М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод выявления и определения количества энтерококков

ГОСТ 28566—90

Food products. Method for detection and determination of count Enterococci

МКС 07.100.30
ОКСТУ 9109

Дата введения 01.07.91

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и устанавливает метод выявления и количественного определения энтерококков (Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Streptococcus avium, Streptococcus gallinarum).

Метод основан на высеве определенного количества продукта или его разведении в жидкую селективную среду или на поверхность плотной селективной среды, аэробном культивировании посевов при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов к энтерококкам, пересчете их количества на 1,0 г ($см^3$) продукта.

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 с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104*, с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и пределом допускаемой погрешности ± 2 мг (для взвешивания реактивов);

весы лабораторные общего назначения с метрологическими характеристиками по ГОСТ 24104, с наибольшим пределом взвешивания до 1 кг и пределом допускаемой погрешности ± 10 мг (для взвешивания продукта);

микроскоп световой биологический с увеличением в 900—1000 раз;

стерилизатор горячим воздухом;

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

холодильник бытовой;

водорода пероксид по ГОСТ 10929;

желчь крупного рогатого скота или сухая желчь;

железо (III) — аммония гидроцитрат;

ферментативный гидролизат казеина;

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001 (здесь и далее).

★

канамицин сульфат во флаконах по 0,5 г — 500 000 ЕД и 1 г — 1 000 000 ЕД, в ампулах по 5 и 10 $см^3$ 5 % раствора, содержащих 0,25 и 0,5 г препарата;

полимиксин М сульфат во флаконах по 500 000 ЕД;

эскулин;

натрия гидрокарбонат ($NaHCO_3$) по ГОСТ 4201.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление растворов

3.1.1. Раствор с объемной долей пероксида водорода 10 %:

33,3 $см^3$ пероксида водорода с содержанием основного вещества 30 % (в случае если пероксид водорода имеет другое содержание основного вещества, то делается пересчет) переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки.

3.1.2. Раствор с массовой долей HCl 5 %:11,5 см концентрированной соляной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки.

3.1.3. Раствор массовой концентрацией натрия гидроксида 50 г/$дм^3$: 5 г натрия гидроксида переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки.

3.1.4. Раствор 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) массовой концентрацией 10 г/$дм^3$:1 г ТТХ переносят, смывая дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки. Раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670. В темной плотно закрытой посуде раствор хранят при (4 ± 2) °С не более 3 мес.

3.1.5. Раствор массовой концентрацией теллурита калия 20 г/$дм^3$: 2 г теллурита калия переносят, смывая дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем дистиллированной водой до метки. Раствор стерилизуют методом мембранной фильтрации по ГОСТ 26670.

3.1.6. 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.

3.1.7. Раствор массовой концентрацией кристаллического фиолетового 0,1 г/$дм^3$: 0,01 г кристаллического фиолетового переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и растворяют в дистиллированной воде. Раствор доливают до метки.

3.1.8. Спиртовой раствор массовой концентрацией бромкрезолового пурпурного 16 г/$дм^3$: 1,6 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.

3.1.9. Раствор массовой концентрацией натрия азида 100 г/$дм^3$: 10 г натрия азида переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют при легком подогревании в дистиллированной воде и раствор доливают до метки. Раствор готовят под вытяжкой, так как пары натрия азида ядовиты.

3.1.10. Раствор массовой концентрацией канамицина сульфата 50 г/$дм^3$ (50 000 000 ЕД) и 100 г/$дм^3$ (100 000 000 ЕД): во флаконы с 0,5 г или 1 г препарата вносят 10 $см^3$ стерильной дистиллированной воды, содержимое флаконов растворяют.

3.1.11. Молоко обезжиренное готовят по ГОСТ 10444.1.

3.1.12. Растворы для окраски по Граму готовят по ГОСТ 10444.1.

