ГОСТ 10444.8—88

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ BACILLUS CEREUS

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

перепечатка запрещена

УДК 663/.664:543.9:006.354 Группа Н09

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод определения Bacillus cereus

Food products. Method for determination of Bacillus cereus

ГОСТ 10444.8—88

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Дата введения 01.01.90

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод определения Bacillus cereus, в том числе близких к нему видов B. anthracis, B. thuringiensis, B. cereus var. mycoides.

Метод основан на выделении B. cereus из колоний, полученных при поверхностном посеве продукта, его разведения или культуральной жидкости на селективные среды. Принадлежность выделенных колоний к B. cereus определяют по морфологическим и биохимическим свойствам. В зависимости от требований нормативного документа подсчитывают количество или учитывают присутствие (отсутствие) B. cereus в исследуемом продукте.

Метод предназначен для:

установления соответствия микробиологических показателей качества пищевого продукта требованиям нормативного документа;

исследования продукта по санитарно-эпидемиологическим показаниям;

анализа микрофлоры посевов (культуральной жидкости), в которых обнаружены мезофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы, при необходимости подтверждения присутствия в посевах B. cereus.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Отбор проб пищевых продуктов по ГОСТ 26668, ГОСТ 26809.

1.2. Подготовка проб пищевых продуктов к анализу — по ГОСТ 26669.

Консервы проверяют на герметичность по ГОСТ 8756.18.

Полные консервы, нормальные по внешнему виду, перед испытанием термостатируют при 30—37 °С в таре вместимостью до 1 дм^3 включительно не менее 5 сут, в таре вместимостью свыше 1 дм^3 — не менее 7 сут.

Пищевые продукты, в которых нормируется допустимое количество B. cereus, термостатированию не подлежат.

Масса (объем) навески, предназначенной для приготовления гомогената продукта или исходного разведения, — не менее (10,0±0,1) г (см^3).

Исходные разведения продуктов, с массовой долей NaCl более 5 %, готовят с использованием пептонной воды; исходные разведения мясных, молочных продуктов и молока готовят с использованием физиологического раствора. Для приготовления последующих десятикратных разведений используют пептонно-солевой раствор. Пептонную воду и пептонно-солевой раствор готовят по ГОСТ 26669, физиологический раствор — по ГОСТ 10444.1.

Из пробы пищевого продукта, в котором нормируется количество B. cereus, или его исходного разведения готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством B. cereus, указанном в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Культуральную жидкость разводят так, чтобы получить при высеве раздельные колонии.

Издание официальное ★ Перепечатка воспрещена

© Издательство стандартов, 1988
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2010

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

2.1. Для проведения испытания применяют аппаратуру, материалы и реактивы по ГОСТ 10444.1, а также аппаратуру, материалы и реактивы, указанные ниже:

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104*, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и поверочной ценой деления не более 2 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104*, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и поверочной ценой деления не более 20 мг (для взвешивания продукта);

микроскоп световой биологический с приспособлением для фазовоконтрастного микроскопирования;

стекла предметные по ГОСТ 9284;

стекла покровные по ГОСТ 6672;

петлю бактериологическую;

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

шпатели стеклянные;

калия гидроокись по ГОСТ 24363;

креатин;

полимиксин В сульфат во флаконах по 25 мг (250000 ЕД) и по 50 мг (500000 ЕД);

полимиксин М сульфат во флаконах по 500000 ЕД;

кислоту 5-амино-2-нафтален сульфоновую;

кислоту сульфаниловую;

феноловый красный, индикатор;

цинк — порошок по ГОСТ 3640.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление растворов

3.1.1. Раствор массовой концентрацией гидроокиси калия 400 г/дм^3: 40 г гидроокиси калия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, доводят объем дистиллированной водой до метки.

Применяют для постановки реакции на образование ацетилметилкарбинола.

3.1.2. Раствор массовой концентрации гидроокиси натрия 4 г/дм^3: 0,4 г гидроокиси натрия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см^3, доводят объем дистиллированной водой до метки.

Применяют для приготовления раствора индикатора фенолового красного.

