

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МУКА КОРМОВАЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Методы бактериологического анализа

Feeding flour of animal origin.
Methods of bacteriological analysis

ОКСТУ 9209

Дата введения 1983-07-01

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Министерством мясной и молочной промышленности СССР
РАЗРАБОТЧИКИ

А.Ф.Савченко, канд. техн. наук; В.Г.Дедаш, канд. вет. наук; А.Е.Широченко, канд. биолог. наук; Н.В.Луданова, старший инженер

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 17.06.82 N 2421

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 171-81	2.1
ГОСТ 195-77	2.1
ГОСТ 779-55	2.1
ГОСТ 975-88	2.1
ГОСТ 1770-74	2.1
ГОСТ 1791-67	2.1
ГОСТ 2493-75	2.1
ГОСТ 3164-78	2.1
ГОСТ 4025-95	2.1
ГОСТ 4147-74	2.1
ГОСТ 4159-79	2.1
ГОСТ 4198-75	2.1
ГОСТ 4209-77	2.1

ГОСТ 4232-74	2.1
ГОСТ 4328-77	2.1
ГОСТ 4523-77	2.1
ГОСТ 4530-76	2.1
ГОСТ 5541-76	2.1
ГОСТ 5556-81	2.1
ГОСТ 5821-78	2.1
ГОСТ 5833-75	2.1
ГОСТ 5962-67	2.1
ГОСТ 6259-75	2.1
ГОСТ 6672-75	2.1
ГОСТ 6691-77	2.1
ГОСТ 6709-72	2.1
ГОСТ 7031-75	2.1
ГОСТ 7164-78	2.1

[ГОСТ 8253-79](#)

2.1

[ГОСТ 9147-80](#)

2.1

[ГОСТ 9284-75](#)

2.1

[ГОСТ 9412-93](#)

2.1

[ГОСТ 9569-79](#)

2.1

[ГОСТ 9958-81](#)

3.1

[ГОСТ 11109-90](#)

2.1

[ГОСТ 11293-89](#)

2.1

[ГОСТ 12026-76](#)

2.1

[ГОСТ 13739-78](#)

2.1

[ГОСТ 13805-76](#)

2.1

[ГОСТ 16317-87](#)

2.1

[ГОСТ 17206-96](#)

2.1

[ГОСТ 17536-82](#)

1.1

ГОСТ 18300-87	2.1
ГОСТ 18963-73	3.1
ГОСТ 20729-75	2.1
ГОСТ 20730-75	2.1
ГОСТ 21237-75	3.1
ГОСТ 23683-89	2.1
ГОСТ 24104-88	2.1
ГОСТ 25336-82	2.1
ГОСТ 25706-83	2.1

5. Ограничение срока действия снято по протоколу N 2-92 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 2-93)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ с Изменением N 1, утвержденным в декабре 1987 г. (ИУС 4-88)

Настоящий стандарт распространяется на кормовую муку животного происхождения и устанавливает методы бактериологического анализа:

- определение общего количества микробов;
- определение присутствия бактерий группы кишечной палочки;
- определение присутствия бактерий из рода сальмонелл;
- определение присутствия бактерий анаэробов.

1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

1.1. Отбор проб для бактериологического анализа проводят по [ГОСТ 17536](#) сухим стерильным щупом в сухую стерильную стеклянную банку.

1.2. Масса точечной пробы должна быть не менее 100 г. Масса объединенной пробы должна быть не менее 500 г.

1.3. Объединенную пробу тщательно перемешивают и делят пополам. Каждую часть упаковывают в стерильную стеклянную банку. Одну банку направляют в лабораторию, а другую сохраняют на предприятии до окончания анализа.

1.4. При отборе проб составляют акты в двух экземплярах, которые должны содержать следующие данные: наименование предприятия-изготовителя, номер партии, вид и массу продукта, количество упаковочных единиц, дату изготовления продукции и отбора проб.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

2.1. Для проведения бактериологических анализов применяют следующие аппаратуру, материалы и реактивы:

автоклав;

анаэроустат;

весы лабораторные общего назначения по [ГОСТ 24104](#)* 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

* С 1 июля 2002 г. вводится в действие [ГОСТ 24104-2001](#).

