

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы микробиологического контроля объектов окружающей
среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов**

**Методические указания
МУК 4.2.2884–11**

ББК 51.21+51.23

М54

М54 Методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов: Методические указания.–М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.

ISBN 978–5–7508–1041–3

1. Разработаны ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (А. И. Верещагин, М. В. Зароченцев, И. В. Новокшонова, М. А. Ярославцева); ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Н. Я. Салова, Л. А. Лунина); ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербурге» (Т. А. Гречанинова, Н. С. Григорьева, Е. В. Кича, И. К. Марушина); Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательским институтом питания (С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, Л. ГГ Минаева) при участии к.б.н. Д. М. Соколова.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 02.06.2011 № 1).

3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г. Г. Онищенко 29.06.2011.

4. Введены впервые.

ББК 51.21+51.23

**О Роспотребнадзор, 2011 ©
Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011**

Содержание

1. Область применения	4
2. Нормативные ссылки	5
3. Требования к помещениям и условиям безопасности	6
4. Аппаратура и материалы	6
5. Описание и принцип действия.....	8
6. Сущность метода.....	8
7. Методы отбора проб	8
8. Подготовка проб к испытанию	9
9. Подготовка петрифильмов	9
10. Определение количества мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ).....	9
11. Определение количества дрожжей и плесневых грибов	11
12. Выявление и определение количества колиформных бактерий (БГКП) и <i>E.coli</i>	12
12.1 Выявление и определение количества колиформных бактерий (БГКП)	12
12.2 Выявление и определение количества бактерий вида <i>Escherichia coli</i>	13
12.3 Одновременное выявление и определение количества <i>E.coli</i> и колиформных бактерий (БГКП)	15
13. Выявление и определение количества бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	16
14. Выявление и определение количества <i>Staphylococcus aureus</i>	17
15. Контроль микробиологической обсемененности объектов среды обитания	19
15.1 Микробиологический контроль смывов с поверхностей	19
15.2 Микробиологический контроль воздушной среды помещений ...	22

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации

Г.Г.ОНИЩЕНКО

29 июня 2011 г.

Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы микробиологического контроля объектов
окружающей среды и пищевых продуктов
с использованием петрифильмов**

**Методические указания
МУК 4.2.2884–11**

1. Область применения

1.1 Настоящие Методические указания устанавливают методы проведения лабораторных исследований по ускоренному выявлению и определению количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), дрожжей и плесневых грибов, колиформных бактерий (БГКП), *E.coli*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококков (*S.aureus*), листерий в объектах окружающей среды (вода, воздух, смывы) и пищевых продуктах с использованием петрифильмов.

1.2 Настоящие Методические указания разработаны в целях усовершенствования микробиологических методов исследования с использованием готовых питательных сред нового формата и гармонизации национальных методов исследования с современными международными стандартами, рекомендованными ИСО.

1.3 Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы для проведения производственного контроля другими испытательными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Нормативные ссылки

2.1 СП 1.3.2322–08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.2 ГОСТ Р ИСО 7218–2008 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям».

2.3 ГОСТ 26668–85 «Продукты пищевые и вкусовые. Порядок отбора проб для микробиологических анализов».

2.4 ГОСТ 26669–85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

2.5 ГОСТ 26670–91 «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов».

2.6 ГОСТ Р 53430–2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа».

2.7 ГОСТ 10444.1–84 «Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

2.8 ГОСТ Р 52816–2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)».

2.9 ГОСТ 29184–91 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*».

2.10 ГОСТ 30726–2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий вида *Escherichia coli*».

2.11 ГОСТ Р 52815–2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*».

2.12 ГОСТ 10444.15–94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов».

2.13 ГОСТ 10444.12–88 «Продукты пищевые. Методы определения дрожжей и плесневых грибов».

2.14 ГОСТ Р 51921–2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*».

2.15 ГОСТ 26809–86 «Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу».

2.16 ГОСТ 30347–97 «Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*».

2.17 МУК 4.2.1122–02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

2.18 ГОСТ Р 51935–2002 «Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний».

2.19 ГОСТ 24104–2001 «Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия».

2.20 ГОСТ 29227–91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

2.21 ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

2.22 ГОСТ 16317–87 «Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия».

2.23 ГОСТ 25336–82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

2.24 ГОСТ 23932–90 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия».

2.25 ГОСТ 6709–72 «Вода дистиллированная. Технические условия».

2.26 ГОСТ Р 51593–2000 «Вода питьевая. Отбор проб».

2.27 ГОСТ Р 51592–2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

3. Требования к помещениям и условиям безопасности

3.1 Условия безопасности, расположение и оснащение помещений лаборатории, а также ее инфраструктура должны удовлетворять требованиям СП 1.3.2322, ГОСТ Р ИСО 7218–2008.

3.2 Лаборатория должна иметь лицензию на деятельность, связанную с использованием возбудителей III–IV групп патогенности.