3.1.3. Раствор полимиксин В сульфата или полимиксин М сульфата: непосредственно перед использованием во флакон со стерильным полимиксин сульфатом 250000 ЕД (для инъекций) внести 2,5 см^3 стерильной дистиллированной воды (на 500000 ЕД вносят 5 см^3 воды).

Применяют для приготовления селективных сред.

3.1.4. Раствор 5-амино-2-нафтален сульфоновой кислоты: 0,1 г 5-амино-2-нафтален сульфоновой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 15 %, в мерную посуду вместимостью 100 см^3 и доводят этой же кислотой объем до метки.

Раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят при температуре (4±2) °С в хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 3 мес.

Применяют для приготовления индикатора при определении нитратредуцирующих свойств.

3.1.5. Раствор массовой концентрации сульфаниловой кислоты 4 г/дм^3: 0,4 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 15 %, в мерную посуду вместимостью 100 см^3.

Объем доводят до метки тем же раствором уксусной кислоты. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят при температуре (4±2) °С в хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 2 мес.

Применяют для приготовления индикатора при определении нитратредуцирующих свойств.

---

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

3.1.6. Раствор массовой концентрации сульфаниловой кислоты 8 г/дм^3: 0,8 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 30 %, в мерную посуду вместимостью 100 см^3. Объем доводят до метки тем же раствором уксусной кислоты. Раствор фильтруют через бумажный фильтр и хранят при температуре (4±2) °С в хорошо закупоренных сосудах из темного стекла не более 2 мес.

Применяют в качестве индикатора при определении нитратредуцирующих свойств.

3.1.7. Раствор массовой концентрации 1-нафтола 5 г/дм^3: 0,5 г 1-нафтола переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 30 %, в мерную посуду вместимостью 100 см^3. Объем доводят до метки тем же раствором уксусной кислоты.

Применяют в качестве индикатора при определении нитратредуцирующих свойств.

3.1.8. Растворы с объемной долей уксусной кислоты 15 и 30 %: 15 или 30 см^3 ледяной уксусной кислоты вносят в мерную посуду вместимостью 100 см^3. Объем доводят до метки дистиллированной водой.

Применяют для приготовления индикатора при определении нитратредуцирующих свойств.

3.1.9. Раствор индикатора фенолового красного: 1,25 г фенолового красного растирают в ступке с 40 см^3 раствора гидроокиси натрия, как указано в п. 3.1.2, до полного растворения. Добавляют 460 см^3 стерильной дистиллированной воды. Раствор хранят в сосуде из темного стекла при комнатной температуре не более 3 мес.

Применяют для приготовления агара желточного с полимиксин В или полимиксин М сульфатом.

3.1.10. Эмульсию яично-желточную готовят по ГОСТ 10444.7.

3.2. Приготовление питательных сред

3.2.1. Селективный агар для выделения и идентификации, выпускаемый Дагестанским НИИ питательных сред.

Состав среды на 1 дм^3, г:

ферментативный гидролизат кормовых дрожжей	12,0
L-α-лецитин или яичное масло	1,0
натрий хлористый	3,0
натрий лимоннокислый трехзамещенный	5,0
литий сернокислый	5,0
маннит	5,0
бромтимоловый синий	0,04
агар микробиологический	10,0.

4,0 г сухого порошка готовой среды размешать в колбе со 100 см^3 дистиллированной воды. Колбу закрыть рыхлой ватной пробкой, нагреть на слабом огне до кипения и кипятить 2—3 мин. Раствор профильтровать через ватный фильтр, фильтрат разлить по колбам. Стерилизовать 20 мин при температуре (121±1) °С, pH среды после стерилизации 7,4±0,1.

Применяют в качестве селективной среды.

3.2.2. Лецитин-агар для выделения B. cereus из консервированных продуктов, выпускаемый Дагестанским НИИ питательных сред.

Состав среды на 1 дм^3, г:

ферментативный гидролизат кормовых дрожжей	15,0
L-α-лецитин или яичное масло	1,0
натрий хлористый	3,0
бромтимоловый синий	0,04
агар микробиологический	10,0.

