ГОСТ 28560—90

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДОВ PROTEUS, MORGANELLA, PROVIDENCIA

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

gost.e-ecolog.ru

УДК 663/.664.001.4:006.354 Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

## Метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia

Food products. Method for detection of bacteria of Proteus, Morganella, Providencia genera

**ГОСТ 28560—90**

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

**Дата введения 01.07.91**

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления бактерий родов Proteus, Morganella, Providencia.

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведений в жидкую селективную среду, культивировании посевов при (36 ± 1) °С в течение 48 ч, последующем пересеве выросших культур на плотные дифференциально-диагностические среды, культивировании посевов при (36 ± 1) °С в течение 48 ч, выделении характерных колоний и подтверждении с помощью биохимических тестов их принадлежности к бактериям родов Proteus и (или) Morganella и (или) Providencia или к видам Proteus vulgaris или Proteus mirabilis.

## 1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Отбор проб – по ГОСТ 26668, подготовка к испытанию – по 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 или импортный с аналогичными техническими характеристиками;

термостат с диапазоном рабочих температур от 28 до 55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1 °С;

холодильник бытовой;

стерилизатор горячим воздухом;

адонит;

мальтоза;

метил бутанол (амиловый спирт);

мочевина;

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

**Издание официальное** ★ **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1990
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

нейтральный красный;
натрия дезоксихолат;
натрия тиосульфат ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$);
натрий аммония фосфат;
полимиксин В сульфат во флаконах по 25 мг (250 000 ЕД и по 50 мг (500 000 ЕД);
полимиксин М сульфат во флаконах по 500 000 ЕД;
L – или DL-фенилаланин;
L – или DL-орнитин;
феноловый красный;
желчь сухая или желчь натуральная крупного рогатого скота;
железа (III) цитрат;
железо хлорное ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)

## 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

**3.1. Приготовление растворов**

3.1.1. Спиртовой раствор массовой концентрацией бромтимолового синего 16 г/дм$^3$: 1,6 г бромтимолового синего переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ и растворяют в этиловом спирте с массовой долей 96 %. Раствор доливают этиловым спиртом до метки.

3.1.2. Раствор массовой концентрацией мочевины 500 г/дм$^3$: 50 г мочевины переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде, раствор доливают до метки.

3.1.3. Щелочной раствор фенолового красного массовой концентрацией 16 г/дм$^3$: 1,6 г фенолового красного растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см$^3$ в растворе гидроксида натрия массовой концентрацией 100 г/дм$^3$. Раствор доливают раствором гидроксида натрия до метки.

3.1.4. Раствор хлорного железа массовой концентрацией 100 г/дм$^3$: 16,6 г ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки.

3.1.5. Раствор гидроксида натрия массовой концентрацией 100 г/дм$^3$: 10 г гидроксида натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки.

3.1.6. Раствор кристаллического фиолетового массовой концентрацией 1 г/дм$^3$: 0,1 г кристаллического фиолетового переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки.

3.1.7. Раствор для среды агара-дезоксихолат-цитрат лактозного: 17,0 г натрия лимоннокислого, 1,0 г натрия тиосульфата, 2,0 г железа (III) цитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доводят до метки и выдерживают на водяной бане при (60 ± 1) °С в течение 1 ч. Раствор хранят при комнатной температуре не более 3 мес.

3.1.8. Раствор дезоксихолата натрия массовой концентрацией 100 г/дм$^3$: 10 г дезоксихолата натрия переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки и выдерживают на водяной бане при (60 ± 1) °С в течение 1 ч. Раствор хранят при комнатной температуре не более 6 мес.

3.1.9. Растворы полимиксин В сульфата или полимиксин М сульфата готовят непосредственно перед использованием, для этого во флакон со стерильным антибиотиком вносят 5 или 10 см$^3$ стерильной дистиллированной воды.

3.1.10. Реактивы для определения индола:

Реактив Ковача: 5,0 г парадиметиламинобензальдегида растворяют в 75 см$^3$ метил бутанола и добавляют 25 см$^3$ концентрированной соляной кислоты ($\rho$ = 1,18—1,19 г/см$^3$).

Реактив Эрлиха: 4,0 г парадиметиламинобензальдегида растворяют в 380 см$^3$ этилового спирта с массовой долей 96 % и добавляют 80 см$^3$ концентрированной соляной кислоты ($\rho$ = 1,18 — 1,19 г/см$^3$).