3.2. Приготовление питательных сред

3.2.1. *Азидно-глюкозный бульон*

Основа среды: к 1 $дм^3$ мясопептонного бульона, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 5,0 г пептона, 7,5 г глюкозы, 2,5 г натрия хлорида, составные части растворяют нагреванием. После этого охлаждают и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации при 25 °С он составлял 7,2 ± 0,1. Затем основу среды стерилизуют текучим паром (при 100 °С) в течение 30 мин. К основе среды, охлажденной до 50 °С, добавляют 2,0 $см^3$ натрия азида, приготовленного по п. 3.1.9, и 2,0 $см^3$ раствора бромкрезолового пурпурного, приготовленного по п. 3.1.8. Готовую среду не стерилизуют. Среду хранят в защищенном от света и высыхания виде при (4 ± 2) °С не более 3 мес. Непосредственно перед использованием ее разливают по 5 $см^3$ в стерильные пробирки.

3.2.2. Глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 и 9,6:5,0 г триптона или ферментативного казеинового гидролизата, 12,5 $см^3$ дрожжевого экстракта, 1,0 г глюкозы добавляют

к 1 дм^3 дистиллированной воды. Смесь, периодически помешивая, подогревают до полного растворения всех составных частей, охлаждают и устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 7,2 ± 0,1 или 9,6 ± 0,1.

Среду разливают по 5 см^3 в пробирки и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 14 сут.

3.2.3. *Солевой бульон*

Основа среды — глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 ± 0,1 по п. 3.2.2.

При приготовлении питательной среды в 1 дм^3 основы среды растворяют на водяной бане 65,0 г натрия хлорида, разливают по 5 см^3 в пробирки, стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Питательную среду можно готовить за одну операцию, тогда в процессе приготовления основы среды добавляют 65,0 г натрия хлорида. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более месяца.

3.2.4. *40 %-ный желчный бульон*

Основа среды — глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 ± 0,1. К 600 см^3 охлажденной до 45 °С—55 °С основы среды добавляют асептически 400 см^3 стерильной профильтрованной желчи крупного рогатого скота или эквивалентное количество сухой желчи.

Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 3 мес.

3.2.5. Селективный агар по Сланецу и Бертли:

20,0 г пептона, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 2,0 г глюкозы, 4,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного, (15,0 ± 3,0) г агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доливают дистиллированной водой до метки, нагревают до растворения компонентов. Охлаждают, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации он составлял при 25 °С 7,2 ± 0,1. Стерилизуют текучим паром (при 100 °С) в течение 30 мин, охлаждают до 50 °С. Добавляют 4,0 см^3 раствора азида натрия, приготовленного по п. 3.1.9, и 10,0 см^3 раствора 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорида, приготовленного по п. 3.1.4, хорошо перемешивают и разливают по чашкам Петри. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут.

3.2.6. Канамицин азидно-эскулиновый агар (КАЭ-агар):

20,0 г пептона из казеина, 25,0 см^3 дрожжевого экстракта, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г натрия лимоннокислого, 0,5 г железа (III) — аммония гидроцитрата, 1,0 г эскулина, (15,0 ± 3,0) г агара помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, доливают дистиллированной водой до метки. Растворяют составные части при нагревании, охлаждают, устанавливают pH таким образом, чтобы после стерилизации при 25 °С он составлял 7,1 ± 0,1. Стерилизуют при (121 ± 1) °С в течение 15 мин, охлаждают до 50 °С, добавляют 1,5 см^3 раствора азида натрия, приготовленного по п. 3.1.9, и 0,4 см^3 раствора канамицина сульфата массовой концентрацией 50 г/дм^3 или 0,2 см^3 раствора канамицин сульфата массовой концентрацией 100 г/дм^3 и разливают по чашкам Петри. Среду хранят при (4 ± 2) °С не более 7 сут.

3.2.7. Глюкозо-триптонный агар с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 ± 0,1 готовят по п. 3.2.2, но при приготовлении добавляют на 1 дм^3 среды (15,0 ± 3,0) г агара.