гомоенизатор бактериологический, смеситель или аппарат для измельчения тканей с частотой вращения не менее 8000 об/мин;
дистиллятор;

лупы измерительные с увеличением 3[×] и 5[×] по [ГОСТ 25706](#);

лампы ртутно-кварцевые;

микроскоп марок МБИ и МБР по НТД или других аналогичных марок;

мясорубку бытовую по [ГОСТ 4025](#);

потенциометр по [ГОСТ 7164](#);

прибор для подсчета колоний;

термостат электрический с автоматическим терморегулятором;

холодильник электрический бытовой по [ГОСТ 16317](#);

шкаф сушильный лабораторный;

агар микробиологический по [ГОСТ 17206](#);

агар сухой с эозином метиленовым синим (среда Левина);

агар Эндо сухой бактериологический;

агар Плоскирева сухой бактериологический;

агар сухой висмут-сульфит;

альфанафтиламин по НТД;

алхилбензолсульфонат;

баню водяную с терморегулятором;

бульон мясо-пептонный по [ГОСТ 20730](#);

бумагу парафинированную по [ГОСТ 9569](#)*;

* С 01.01.2008 на территории Российской Федерации действует [ГОСТ 9569-2006](#). - Примечание изготовителя базы данных.

бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
вату медицинскую гигроскопическую по [ГОСТ 5556](#);
воду мясную по [ГОСТ 20729](#);
воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
воронки стеклянные по [ГОСТ 25336](#);
дрожжи хлебопекарные прессованные по [ГОСТ 171](#);
желатин пищевой по [ГОСТ 11293](#);
колбы стеклянные лабораторные по [ГОСТ 25336](#);
кристаллизатор с мостиком;
марлю бытовую по [ГОСТ 11109](#);
марлю медицинскую по [ГОСТ 9412](#);
масло иммерсионное для микроскопии по [ГОСТ 13739](#);
масло вазелиновое медицинское по [ГОСТ 3164](#);

мел химический осажденный по [ГОСТ 8253](#);
мясо-говядину по [ГОСТ 779](#);
набор углеводов для исследования ферментации микробов кишечной группы (большой);
набор адсорбированных поливалентных сальмонеллезных 0-сывороток основных пяти групп (А, В, С, Д, Е) и редких групп;
набор 0-моно и поливалентных агглютинирующих колисывороток;
палочки стеклянные;
парафин по [ГОСТ 23683](#);
пептон венгерский фирмы "Рихтер", чешский "Спофа";
пептон сухой ферментативный для бактериологических целей по [ГОСТ 13805](#);
песок кварцевый для тонкой керамики по [ГОСТ 7031](#);
печень говяжью;
пинцеты для предметных стекол;
пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 см³ с ценой деления 0,1 см³ с широким концом;
пипетки Мора вместимостью 25, 50 см³ ;
пипетки пастеровские;
поплавки для пробирок и колб длиной 20, 45 и 75 мм и диаметром 5, 9 и 10 мм соответственно;
препарат с индикатором ВР и глюкозой;
пробирки стеклянные бактериологические по [ГОСТ 25336](#);
пробки корковые по ГОСТ 5541*;

* На территории Российской Федерации действует [ГОСТ 5541-2002](#). -
Примечание изготовителя базы данных.

пробки резиновые конусные по НТД;
проволоку из никелевых сплавов диаметром 0,3-0,5 мм по [ГОСТ 1791](#);
стекла покровные для микропрепаратов по [ГОСТ 6672](#);
стекла предметные для микропрепаратов по [ГОСТ 9284](#);
ступки фарфоровые с пестиком по [ГОСТ 9147](#);
среду КОДА сухую питательную;
флаконы Сокслета;
цилиндры мерные наливные 1-100, 1-250, 1-500 по [ГОСТ 1770](#);
колбы мерные наливные 1-100-2, 1-250-2, 1-500-2 по [ГОСТ 1770](#);
часы песочные на 1, 2, 5 мин;
чашки стеклянные лабораторные по [ГОСТ 25336](#) типа ЧБН (чашки Петри);
шпатели Дригальского;
штативы для пробирок;
шумовку;
яйца куриные;
бриллиантовый зеленый;
бромкрезолпурпур;
бромтимоловый синий;
геницианвиолет;
глицерин по [ГОСТ 6259](#), х.ч.;
глюкозу кристаллическую гидратную по [ГОСТ 975](#), х.ч.;