2,8 г сухого порошка готовой среды размешать в колбе в 100 см^3 дистиллированной воды; колбу закрыть рыхлой ватной пробкой, нагреть на слабом огне до кипения и кипятить 2—3 мин. Профильтровать через ватный фильтр. Фильтрат разлить по колбам и стерилизовать 20 мин при температуре (121±1) °С.

Охлажденную до 45—50 °С среду разлить в чашки Петри. После застывания агара чашки подсушить в термостате 40—60 мин. Цвет готовой среды — салатный, pH среды после стерилизации 7,4±0,2.

Применяют в качестве селективной среды для выделения B. cereus из консервированных продуктов.

3.2.3. Агар желточный с хлористым натрием, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлоридом.

К 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона по ГОСТ 10444.1 добавляют 45,0 г хлористого натрия и 15,0 г агара. Смесь кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Среду стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121±1) °С. pH среды после стерилизации 7,2±0,1. Хранят при температуре (4±1) °С не более 1 мес.

Перед употреблением к 1 $дм^3$ расплавленной и охлажденной до 45—55 °С среды добавляют 5 $см^3$ приготовленного непосредственно перед употреблением 1 %-ного водного раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида, 1 $см^3$ раствора полимиксина сульфата и 100 $см^3$ желточной эмульсии, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри.

Применяют в качестве селективной среды.

3.2.4. Агар желточный с маннитом, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и феноловым красным.

К 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 5,0 г хлористого натрия, 10,0 г маннита и 15,0 г агара. Смесь кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Среду стерилизуют в течение 15 мин при температуре (121±1) °С. pH среды после стерилизации 7,1±0,1. Хранят при температуре (4±1) °С не более 1 мес.

Перед употреблением к 1 $дм^3$ расплавленной и охлажденной до 45—55 °С среды добавляют 1 $см^3$ раствора полимиксин В или полимиксин М сульфата, 10 $см^3$ раствора индикатора фенолового красного и 100 $см^3$ желточной эмульсии, хорошо перемешивают и разливают в чашки Петри.

Применяют в качестве селективной среды.

3.2.5. Агар мясо-пептонный готовят по ГОСТ 10444.1.

Применяют для морфологической и биохимической идентификации.

3.2.6. Среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и глюкозой, выпускаемая Дагестанским НИИ питательных сред.

Состав среды на 1 $дм^3$, г:

сухой питательный агар	7,3
глюкоза	3,65
натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,38
натрий хлористый	3,65
бромкрезоловый пурпуровый	0,02.

15,0 г сухого порошка готовой среды растворяют в колбе в 1 $дм^3$ холодной дистиллированной воды, кипятят 1—2 мин, не допуская пригорания, фильтруют, разливают в пробирки столбиком 10—12 см. Стерилизуют 20 мин при температуре 110 °С. pH среды после стерилизации 7,0±0,2, цвет — фиолетовый.

Применяют для определения анаэробной ферментации глюкозы.

3.2.7. Среда с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и маннитом, выпускаемая Дагестанским НИИ питательных сред.

Состав среды на 1 $дм^3$, г:

сухой питательный агар	7,3
маннит	3,65
натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,38
натрий хлористый	3,65
бромкрезоловый пурпуровый	0,02.

15,0 г сухого порошка готовой среды растворяют в колбе в 1 $дм^3$ холодной дистиллированной воды, кипятят 1—2 мин, не допуская пригорания, фильтруют, разливают в пробирки по 5—6 $см^3$. Стерилизуют 20 мин при температуре 110 °С. pH среды после стерилизации 7,0±0,2, цвет — фиолетовый.

Применяют для определения биохимических свойств.

3.2.8. Пептонную среду с глюкозой готовят по ГОСТ 10444.1.

Применяют для определения способности B. cereus образовывать ацетилметилкарбинол.

3.2.9. Нитратная среда

К 1 $дм^3$ мясо-пептонного бульона по ГОСТ 10444.1, добавляют 1,0 г калия азотнокислого. Среду разливают по 5 $см^3$ в пробирки и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Среду хранят при температуре 0—5 °С не более 1 мес.