Реактивы хранят в сосудах из темного стекла при температуре (4 ± 2) °С не более 1 мес.

3.1.11. Вазелиновое масло готовят по ГОСТ 10444.1.

3.1.12. Спиртовой раствор массовой концентрацией бромкрезолового пурпурного 10 г/дм$^3$: 1 г бромкрезолового пурпурного переносят в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$ и растворяют в этиловом спирте с массовой долей 96 %. Раствор доливают этиловым спиртом до метки.

**3.2. Приготовление питательных сред**

3.2.1. Агар мясо-пептонный готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.2. Бульон мясо-пептонный готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2.3. Среда жидкая селективная. Основа среды: к 1 дм$^3$ мясо-пептонного бульона по п. 3.2.2 добавляют 1,0 г маннита, 50,0 см$^3$ натуральной бычьей желчи или эквивалентное количество сухой желчи, 0,8 г калия фосфорнокислого двузамещенного, 2,0 см$^3$ раствора кристаллического фиолетового, приготовленного по п. 3.1.6, 2,0 см$^3$ спиртового раствора бромтимолового синего, приготовленного по п. 3.1.1. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял (6,9 ± 0,1) при 25 °С. Стерилизуют текучим паром при 100 °С в течение 15 мин.

Для приготовления среды к основе добавляют асептически 10,0 см$^3$ раствора мочевины, приготовленного по п. 3.1.2, и 100 000 ЕД полимиксина В сульфата или 120 000 ЕД полимиксина М сульфата. Среду разливают в стерильные пробирки по 5 см$^3$. Хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут. Готовая среда прозрачная, желто-бурого цвета.

3.2.4. Агар дезоксихолат-цитрат лактозный по Leifson модификация Hynes.

Основа среды: в 1 дм$^3$ кипящей мясной воды, приготовленной по ГОСТ 10444.1, растворяют 5,0 г пептона, 10,0 г лактозы, 22,5 г агара, охлаждают до (45—50) °С, устанавливают pH таким образом, чтобы при 25 °С он составлял (7,4 ± 0,1). Прибавляют 0,03 г нейтрального красного, разливают в мерные колбы, стерилизуют при (115 ± 1) °С в течение 20 мин. Хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут.

Допускается использовать вместо 1 дм$^3$ мясной воды и 5,0 г пептона 1 дм$^3$ мясо-пептонного бульона, приготовленного по п. 3.2.2.

Для приготовления питательной среды к расплавленной и охлажденной до 45—50 °С основе прибавляют из расчета на 100 см$^3$ основы 5 см$^3$ раствора солей, приготовленных по п. 3.1.7, и 5 см$^3$ раствора дезоксихолата натрия, приготовленного по п. 3.1.8. Среду перемешивают и разливают по стерильным чашкам Петри по ГОСТ 26670. Среду используют в день ее приготовления.

3.2.5. Агар тройной сахарный с цитратом железа: в 1 дм$^3$ мясо-пептонного бульона по п. 3.2.2 растворяют при нагревании 15 см$^3$ дрожжевого экстракта, 10,0 г пептона, 10,0 г лактозы, 10,0 г сахарозы, 1,0 г глюкозы, 0,3 г железа (III) цитрата, 0,3 г натрия тиосульфата, 0,024 г фенолового красного, 15,0 г агара. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,4 ± 0,1). Разливают в пробирки и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 10 мин, дают застыть в наклонном положении, чтобы максимальная высота столбика составляла 2,5 см. Среда имеет коричнево-красную окраску. Хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

3.2.6. Среда для расщепления фенилаланина: 15 см$^3$ дрожжевого экстракта, 2,0 г *DL*-фенилаланина или 1,0 г *L*-фенилаланина, 1,0 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, 5,0 г натрия хлорида, 12,0 г агара растворяют в 1 дм$^3$ кипящей дистиллированной воды. По 5 см$^3$ среды разливают в пробирки, стерилизуют при (121 ± 1) °С 10 мин, дают застыть в наклонном положении. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут.