3.2.8. Щелочная полимиксиновая среда:

Основа среды — к 400 см^3 мясо-пептонного бульона по ГОСТ 10444.1 добавляют 5 г натрия хлорида, 10 г глюкозы, 10 см^3 дрожжевого экстракта. Основу среды стерилизуют при (110 ± 1) °С в течение 12 мин, охлаждают и добавляют 250 см^3 раствора натрия карбоната массовой концентрацией 21,2 г/дм^3 и 250 см^3 раствора бикарбоната натрия массовой концентрацией 10 г/дм^3. Устанавливают pH таким образом, чтобы при 25 °С он составлял 10,1 ± 0,1. После этого к среде добавляют 200 000 ЕД полимиксина М сульфата, 5,0 см^3 спиртового раствора бромтимолового синего, приготовленного по п. 3.1.6. Среду хранят в защищенном от света и высыхания виде при (4 ± 2) °С не более 7 сут. Непосредственно перед использованием среду разливают по 5 см^3 в стерильные пробирки.

3.2.9. Молочно-ингибиторная среда (МИС):

К 850 см^3 расплавленного и охлажденного до 50 °С мясо-пептонного агара, приготовленного по ГОСТ 10444.1, добавляют 150 см^3 обезжиренного молока, приготовленного по ГОСТ 10444.1, 12,5 см^3 раствора кристаллического фиолетового, приготовленного по п. 3.1.7, 10,0 см^3 раствора калия теллурита, массовой концентрацией 20 г/дм^3, 200 000 ЕД полимиксина М сульфата. Среду не

стерилизуют, разливают в стерильные чашки Петри и хранят при (4 ± 2) °С не более 10 сут. Допускается взамен раствора калия теллурита добавлять в среду 5,0 см^3 раствора 2-, 3-, 5-трифенилтетразолий хлорида, приготовленного по п. 3.1.4.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

4.1. Из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений по ГОСТ 26669 так, чтобы можно было определить ожидаемое количество энтерококков в 1,0 г (см^3) продукта или определить допустимое количество энтерококков, указанное в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта.

При выявлении энтерококков из навески продукта готовят исходное и ряд десятикратных разведений так, чтобы можно было определить минимальное количество продукта, содержащее энтерококки, или высевают навеску продукта, которая указана в нормативно-технической документации на этот продукт.

4.2. Для определения количества энтерококков 0,1 или 0,2 см^3 продукта или его разведения высевают по ГОСТ 26670 на поверхность предварительно подсушенной агаризованной питательной среды, приготовленной по п. 3.2.5 или 3.2.6, или 3.2.9.

4.3. Если необходимо выявить энтерококки в навеске продукта определенной массы или объема, то навеску продукта или его разведение высевают непосредственно в жидкую питательную среду по п. 3.2.1 или 3.2.8.

4.4. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч, через 24 ч проводят предварительный учет результатов, через 48 ч — окончательный.

4.5. После инкубирования посевов, проведенных по п. 4.3, учитывают пробирки с признаками роста микроорганизмов: помутнением среды и изменением ее окраски в желтый цвет. Из пробирок с признаками роста, предположительно энтерококков, делают пересевы на поверхность агаризованной среды п. 3.2.5 или 3.2.6, или 3.2.9 таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний, посевы на этих средах инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

4.6. После инкубирования посевов, проведенных по п. 4.2, учитывают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 характерных для энтерококков колоний:

на питательной среде по п. 3.2.5 колонии энтерококков красно-розовые или карминовые с коричневым оттенком диаметром до 2 мм;

на питательной среде по п. 3.2.6 колонии энтерококков оливково-зеленые до темно-коричнево-черных с равномерной окраской поля;

на питательной среде по п. 3.2.9:

1) с 2-, 3-, 5-ТТХ—колонии вишнево-красные с зоной протеолиза или бесцветные с розовым центром;

2) с теллуритом калия — колонии окрашены в черный цвет.

4.7. Посевы по п. 4.5 через 24—48 ч инкубирования просматривают и отмечают рост колоний, характерных для энтерококков по п. 4.6.

