковочных единиц, дату изготовления продукции и отбора проб.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

2.1. Для проведения бактериологических анализов применяют следующие аппаратуру, материалы и реактивы:

автоклав;

анаэростат;

весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104* 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

гомогенизатор бактериологический, смеситель или аппарат для измельчения тканей с частотой вращения не менее 8000 об/мин;

дистиллятор;

лупы измерительные с увеличением 3$^{\times}$ и 5$^{\times}$ по ГОСТ 25706;

лампы ртутно-кварцевые;

микроскоп марок МБИ и МБР по НТД или других аналогичных марок;

мясорубку бытовую по ГОСТ 4025;

потенциометр по ГОСТ 7164;

прибор для подсчета колоний;

термостат электрический с автоматическим терморегулятором;

* С 1 июля 2002 г. вводится в действие ГОСТ 24104—2001.

gost.e-ecolog.ru

холодильник электрический бытовой по ГОСТ 16317;
шкаф сушильный лабораторный;
агар микробиологический по ГОСТ 17206;
агар сухой с эозином метиленовым синим (среда Левина);
агар Эндо сухой бактериологический;
агар Плоскирева сухой бактериологический;
агар сухой висмут-сульфит;
альфанафтиламин по НТД;
алхилбензолсульфонат;
баню водяную с терморегулятором;
бульон мясо-пептонный по ГОСТ 20730;
бумагу парафинированную по ГОСТ 9569;
бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
вату медицинскую гигроскопическую по ГОСТ 5556;
воду мясную по ГОСТ 20729;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
воронки стеклянные по ГОСТ 25336;
дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 171;
желатин пищевой по ГОСТ 11293;
колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336;
кристаллизатор с мостиком;
марлю бытовую по ГОСТ 11109;
марлю медицинскую по ГОСТ 9412;
масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739;
масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164;
мел химический осажденный по ГОСТ 8253;
мясо-говядину по ГОСТ 779;
набор углеводов для исследования ферментации микробов кишечной группы (большой);
набор адсорбированных поливалентных сальмонеллезных О-сывороток основных пяти групп (А, В, С, Д, Е) и редких групп;
набор О-моно и поливалентных агглютинирующих колисывороток;
палочки стеклянные;
парафин по ГОСТ 23683;
пептон венгерский фирмы «Рихтер», чешский «Спофа»;
пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по ГОСТ 13805;
песок кварцевый для тонкой керамики по ГОСТ 7031;
печень говяжью;
пинцеты для предметных стекол;
пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ с широким концом;
пипетки Мора вместимостью 25, 50 $см^3$;
пипетки пастеровские;
поплавки для пробирок и колб длиной 20, 45 и 75 мм и диаметром 5, 9 и 10 мм соответственно;
препарат с индикатором ВР и глюкозой;
пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336;
пробки корковые по ГОСТ 5541;
пробки резиновые конусные по НТД;
проволоку из никелевых сплавов диаметром 0,3—0,5 мм по ГОСТ 1791;
стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
ступки фарфоровые с пестиком по ГОСТ 9147;
среду КОДА сухую питательную;
флаконы Сокслета;