3.2.7. Агар с цитратом: 0,2 г магния сульфата, 1,0 г однозамещенного фосфорнокислого аммония, 1,0 г натрия аммония фосфата, 2,0 г трехосновного натрия лимоннокислого, 5,0 г натрия хлорида, 0,08 г бромтимолового синего, 15,0 г агара растворяют в 1 дм$^3$ кипящей дистиллированной воды. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,0 ± 0,1). Стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин и дают застыть в пробирках в наклонном положении. Среда имеет зеленую окраску, ее хранят при комнатной температуре не более 7 сут.

3.2.8. Агар дифференциально-диагностический: к 1 дм$^3$ расплавленного мясо-пептонного агара по п. 3.2.1 добавляют 15,0 см$^3$ дрожжевого экстракта, 10,0 г маннита, 10,0 г мальтозы, 80,0 см$^3$ натуральной бычьей желчи или эквивалентное количество сухой желчи, 2,0 г железа (III) цитрата, 0,5 г натрия тиосульфата, 0,5 см$^3$ раствора кристаллического фиолетового, приготовленного по п. 3.1.6, 2,0 см$^3$ щелочного раствора фенолового красного, приготовленного по п. 3.1.3, раствор антибиотика, приготовленного по п. 3.1.9 и содержащего 120 000 ЕД полимиксина М сульфата или 100 000 ЕД полимиксин В сульфата. Среду стерилизуют текучим паром (при 100 °С) в течение 15 мин и разливают по ГОСТ 26670 после охлаждения по стерильным чашкам Петри. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут. Готовая среда оранжево-красного цвета.

3.2.9. Триптон-триптофановая среда (Ljutov): 10,0 г триптона или пептона, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г *DL*-триптофана или 0,5 г *L*-триптофана растворяют в 1 дм$^3$ кипящей дистиллированной воды и фильтруют, устанавливают pH так, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (7,5 ± 0,1). Среду разливают по 5 см$^3$ в пробирки, стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Среду используют в день приготовления.

3.2.10. Среда для определения декарбоксилазы орнитина:

в 1 дм$^3$ дистиллированной воды растворяют при нагревании 5,0 г *L*-орнитина или 10,0 г *DL*-орнитина, 15,0 см$^3$ дрожжевого экстракта, 1,0 г глюкозы, 1,2 см$^3$ раствора бромкрезолового пурпурного, приготовленного по п. 3.1.12. Устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С (6,8 ± 0,1). Среду разливают в пробирки по 5 см$^3$ и стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 10 мин. Хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут. Готовая среда светло-фиолетового цвета.

## 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669 так, чтобы можно было определить предполагаемое минимальное количество продукта, содержащее бактерии родов Proteus и (или) Morganella, и (или) Providencia или видов Proteus vulgaris или Proteus mirabilis.

4.2. Из продукта и (или) соответствующих разведений высевают по 1,0 см$^3$ в жидкую селективную среду по п. 3.2.3. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч.

4.3. Положительными считают пробирки, в которых наблюдается помутнение среды. При росте бактерий, расщепляющих мочевину, наблюдается изменение цвета среды в синий. Отсутствие изменения цвета среды не является показателем отсутствия роста выявляемых бактерий.

4.4. Для подтверждения присутствия бактерий родов Proteus и (или) Morganella, и (или) Providencia или видов Proteus vulgaris или Proteus mirabilis из всех пробирок, в которых наблюдается помутнение среды, делают пересевы на одну из дифференциально-диагностических плотных сред, приготовленных по п. 3.2.4 или по п. 3.2.8, таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний.

Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч.

4.5. На дифференциально-диагностических плотных средах бактерии образуют колонии круглой формы диаметром 1—3 мм. Бактерии рода Proteus обладают свойством роения (ползучим ростом).

4.6. Из всех чашек с характерным ростом выбирают не менее 5 колоний для выделения чистых культур и дальнейшего изучения.

Для получения чистых культур используют скошенный в пробирке мясо-пептонный агар по п. 3.2.1 или мясо-пептонный бульон по п. 3.2.2. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

4.7. Биохимическое подтверждение принадлежности выделенных микроорганизмов к бактериям родов Proteus и (или) Morganella, и (или) Providencia.

4.7.1. Для определения наличия дезаминазы фенилаланина из 24-часовой культуры по п. 4.6 делают высев штрихами на поверхность скошенного в пробирке агара, приготовленного по п. 3.2.6, и культивируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч, после этого на поверхность агара пипеткой наносят 3—5 капель раствора хлорного железа, приготовленного по п. 3.1.4. При этом появление интенсивной зеленой окраски среды свидетельствует о положительной реакции. При отрицательной реакции цвет среды не меняется.