железо хлористое по [ГОСТ 4147](#);
йод по [ГОСТ 4159](#), х.ч.;
калий йодистый по [ГОСТ 4232](#);
калий фосфорнокислый однозамещенный по [ГОСТ 4198](#), х.ч.;
калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по [ГОСТ 2493](#), ч.д.а.;
калий едкий;
кальций углекислый по [ГОСТ 4530](#);
кислоту розоловую;
кислоту щавелевую;
кислоту сульфаниловую по [ГОСТ 5821](#);
лактозу, х.ч.;
магний хлористый 6-водный по [ГОСТ 4209](#), х.ч.;
магний сернокислый 7-водный по [ГОСТ 4523](#);
маннит по НТД, х.ч.;
метиленовый голубой;
мочевину по [ГОСТ 6691](#), х.ч.;
натрия гидроокись по [ГОСТ 4328](#);
сахарозу по [ГОСТ 5833](#), х.ч.;
спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962*;

* В Российской Федерации действует [ГОСТ Р 51652-2000](#).
спирт этиловый ректифицированный технический по [ГОСТ 18300](#);
фенолрот;
фуксин основной для микробиологических целей;
фуксин (основной и кислый) для микробиологических целей;
хинозол;
натрий сернистокислый безводный по [ГОСТ 195](#).
(Измененная редакция, Изм. N 1).

3. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

3.1. Приготовление питательных сред: пептонной воды, мясо-пептонного агара (МПА), сред Эндо, Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука, Киллиана, Кауфмана, Мюллера, магниевой среды, селенитового бульона, Гисса, "ХБ" (хинозол-бромкрезол-пурпуровый), хлористо-магниевой среды "М" (модифицированной), среды Хейфеца, Булира, Кесслера, Эйкмана, Левина, Ресселя, Плоскирева, висмут-сульфит агара, КОДА, Крумвиде-Олькеницкого, полужидкого агара, кровяного агара по Цейслеру, среды Китт-Тароцци, короткого пестрого ряда среды Вильсон-Блера - производят по [ГОСТ 9958](#), [ГОСТ 18963](#), [ГОСТ 21237](#) и по методикам, утвержденным в установленном порядке.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

3.2. Приготовление испытуемой взвеси и разведений

От общей пробы отвешивают на лабораторных весах навеску массой 50 г и помещают ее в стерильную колбу или стакан гомогенизатора, содержащий 450 см³ стерильного физиологического раствора, и тщательно перемешивают в течение 30 мин, получая основное десятикратное разведение. После отстаивания в течение 10-15 мин из надосадочного слоя берут пипеткой 1 см³ жидкости, вносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора и получают последующее разведение. Из этой пробирки готовят последующие разведения (тысячекратное и т.д.).

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

4.1. Определение общего количества микробов в 1 г муки

4.1.1. Метод основан на способности живых бактериальных клеток образовывать макроколонии при оптимальных условиях культивирования на питательных средах.

4.1.2. По 1 см³ каждого разведения вносят в стерильные бактериологические чашки и заливают 10-15 см³ стерильного, расплавленного и охлажденного до 45 °С мясо-пептонного агара. После застывания среды чашки помещают (вверх дном) в термостат при температуре (30,0±0,5) °С на 72 ч.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

4.1.3. Обработка результатов

Выросшие на чашках колонии подсчитывают, умножают на кратность соответствующего разведения. За общее количество микроорганизмов в 1 г муки принимают среднее арифметическое результатов двух смежных разведений.