цилиндры мерные наливные 1—100, 1—250, 1—500 по ГОСТ 1770;
колбы мерные наливные 1—100—2, 1—250—2, 1—500—2 по ГОСТ 1770;
часы песочные на 1, 2, 5 мин;
чашки стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336 типа ЧБН (чашки Петри);
шпатели Дригальского;
штативы для пробирок;
шумовку;
яйца куриные;
бриллиантовый зеленый;
бромкрезолпурпур;
бромтимоловый синий;
генцианвиолет;
глицерин по ГОСТ 6259, х.ч.;
глюкозу кристаллическую гидратную по ГОСТ 975, х.ч.;
железо хлористое по ГОСТ 4147;
йод по ГОСТ 4159, х.ч.;
калий йодистый по ГОСТ 4232;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х.ч.;
калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493, ч.д.а.;
калий едкий;
кальций углекислый по ГОСТ 4530;
кислоту розоловую;
кислоту щавелевую;
кислоту сульфаниловую по ГОСТ 5821;
лактозу, х.ч.;
магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209, х.ч.;
магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523;
маннит по НТД, х.ч.;
метиленовый голубой;
мочевину по ГОСТ 6691, х.ч.;
натрия гидроокись по ГОСТ 4328;
сахарозу по ГОСТ 5833, х.ч.;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962*;
спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300;
фенолрот;
фуксин основной для микробиологических целей;
фуксин (основной и кислый) для микробиологических целей;
хинозол;
натрий сернистокислый безводный по ГОСТ 195.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Приготовление питательных сред: пептонной воды, мясо-пептонного агара (МПА), сред Эндо, Крумвиде—Олькеницкого в модификации Ковальчука, Киллиана, Кауфмана, Мюллера, магниевой среды, селенитового бульона, Гисса, «ХБ» (хинозол-бромкрезол-пурпуровый), хлористо-магниевой среды «М» (модифицированной), среды Хейфеца, Булира, Кесслера, Эйкмана, Левина, Ресселя, Плоскирева, висмут-сульфит агара, КОДА, Крумвиде—Олькеницкого, полужидкого агара, кровяного агара по Цейслеру, среды Китт—Тароцци, короткого пестрого ряда среды Вильсон—Блера — производят по ГОСТ 9958, ГОСТ 18963, ГОСТ 21237 и по методикам, утвержденным в установленном порядке.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000.

3.2. Приготовление испытуемой взвеси и разведений

От общей пробы отвешивают на лабораторных весах навеску массой 50 г и помещают ее в стерильную колбу или стакан гомогенизатора, содержащий 450 см^3 стерильного физиологического раствора, и тщательно перемешивают в течение 30 мин, получая основное десятикратное разведение. После отстаивания в течение 10—15 мин из надосадочного слоя берут пипеткой 1 см^3 жидкости, вносят в пробирку с 9 см^3 стерильного физиологического раствора и получают последующее разведение. Из этой пробирки готовят последующие разведения (тысячекратное и т.д.).

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1. Определение общего количества микробов в 1 г муки

4.1.1. Метод основан на способности живых бактериальных клеток образовывать макроколонии при оптимальных условиях культивирования на питательных средах.

4.1.2. По 1 см^3 каждого разведения вносят в стерильные бактериологические чашки и заливают 10—15 см^3 стерильного, расплавленного и охлажденного до 45 °С мясо-пептонного агара. После застывания среды чашки помещают (вверх дном) в термостат при температуре (30,0±0,5) °С на 72 ч.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.1.3. *Обработка результатов*

Выросшие на чашках колонии подсчитывают, умножают на кратность соответствующего разведения. За общее количество микроорганизмов в 1 г муки принимают среднее арифметическое результатов двух смежных разведений.

4.2. Определение присутствия бактерий группы кишечной палочки

4.2.1. Метод основан на способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять маннит и лактозу, образовывать на средах «ХБ» и Хейфеца кислые продукты, изменяющие цвет индикаторов, входящих в состав этих сред.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.2.2. По 1 см^3 каждого разведения вносят (по выбору) в пробирки, содержащие по 5 см^3 среды: Эйкмана, Кесслер, Булира, Хейфеца, «ХБ» или КОДА. Посевы помещают в термостат при температуре 43 °С для первых пяти сред и 37 °С для последней.

4.2.3. Через 24 ч учитывают рост на средах Эйкмана, Булира по помутнению среды и образованию газа, на средах Хейфеца, «ХБ» и КОДА — по изменению цвета сред.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.2.4. Из пробирок, где наблюдается рост микробов, производят посев в количестве 0,1—0,2 см^3 на плотные дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина) и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18—24 ч.

Типичные колонии E. Coli характеризуются круглой формой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розового, красного или малинового цвета с металлическим блеском или без него на среде Эндо и фиолетового или черного — на среде Левина.

Выросшие изолированные колонии (не менее 4) пересевают на мясо-пептонный бульон, выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18—24 ч. После этого одну часть пробирок используют для приготовления мазков, посева на дифференциально-диагностические среды, заражения мышей, вторую — для приготовления кипяченого антигена.

4.2.5. У выделенных культур изучают морфологические, культурально-биохимические и патогенные свойства с целью проведения их родовой дифференциации. Культурально-биохимические свойства изучают по комплексу ЛИМАЦ (лактоза+индол+метилрот+реакция фогес Проскауэра-, цитратно-аммонийные соли +).

