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 ($FeC1_3 \cdot 6H_2O$)

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 ($FeC1_3 \cdot 6H_2O$) 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 (ρ = 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 (ρ = 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