4.2. Определение присутствия бактерий группы кишечной палочки

4.2.1. Метод основан на способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять маннит и лактозу, образовывать на средах "ХБ" и Хейфеца кислые продукты, изменяющие цвет индикаторов, входящих в состав этих сред.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

4.2.2. По 1 см³ каждого разведения вносят (по выбору) в пробирки, содержащие по 5 см³ среды: Эйкмана, Кесслер, Булира, Хейфеца, "ХБ" или КОДА. Посевы помещают в термостат при температуре 43 °С для первых пяти сред и 37 °С для последней.

4.2.3. Через 24 ч учитывают рост на средах Эйкмана, Булира по помутнению среды и образованию газа, на средах Хейфеца, "ХБ" и КОДА - по изменению цвета сред.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

4.2.4. Из пробирок, где наблюдается рост микробов, производят посев в количестве 0,1-0,2 см³ на плотные дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина) и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18-24 ч.

Типичные колонии *E. Coli* характеризуются круглой формой, выпуклой или слегка приподнятой в центре поверхностью, ровными краями, розового, красного или малинового цвета с металлическим блеском или без него на среде Эндо и фиолетового или черного - на среде Левина.

Выросшие изолированные колонии (не менее 4) пересевают на мясо-пептонный бульон, выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. После этого одну часть пробирок используют для приготовления мазков, посева на дифференциально-диагностические среды, заражения мышей, вторую - для приготовления кипяченого антигена.

4.2.5. У выделенных культур изучают морфологические, культурально-биохимические и патогенные свойства с целью проведения их родовой дифференциации. Культурально-биохимические свойства изучают по комплексу ЛИМАЦ (лактоза+индол+метилрот+реакция фогес Проскауэра-, цитратно-аммонийные соли +).

Одновременно с определением морфологических, культурально-биохимических и патогенных свойств бактерий проводят серологическую типизацию культур кишечной палочки по O-антигену.

Для приготовления антигена каждую предназначенную для типизации суточную агаровую культуру (пробирку со скошенным агаром) смывают стерильным физиологическим раствором, доводят суспензию бактерий до концентрации 5-6 млрд/см³, кипятят в водяной бане в течение 1 ч и ставят реакцию агглютинации на стекле с комплексной O-сывороткой, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:5.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

4.2.6. Если комплексные O-количесыворотки в начальной реакции не агглютинируют антиген убитой нагреванием культуры, то готовят из этого штамма суспензию бактерий и автоклавируют ее при давлении 10⁵ Па (1 атм) в течение 2 ч для разрушения термостабильного А-антигена. Автоклавируемый антиген исследуют с сыворотками 08, 09, 0101.

4.2.7. Обработка результатов

При наличии агглютинации дают заключение о присутствии в исследуемой муке энтеропатогенных типов *E. Coli*.

Кроме этого, энтеропатогенными признают культуры *E. Coli*, которые: серологически типизируются набором типоспецифических колисывороток, но не вызывают гибель белых мышей;
серологически не типизируются, но вызывают гибель белых мышей.

4.3. Определение присутствия бактерий из рода сальмонелл

4.3.1. Метод выявления сальмонелл основан на определении их характерного роста на элективных средах и установлении ферментативных и серологических свойств.

4.3.2. Навеску муки массой от 50 до 200 г помещают в колбу, содержащую одну из сред предварительного обогащения (физиологический раствор, пептонная вода) при соотношении муки и среды 1:5. Содержимое колбы тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 16-18 ч производят посеvy на две (по выбору) основные среды обогащения (селенитовый бульон, магниевую среду, среды Киллиана, Мюллера, Кауфмана) в соотношении 1:5.

После 16-18 ч термостатирования при температуре 37 °С из обогатительных сред бактериологической петлей производят посеvy в чашки с твердыми дифференциально-диагностическими средами висмут-сульфит агар, среды Плоскирева или Левина (по две чашки), которые помещают в термостат при температуре 37 °С.

4.3.3. Засеянные чашки просматривают через 24-48 ч.

На висмут-сульфит агаре *S. typhi*, *S. paratyphi A* растут в виде мелких, нежных серовато-зеленых колоний с черным центром; *S. Cholerae suis* - в виде зеленых колоний. Колонии почти всех других сальмонелл значительно крупнее, темно-коричневого цвета с металлическим блеском, окруженные светлым ореолом, цвет участка среды под колонией - черный.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде прозрачных или нежно-розовых колоний; на среде Левина - прозрачные, бледные, нежно-розовые или розовато-фиолетовые колонии.