Бактерии родов Proteus, Morganella, Providencia дают положительную реакцию.

4.7.2. Для определения способности образовывать сероводород культуры по п. 4.6 высевают методом укола в столбик и штрихами по поверхности агаризованной среды, приготовленной по п. 3.2.5.

Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч. При образовании сероводорода столбик среды чернеет. Бактерии рода Proteus образуют сероводород, при этом в столбике среды появляется газ, что указывает на ферментацию глюкозы с образованием кислоты и газа.

Допускается инкубирование посевов при отсутствии сероводорода через 48 ч продолжать до 4 сут, так как P.myxofaciens может образовывать сероводород на 3-и – 4-е сутки. Бактерии рода Morganella и Providencia сероводорода не образуют.

4.7.3. Для определения способности утилизировать цитрат культуры, не образующие сероводород по п. 4.7.2, пересевают на поверхность скошенного агара, приготовленного по п. 3.2.7. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч. Окрашивание среды в синий цвет – положительная реакция, отсутствие изменения— отрицательная реакция.

Бактерии рода Providencia утилизируют цитрат, бактерии рода Morganella не утилизируют цитрат.

4.8. Для дифференцирования видов P.vulgaris и P.mirabilis у культур, образующих сероводород по п. 4.7.2, проводят определение наличия декарбоксилазы орнитина и способности образовывать индол.

4.8.1. Для определения способности образовывать индол выделенные культуры высевают в триптон-триптофановую среду, приготовленную по п. 3.2.9. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч. После инкубирования добавляют 1 $см^3$ реактива Ковача или Эрлиха, приготовленных по п. 3.1.10. Темно-красное кольцо свидетельствует о положительной реакции.

P.vulgaris образует индол, P.mirabilis и P.myxofaciens индола не образуют.

4.8.2. Для определения наличия декарбоксилазы орнитина выделенные культуры высевают в среду, приготовленную по п. 3.2.10. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 48 ч. Положительной реакцией считают помутнение среды и изменение ее цвета в фиолетовый.

P.mirabilis дает положительную реакцию, P.vulgaris P.myxofaciens – отрицательную.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

5.2. Если при изучении культуральных и биохимических свойств обнаружены микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин, то их относят к бактериям родов Proteus, Morganella, Providencia.

5.2.1. Результаты испытания записывают следующим образом: фенилдезаминирующие бактерии родов Proteus, Morganella, Providencia обнаружены или не обнаружены.

5.3. Если при изучении культуральных и биохимических свойств обнаружены микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин и образующие сероводород, то их относят к бактериям рода Proteus.

Микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин, не образующие сероводород, утилизирующие цитрат, относят к бактериям рода Providencia.

Микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин, не образующие сероводород, не утилизирующие цитрат, относят к бактериям рода Morganella.

5.3.1. Результаты испытания записывают следующим образом: бактерии родов Proteus и (или) Morganella и (или) Providencia обнаружены или не обнаружены.

5.4. Если при изучении культуральных и биохимических свойств обнаружены микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин, образующие сероводород и индол, не декарбоксилизирующие орнитин, то их относят к бактериям вида P.vulgaris.

Если при изучении культуральных и биохимических свойств обнаружены микроорганизмы, дезаминирующие фенилаланин, образующие сероводород, не образующие индол, декарбоксилирующие орнитин, то их относят к бактериям вида P.mirabilis.

5.4.1. Результаты испытания записывают следующим образом:

бактерии видов P.vulgaris и (или) P.mirabilis обнаружены или не обнаружены.

5.5. При записи результатов испытания указывают навеску продукта, в котором обнаружены или не обнаружены выявляемые микроорганизмы.

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Всесоюзным научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 24.05.90 № 1277

3. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

4. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

| Обозначение НТД, на который дана ссылка | Номер раздела, пункта |
|---|---|
| ГОСТ 10444.1—84 | 2, 3.1.11, 3.2.1, 3.2.2 |
| ГОСТ 24104—88 | 2 |
| ГОСТ 26668—85 | 1 |
| ГОСТ 26669—85 | 1, 5.1 |
| ГОСТ 26670—91 | 3.2.4, 3.2.8 |

5. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 5—94 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 11-12—94)**

6. **ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2010 г.**

gost.e-ecolog.ru