Применяют для определения нитратредуцирующих свойств.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Выделение характерных колоний

4.1.1. Для проведения испытания отбирают объем 0,1—0,2 $см^3$ подготовленной пробы продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости.

Допускается для получения раздельных колоний проводить посев культуральной жидкости петлей на поверхность питательной среды.

4.1.2. Подготовленную пробу продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости высевают поверхностным методом по ГОСТ 26670 параллельно в две чашки Петри с предварительно подсушенной селективной средой, указанной в пп. 3.2.1—3.2.3 или 3.2.4.

4.1.3. Посевы на чашках Петри термостатируют при (30±1) °С в течение 24—48 ч. Через 24 ч посевы просматривают и выбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 колоний, характерных для B. cereus. Характеристика колоний B. cereus на селективных питательных средах приведена в приложении.

Через 48 ч уточняют число обнаруженных колоний. Корректировку подсчета количества B. cereus проводят после изучения морфологических и биохимических особенностей микроорганизмов из колоний, характерных для B. cereus.

4.2. Подтверждение принадлежности характерных колоний к B. cereus.

4.2.1. Для подтверждения принадлежности подсчитанных колоний к колониям, образуемым B. cereus, микроорганизмы из пяти колоний пересевают на скошенный мясо-пептонный агар и термостатируют 18—24 ч при (30±1) °С.

На скошенном мясо-пептонном агаре B. cereus образует сплошной налет белого цвета, иногда с мучнистой поверхностью. Со скошенного мясо-пептонного агара готовят препараты, окрашивают по Граму по ГОСТ 30425, а также определяют подвижность клеток при микроскопировании методом висячей капли.

В мазках, приготовленных со скошенного агара, B. cereus имеет вид крупных грамположительных палочек размером 1,0—1,2×3,0—5,0 мкм со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетообразных скоплений, реже отдельно друг от друга. B. cereus образует субтерминальные или центральные споры. В висячей капле клетки подвижны, однако могут встречаться штаммы со слабо выраженной подвижностью.

4.2.2. Для доказательства анаэробной ферментации глюкозы культуры со скошенного агара, указанного в п. 4.2.1, высевают уколом в питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и глюкозой (см. п. 3.2.6). Посевы инкубируют при температуре (30±1) °С в течение 24 ч. B. cereus растет, окрашивая среду в желтый или желто-коричневый цвет по всей длине укола.

4.2.3. Для определения способности B. cereus ферментировать маннит культуры со скошенного агара (см. п. 4.2.1) пересевают на питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и маннитом (см. п. 3.2.7). Посевы термостатируют при (30±1) °С в течение 24 ч.

При развитии B. cereus на среде с маннитом, цвет среды не изменяется.

4.2.4. Для постановки реакции на образование ацетилметилкарбинола культуры со скошенного агара (см. п. 4.2.1) пересевают на пептонную среду с глюкозой с pH 7,0. Посевы термостатируют при (30±1) °С в течение 24 ч. В чистую пробирку отбирают 1 $см^3$ культуры, добавляют 0,2 $см^3$ раствора гидроокиси калия массовой концентрацией 400 $г/дм^3$ и 0,6 $см^3$ свежеприготовленного по ГОСТ 10444.1 раствора 1-нафтола и несколько кристаллов креатина. Допускается реакцию на образование ацетилметилкарбинола проводить без применения креатина.

После добавления каждого раствора содержимое пробирки тщательно встряхивают, а затем оставляют на 1 ч при комнатной температуре.

B. cereus образует ацетилметилкарбинол, поэтому окраска среды меняется в розовый цвет.

При отрицательной реакции культуральную жидкость термостатируют дополнительно 24 ч, после чего делают окончательное заключение.

4.2.5. При постановке реакции на подтверждение редукции B. cereus нитратов предварительно убеждаются в том, что сама среда не содержит нитритов. Для этого в две контрольные пробирки со средой добавляют по 0,2—0,5 $см^3$ смеси равных объемов растворов, как указано в пп. 3.1.4, 3.1.5. Если в течение 15 мин не происходит покраснения среды, то среду используют для определения нитратредуцирующей способности микроорганизмов.

