

ГОСТ 10444.8—88

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ BACILLUS CEREUS

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2010

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

ГОСТ

Метод определения
Bacillus cereus

10444.8—88

Food products. Method for determination of *Bacillus cereus*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 дм³ включительно не менее 5 сут, в таре вместимостью свыше 1 дм³ — 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 (см³).

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*, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Культуральную жидкость разводят так, чтобы получить при высеве отдельные колонии.

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 фазово-контрастного микрофотографирования;

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-нафтаген 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/дм³: 40 г гидроокиси калия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см³, доводят объем дистиллированной водой до метки.

Применяют для постановки реакции на образование ацетилметилкарбинола.

3.1.2. Раствор массовой концентрации гидроокиси натрия 4 г/дм³: 0,4 г гидроокиси натрия переносят, смывая дистиллированной водой, в мерную посуду вместимостью 100 см³, 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 см³ стерильной дистиллированной воды (на 500000 ЕД вносят 5 см³ воды).

Применяют для приготовления селективных сред.

3.1.4. Раствор 5-амино-2-нафтаген сульфоновой кислоты: 0,1 г 5-амино-2-нафтаген сульфоновой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 15 %, в мерную посуду вместимостью 100 см³ 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/дм³: 0,4 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 15 %, в мерную посуду вместимостью 100 см³.

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.

С. 3 ГОСТ 10444.8—88

3.1.6. Раствор массовой концентрации сульфаниловой кислоты 8 г/дм³: 0,8 г сульфаниловой кислоты переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 30 %, в мерную посуду вместимостью 100 см³. 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/дм³: 0,5 г 1-нафтола переносят, смывая раствором уксусной кислоты с объемной долей уксусной кислоты 30 %, в мерную посуду вместимостью 100 см³. 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 см³ ледяной уксусной кислоты вносят в мерную посуду вместимостью 100 см³. 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 см³ раствора гидроокиси натрия, как указано в п. 3.1.2, до полного растворения. Добавляют 460 см³ 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 дм³, 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 см³ 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, рН среды после стерилизации 7,4±0,1.

Применяют в качестве селективной среды.

3.2.2. Лецитин-агар для выделения *V. segeus* из консервированных продуктов, выпускаемый Дагестанским НИИ питательных сред.

Состав среды на 1 дм³, 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 см³ 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, рН среды после стерилизации 7,4±0,2.

Применяют в качестве селективной среды для выделения *V. segeus* 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 дм³ 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. рН среды после стерилизации 7,2±0,1. Хранят при температуре (4±1) °С не более 1 мес.

Перед употреблением к 1 дм³ расплавленной и охлажденной до 45—55 °С среды добавляют 5 см³ приготовленного непосредственно перед употреблением 1 %-ного водного раствора 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлорида, 1 см³ раствора полимиксина сульфата и 100 см³ 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 дм³ 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. рН среды после стерилизации 7,1±0,1. Хранят при температуре (4±1) °С не более 1 мес.

Перед употреблением к 1 дм³ расплавленной и охлажденной до 45—55 °С среды добавляют 1 см³ раствора полимиксин В или полимиксин М сульфата, 10 см³ раствора индикатора фенолового красного и 100 см³ 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 дм³, 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 дм³ 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. рН 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 дм³, 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 дм³ холодной дистиллированной воды, кипятят 1—2 мин, не допуская пригорания, фильтруют, разливают в пробирки по 5—6 см³. Стерилизуют 20 мин при температуре 110 °С. рН 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 *V. cereus* образовывать ацетилметилкарбинол.

3.2.9. Нитратная среда

К 1 дм³ мясо-пептонного бульона по ГОСТ 10444.1, добавляют 1,0 г калия азотнокислого. Среду разливают по 5 см³ 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 см³ подготовленной пробы продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости.

Допускается для получения отдельных 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 *V. cereus*. Характеристика колоний *V. cereus* на селективных питательных средах приведена в приложении.

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

4.2. Подтверждение принадлежности характерных колоний к *V. cereus*.

4.2.1. Для подтверждения принадлежности подсчитанных колоний к колониям, образуемым *V. 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 *V. 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, *V. 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 штакетобразных скоплений, реже отдельно друг от друга. *V. 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. *V. cereus* растет, окрашивая среду в желтый или желто-коричневый цвет по всей длине укола.

4.2.3. Для определения способности *V. 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 *V. 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 рН 7,0. Посевы термостатируют при (30±1) °С в течение 24 ч. В чистую пробирку отбирают 1 см³ культуры, добавляют 0,2 см³ раствора гидроксида калия массовой концентрацией 400 г/дм³ и 0,6 см³ 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.

V. 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 *V. 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 см³ 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 посеы в пробирки с нитратной средой. Посевы термостатируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, затем добавляют $0,2\text{--}0,5\text{ см}^3$ 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 *V. cereus*, не произошла и тест считают отрицательным. Если после добавления цинка среда не краснеет, то делают вывод о том, что редукция нитратов, вследствие присутствия *V. 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 *V. cereus*.

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

В остальных случаях количество *V. 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 *V. CEREUS* НА СЕЛЕКТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Название питательной среды	Характеристика колоний
1. Селективный агар для выделения и идентификации	Колонии диаметром $1,5\text{--}2,0$ мм, окруженные зонами преципитата синего цвета диаметром $4\text{--}5$ 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 $2\text{--}3$ мм с зоной белого преципитата диаметром около $4\text{--}5$ 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 <i>V. cereus</i> может побледнеть или исчезнуть, в этом случае эти колонии следует учитывать.
4. Лецитин-агар для выделения <i>V. cereus</i> 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.