При обнаружении колоний, подозрительных на сальмонеллы, три-пять из них засевают на комбинированные среды: Расселя, Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука или трехсахарную (лактоза, глюкоза, сахароза) "скошенный столбик" с мочевиной.

Высев колоний делают на короткий пестрый ряд, включающий скошенный агар и среды Гисса с лактозой, глюкозой и сахарозой, а также на бульон Хоттингера для определения индола и сероводорода.

Культуры, представляющие грамотрицательные подвижные палочки, ферментирующие глюкозу с образованием газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, не разлагающие мочевины и не образующие индол, подвергаются серологическому исследованию - испытанию в реакции агглютинации на предметном стекле с поливалентной адсорбированной 0-сывороткой.

4.3.4. Обработка результатов

Обнаружение подвижных (кроме *S. pullorum*, *S. gallinarum*) грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, не ферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа (*S. typhi suis* не ферментирует маннит), дающих положительную реакцию агглютинации с поливалентной адсорбированной 0-сывороткой, указывает на наличие бактерий из рода сальмонелл.

4.3.3, 4.3.4. (Измененная редакция, Изм. N 1).

4.4. Определение присутствия бактерий анаэробов

4.4.1. Метод основан на способности анаэробов расти в отсутствие кислорода воздуха, морфологии возбудителей, росте на питательных средах и на выявлении патогенности возбудителей путем заражения лабораторных животных.

4.4.2. В пробирки со средами Китт-Тароцци и Вильсон-Блера и в чашки с кровяным агаром по Цейслеру вносят по 1 см³ первых трех разведений испытуемой взвеси, помещают в термостат и инкубируют при температуре (37,0±0,5) °С в течение 24-48 ч.

Почернение среды Вильсон-Блера, а также быстрое начало роста на среде Китт-Тароцци при обильном газообразовании является характерным для *S. perfringens*. На кровяном агаре через 24 ч поверхность колоний *S. perfringens* слегка выпуклая, округлая, продолговатая, сочные колонии от серого до зеленого цвета, окружены большой зеленовато-коричневой зоной гемолиза. В мазках, приготовленных с кровяного агара, хорошо выражены капсулы и центрально расположенные, крупные овальные, по объему превышающие ширину палочки, споры. Биологическую пробу проводят на морских свинках и белых мышах путем внутрибрюшного заражения двухсуточной бульонной культурой. При положительном результате подопытные животные гибнут через 2-3 сут. Рост *S. botulinum* наблюдается на 2-3 сут. и характеризуется помутнением среды Китт-Тароцци, образованием осадка и запахом прогорклого масла. При исследовании на наличие токсина берут навеску муки массой не менее 50 г, помещают в колбу, содержащую стерильный физиологический раствор в соотношении 1:4. Подготовленный материал настаивают в течение 2-3 ч, затем центрифугируют и центрифугатом заражают внутрибрюшинно или подкожно морских свинок в дозе 1-2 см³ или белых мышей в дозе 0,2-0,3 см³. Контрольным животным вводят подогретый на водяной бане при температуре 100 °С в течение 30 мин центрифугат в тех же дозах.

(Измененная редакция, Изм. N 1).

4.4.3. Обработка результатов

Наиболее характерные признаки роста *S. perfringens* - почернение среды Вильсон-Блера, интенсивный рост на среде Китт-Тароцци с обильным образованием газа, слегка выпуклые, круглые или продолговатые колонии серо-зеленоватого цвета на кровяном агаре. Биопробу считают положительной, когда подопытные животные погибают в течение двух суток после введения им центрифугата, не подвергнутого кипячению.

Электронный текст документа
подготовлен ЗАО "Кодекс" и сверен по:

официальное издание
Комбикорма. Часть 7. Корма растительные.
Методы анализа: Сборник ГОСТов. -
М.: ИПК Издательство стандартов, 2002