Допускается использование йодокрахмального реактива по ГОСТ 10444.1 для контроля отсутствия нитритов в питательной среде.

Для подтверждения редукции нитратов проводят посевы в пробирки с нитратной средой. Посевы термостатируют при температуре (30±1) °С в течение 24 ч, затем добавляют 0,2—0,5 см^3 смеси равных объемов растворов по пп. 3.1.4, 3.1.5.

Если в течение 15 мин не происходит покраснения, добавляют в посев немного порошкообразного цинка и выдерживают еще 10 мин. Если после добавления цинка среда краснеет, то редукция нитратов, вследствие отсутствия B. cereus, не произошла и тест считают отрицательным. Если после добавления цинка среда не краснеет, то делают вывод о том, что редукция нитратов, вследствие присутствия B. cereus произошла.

Допускается вместо смеси равных объемов растворов, указанных в пп. 3.1.4, 3.1.5, использовать растворы, указанных в пп. 3.1.6, 3.1.7.

В этом случае эти растворы добавляют из расчета по две капли каждого раствора к 3 см^3 культуральной жидкости.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Результаты испытания продукта оценивают по каждой пробе отдельно.

5.2. Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из колоний, обнаружены подвижные, грамположительные, нитратредуцирующие, спорообразующие палочки, способные образовывать ацетилметилкарбинол, ферментировать в анаэробных условиях глюкозу и не способные ферментировать маннит, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к B. cereus.

5.3. При необходимости подсчета B. cereus если в 80 % случаев, т. е. не менее чем в четырех из пяти колоний, подтвержден рост B. cereus, то считают, что все характерные колонии, выросшие в чашке, принадлежат к B. cereus.

В остальных случаях количество B. cereus определяют, исходя из процентного отношения подтвержденных колоний к общему количеству характерных колоний, взятых для изучения морфологических и биохимических свойств.

5.4. Результаты испытаний, пересчитывают на 1 г или 1 см^3 продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670.

ПРИЛОЖЕНИЕ
Справочное

ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛОНИЙ B. CEREUS НА СЕЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Название питательной среды	Характеристика колоний
1. Селективный агар для выделения и идентификации	Колонии диаметром 1,5—2,0 мм, окруженные зонами преципитата синего цвета диаметром 4—5 мм. В первые часы роста колонии округлые, выпуклые; затем края колоний становятся изрезанными.
2. Желточный агар с хлористым натрием, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлоридом	Колонии круглые, блестящие, красные, диаметром около 2—3 мм с зоной белого преципитата диаметром около 4—5 мм.
3. Желточный агар с маннитом, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и феноловым красным	Колонии розовые (вследствие отсутствия способности ферментировать маннит), крупные, шероховатые, сухие, окруженные зоной бело-розового преципитата. Если в чашках содержится много микроорганизмов, ферментирующих маннит до кислоты, то характерный розовый цвет колоний B. cereus может побледнеть или исчезнуть, в этом случае эти колонии следует учитывать.
4. Лецитин-агар для выделения B. cereus из консервированных продуктов	Колонии, аналогичные колониям, указанным в п. 1.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Государственным агропромышленным комитетом СССР

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 25.08.88 № 3021

3. В стандарт введен международный стандарт ИСО 7932 (1987)

4. ВЗАМЕН ГОСТ 10444.10—75

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 3640—94	2.1
ГОСТ 6672—75	2.1
ГОСТ 8756.18—70	1.2
ГОСТ 9284—75	2.1
ГОСТ 10444.1—84	1.2; 2.1; 3.2.3; 3.2.4; 3.2.5; 3.2.8; 3.2.9; 4.2.4; 4.2.5
ГОСТ 10444.7—86	3.1.10
ГОСТ 24104—88	2.1
ГОСТ 24363—80	2.1
ГОСТ 26668—85	1.1
ГОСТ 26669—85	1.2
ГОСТ 26670—91	4.1.2; 5.4
ГОСТ 26809—86	1.1
ГОСТ 30425—97	4.2.1

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

7. ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2010 г.