4.8. Для дальнейшего подтверждения принадлежности характерных колоний к энтерококкам отбирают не менее пяти колоний из посевов по пп. 4.6 и 4.7 и пересевают их на чашки Петри с агаризованной средой по п. 3.2.7 таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч.

4.9. Подтверждение принадлежности характерных колоний к энтерококкам

4.9.1. Из колоний, выросших по п. 4.8, готовят препараты, окрашивают по Граму по ГОСТ 30425.

Энтерококки — грамположительные кокки, расположенные парами, короткими или длинными цепочками.

4.9.2. У колоний определяют наличие каталазы по ГОСТ 30425. Энтерококки каталазу не образуют.

4.10. При более углубленном анализе и в целях эпидемиологического обследования проводят дальнейшее подтверждение характерных колоний.

4.10.1. Для определения возможности роста при температуре (45 ± 1) °С культуры высеивают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 ±0,1 по п. 3.2.2. Посевы инкубируют при (45 ± 1) °С 48—72 ч. Энтерококки вызывают помутнение среды.

4.10.2. Для определения возможности роста в среде с массовой концентрацией NaCl 65 г/дм^3 культуры высевают в солевой бульон по п. 3.2.3 и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24—48 ч. Энтерококки вызывают помутнение среды и выпадение осадка. S. avium в среде с массовой концентрацией NaCl 65 г/дм^3 не растет или растет очень медленно.

4.10.3. Для определения возможности роста в питательной среде с pH 9,6 культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом и pH 9,6 по п. 3.2.2 и инкубируют в течение 24—48 ч при (37 ± 1) °С. Энтерококки вызывают помутнение среды.

4.10.4. Для постановки теста на терморезистентность культуры высевают в глюкозо-триптонный бульон с дрожжевым экстрактом с pH 7,2 ± 0,1, пробирки выдерживают при (60 ±1) °С в течение 30 мин и инкубируют в течение 24—48 ч при (37 ± 1) °С. Энтерококки вызывают помутнение среды.

4.10.5. Для определения возможности роста в среде с 40 % желчи культуры высевают в 40 %-ный желчный бульон по п. 3.2.4 и инкубируют в течение 24—48 ч при (37 ± 1) °С. Энтерококки вызывают помутнение среды.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Результаты оценивают по каждой пробе отдельно.

5.2. Если при изучении культуральных и морфологических свойств микроорганизмов обнаружены грамположительные, не образующие каталазу кокки, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относят к энтерококкам.

5.3. Если при подтверждении характерных колоний в 80 % случаев, т. е. не менее чем в 4 из 5 колоний, подтвержден рост энтерококков, то считают, что все колонии, выросшие на чашке по п. 4.6, принадлежат к энтерококкам.

В остальных случаях количество энтерококков определяют исходя из процентного отношения подтвержденных колоний, к общему количеству колоний, взятых для подтверждения.

При посеве навески продукта или разведения продукта на жидкие среды, пробирки считают положительными, если при последующем пересеве на агаризованные среды и подтверждении характерных колоний хоты бы в одной характерной колонии обнаружены энтерококки.

5.4. Результаты записывают следующим образом

5.4.1. Результаты определения количества энтерококков пересчитывают на 1 г/см^3 продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670.

5.4.2. Результаты выявления энтерококков в определенной навеске записывают: энтерококки обнаружены или не обнаружены (при этом указывается навеска продукта).

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 29.05.90 № 1332

3. Стандарт соответствует стандарту СЭВ 6646—89

4. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта, подпункта
ГОСТ 4201—79	2
ГОСТ 10444.1—84	2; 3.1.11; 3.1.12; 3.2.1; 3.2.8; 3.2.9
ГОСТ 10929—76	2
ГОСТ 24104—88	2
ГОСТ 26668—85	1
ГОСТ 26669—85	1; 4.1
ГОСТ 26670—91	3.1.4; 3.1.5; 4.2; 5.4
ГОСТ 30425—97	4.9.1; 4.9.2

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

7. ПЕРЕИЗДАНИЕ