Одновременно с определением морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств бактерий проводят серологическую типизацию культур кишечной палочки по 0-антигену.

Для приготовления антигена каждую предназначенную для типизации суточную агаровую культуру (пробирку со скошенным агаром) смывают стерильным физиологическим раствором, доводят суспензию бактерий до концентрации 5—6 млрд/см^3, кипятят в водяной бане в течение 1 ч

и ставят реакцию агглютинации на стекле с комплексной 0-сывороткой, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:5.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.2.6. Если комплексные 0-колисыворотки в начальной реакции не агглютинируют антиген из убитой нагреванием культуры, то готовят из этого штамма суспензию бактерий и автоклавируют ее при давлении 10^5 Па (1 атм) в течение 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Автоклавированный антиген исследуют с сыворотками 08, 09, 0101.

4.2.7. *Обработка результатов*

При наличии агглютинации дают заключение о присутствии в исследуемой муке энтеропатогенных типов E. Coli.

Кроме этого, энтеропатогенными признают культуры E. Coli, которые:

серологически типизируются набором типоспецифических колисывороток, но не вызывают гибель белых мышей;

серологически не типизируются, но вызывают гибель белых мышей.

4.3. Определение присутствия бактерий из рода сальмонелл

4.3.1. Метод выявления сальмонелл основан на определении их характерного роста на элективных средах и установлении ферментативных и серологических свойств.

4.3.2. Навеску муки массой от 50 до 200 г помещают в колбу, содержащую одну из сред предварительного обогащения (физиологический раствор, пептонная вода) при соотношении муки и среды 1:5. Содержимое колбы тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 16—18 ч производят посевы на две (по выбору) основные среды обогащения (селенитовый бульон, магниевую среду, среды Киллиана, Мюллера, Кауфмана) в соотношении 1:5.

После 16—18 ч термостатирования при температуре 37 °С из обогатительных сред бактериологической петлей производят посевы в чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами висмут-сульфит агар, среды Плоскирева или Левина (по две чашки), которые помещают в термостат при температуре 37 °С.

4.3.3. Засеянные чашки просматривают через 24—48 ч.

На висмут-сульфит агаре S. typhi, S. paratyphi A растут в виде мелких, нежных серовато-зеленых колоний с черным центром; S. Cholerae suis — в виде зеленых колоний. Колонии почти всех других сальмонелл значительно крупнее, темно-коричневого цвета с металлическим блеском, окруженные светлым ореолом, цвет участка среды под колонией — черный.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде прозрачных или нежно-розовых колоний; на среде Левина — прозрачные, бледные, нежно-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

При обнаружении колоний, подозрительных на сальмонеллы, три-пять из них засевают на комбинированные среды: Расселя, Крумвиде—Олькеницкого в модификации Ковальчука или трехсахарную (лактоза, глюкоза, сахароза) «скошенный столбик» с мочевиной.

Высев колоний делают на короткий пестрый ряд, включающий скошенный агар и среды Гисса с лактозой, глюкозой и сахарозой, а также на бульон Хоттингера для определения индола и сероводорода.

Культуры, представляющие грамотрицательные подвижные палочки, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевину и не образующие индол, подвергаются серологическому исследованию — испытанию в реакции агглютинации на предметном стекле с поливалентной адсорбированной 0-сывороткой.

4.3.4. *Обработка результатов*

Обнаружение подвижных (кроме S. pullorum, S. gallinarum) грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, не ферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа (S.typhi suis не ферментирует маннит), дающих положительную реакцию агглютинации с поливалентной адсорбированной 0-сывороткой, указывает на наличие бактерий из рода сальмонелл.

4.3.3, 4.3.4. **(Измененная редакция, Изм. № 1).**

4.4. Определение присутствия бактерий анаэробов

4.4.1. Метод основан на способности анаэробов расти в отсутствие кислорода воздуха, морфологии возбудителей, росте на питательных средах и на выявлении патогенности возбудителей путем заражения лабораторных животных.

4.4.2. В пробирки со средами Китт—Тароцци и Вильсон—Блера и в чашки с кровяным агаром по Цейслеру вносят по 1 $см^3$ первых трех разведений испытуемой взвеси, помещают в термостат и инкубируют при температуре (37,0±0,5) °С в течение 24—48 ч.

Почернение среды Вильсон—Блера, а также быстрое начало роста на среде Китт—Тароцци при обильном газообразовании является характерным для С. perfringens. На кровяном агаре через 24 ч поверхность колоний С. perfringens слегка выпуклая, округлая, продолговатая, сочные колонии от серого до зеленого цвета, окружены большой зеленовато-коричневой зоной гемолиза. В мазках, приготовленных с кровяного агара, хорошо выражены капсулы и центрально расположенные, крупные овальные, по объему превышающие ширину палочки, споры. Биологическую пробу проводят на морских свинках и белых мышах путем внутрибрюшного заражения двухсуточной бульонной культурой. При положительном результате подопытные животные гибнут через 2—3 сут. Рост С. botulinum наблюдается на 2—3 сут. и характеризуется помутнением среды Китт—Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла. При исследовании на наличие токсина берут навеску муки массой не менее 50 г, помещают в колбу, содержащую стерильный физиологический раствор в соотношении 1:4. Подготовленный материал настаивают в течение 2—3 ч, затем центрифугируют и центрифугатом заражают внутрибрюшинно или подкожно морских свинок в дозе 1—2 $см^3$ или белых мышей в дозе 0,2—0,3 $см^3$. Контрольным животным вводят подогретый на водяной бане при температуре 100 °С в течение 30 мин центрифугат в тех же дозах.

(Измененная редакция, Изм. № 1).

4.4.3. *Обработка результатов*

Наиболее характерные признаки роста С. perfringens — почернение среды Вильсон—Блера, интенсивный рост на среде Китт—Тароцци с обильным образованием газа, слегка выпуклые, круглые или продолговатые колонии серо-зеленоватого цвета на кровяном агаре. Биопробу считают положительной, когда подопытные животные погибают в течение двух суток после введения им центрифугата, не подвергнутого кипячению.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством мясной и молочной промышленности СССР

РАЗРАБОТЧИКИ

А.Ф. Савченко, канд. техн. наук; **В.Г. Дедаш,** канд. вет. наук; **А.Е. Широченко,** канд. биолог. наук; **Н.В. Луданова,** старший инженер

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.06.82 № 2421

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 171—81	2.1	ГОСТ 7031—75	2.1
ГОСТ 195—77	2.1	ГОСТ 7164—78	2.1
ГОСТ 779—55	2.1	ГОСТ 8253—79	2.1
ГОСТ 975—88	2.1	ГОСТ 9147—80	2.1
ГОСТ 1770—74	2.1	ГОСТ 9284—75	2.1
ГОСТ 1791—67	2.1	ГОСТ 9412—93	2.1
ГОСТ 2493—75	2.1	ГОСТ 9569—79	2.1
ГОСТ 3164—78	2.1	ГОСТ 9958—81	3.1
ГОСТ 4025—95	2.1	ГОСТ 11109—90	2.1
ГОСТ 4147—74	2.1	ГОСТ 11293—89	2.1
ГОСТ 4159—79	2.1	ГОСТ 12026—76	2.1
ГОСТ 4198—75	2.1	ГОСТ 13739—78	2.1
ГОСТ 4209—77	2.1	ГОСТ 13805—76	2.1
ГОСТ 4232—74	2.1	ГОСТ 16317—87	2.1
ГОСТ 4328—77	2.1	ГОСТ 17206—96	2.1
ГОСТ 4523—77	2.1	ГОСТ 17536—82	1.1
ГОСТ 4530—76	2.1	ГОСТ 18300—87	2.1
ГОСТ 5541—76	2.1	ГОСТ 18963—73	3.1
ГОСТ 5556—81	2.1	ГОСТ 20729—75	2.1
ГОСТ 5821—78	2.1	ГОСТ 20730—75	2.1
ГОСТ 5833—75	2.1	ГОСТ 21237—75	3.1
ГОСТ 5962—67	2.1	ГОСТ 23683—89	2.1
ГОСТ 6259—75	2.1	ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 6672—75	2.1	ГОСТ 25336—82	2.1
ГОСТ 6691—77	2.1	ГОСТ 25706—83	2.1
ГОСТ 6709—72	2.1		

5. Ограничение срока действия снято по протоколу № 2—92 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 2—93)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ с Изменением № 1, утвержденным в декабре 1987 г. (ИУС 4—88)

gost.e-ecolog.ru