4. Аппаратура и материалы*

4.1 Термостаты электрические с диапазоном измерения от 15 до 65 °С с допустимой погрешностью регулирования температуры ± 1 °С ТУ 64–1–1382–83

4.2 Автоклав или стерилизатор паровой медицинский ГОСТ 19569

4.3 Шкаф сушильно-стерилизационный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима в диапазоне от 50 до 200 °С с погрешностью ± 2 °С

* Допускается применение средств измерения, испытательного и вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

4.4 Гомогенизатор бактериологический перистальтического типа Masticator со стерильными полиэтиленовыми пакетами	
4.5 Облучатель бактерицидный	ТУ 16–535–84
4.6 Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допустимой погрешностью ± 2 мг	ГОСТ 24104
4.7 Холодильник, позволяющий поддерживать температуру 2–4 °С	ГОСТ 16317
4.8 Пипетки градуированные исполнения 1, 2 классов точности вместимостью 1, 5, 10 см ³	ГОСТ 29227
4.9 Пробирки бактериологические вместимостью не менее 10 см ³	ГОСТ 25336–82
4.10 Посуда широкогорлая	ГОСТ 25336–82
4.11 Лупа измерительная	ГОСТ 25706–93
4.12 Микроскоп световой биологический или других марок	ГОСТ 8284–78
4.13 Петрифильм-подобный Ридер (3М™ Petrifil™ Plate Reader) или с аналогичными характеристиками	
4.14 Растворы и питательные среды	
4.14.1 0,1%-я пептонная вода	ГОСТ 10444.1–84 (п. 4.4)
4.14.2 Физиологический раствор	ГОСТ 10444.1–84 (п. 4.29)
4.14.3 Забуференная пептонная вода	ГОСТ 10444.1–84
4.14.4 Дистиллированная вода	ГОСТ 6709–72
4.15 Петрифильмы, подобные перечисленным или с аналогичными характеристиками:	
4.15.1 3М™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate (AC) - определение количества КМАФАнМ	
4.15.2 3М™ Petrifilm™ Yeast and Mould Count Plate (YM) - определение количества дрожжей и плесневых грибов	
4.15.3 3М™ Petrifilm™ Coliform Count Plate (CC) - выявление и определение количества колиформных бактерий	
4.15.4 3М™ Petrifilm™ Select E.coli Count Plate (SEC) - выявление и определение количества <i>E.coli</i>	
4.15.5 3М™ Petrifilm™ E. coli and Coliform	

Count Plate (EC) - выявление и определение количества *E.coli* и колиформных бактерий

4.15.6 3М™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate (EB) - выявление и определение количества энтеробактерий

4.15.7 3М™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX) + 3М Petrifilm Staph Express Disk - выявление и определение количества

Staphylococcus aureus

4.15.8 3М™ Petrifilm™ Environmental Listeria Count Plate (EL) - выявление и определение количества листерий

5. Описание и принцип действия

Петрифильмы представляют собой тест-пластины, которые состоят из подложки и покрывающей прозрачной пленки. Тест содержит питательную среду, водорастворимый гель, хромогенные субстраты, позволяющие выявить специфические биохимические активности соответствующих микроорганизмов, а также индикаторы, которые окрашивают колонии микроорганизмов в характерный цвет.

6. Сущность метода

Метод выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативноанаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), колиформных бактерий (БГКП), бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, стафилококков (*S.aureus*), листерий (*Listeria spp.*), дрожжей и плесневых грибов основан на высеве навески определенной массы исследуемого образца или его разведений на петрифильмы, инкубировании посевов, выявлении и подсчете характерно окрашенных колоний с образованием газа и/или без газа.

7. Методы отбора проб

7.1 Отбор проб воды проводят в соответствии с ГОСТ Р 51593, ГОСТ Р 51592.

7.2 Отбор проб пищевых продуктов проводят по ГОСТ 26668, ГОСТ 26809, ГОСТ Р 53430 или в соответствии с требованиями других действующих ГОСТ и НД на анализируемый вид образцов (проб).

7.3 Отбор проб с объектов среды обитания проводят в соответствии с НД по контролю за предприятиями торговли, общественного питания, пищевой промышленности и лечебно-профилактическими учреждениями.

8. Подготовка проб к испытанию

8.1 Подготовка проб воды проводят по МУК 4.2.1018.

8.2 Подготовка проб пищевых продуктов проводят по ГОСТ 26669 и другим действующим ГОСТ и НТД на анализируемый вид образцов.

8.2.1 Масса (объем) навески продукта, предназначенной для приготовления исходного разведения, должна составлять не менее $(10,0 \pm 0,1)$ г (см^3).

8.2.2 Из пробы продукта или из его исходного разведения при необходимости готовят ряд десятикратных разведений в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид продукта.

Для разведения используют стерильную дистиллированную воду, физиологический раствор, 0,1% пептонную воду или забуференную пептонную воду по выбору.

Твердые продукты измельчают в гомогенизаторе.

8.2.3 Для обеспечения оптимального роста микроорганизмов величина рН исследуемого образца продукта или его разведения должна быть в интервале значений 6–8.

8.3 Температура проб (образцов) перед испытанием должна быть в пределах комнатной температуры (18–22 °С).

9. Подготовка петрифильмов

9.1 Невскрытые пакеты с петрифильмами хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С.

9.2 Перед использованием петрифильмы выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин, если пластины изменили окраску (появился коричневый оттенок), использовать их нельзя.

9.3 После вскрытия пакета неиспользованные петрифильмы вкладывают в пакет из фольги и закрывают его.

9.4 Вновь запечатанные пакеты хранят в сухом прохладном месте в течение не более одного месяца. Не хранить открытые пакеты в холодильнике во избежание контакта с влагой.

10. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

10.1 Для определения в образце количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate (AC)» или с аналогичными характеристиками. В составе стерильной питательной среды содержится тетразолиевый индикатор (ТТХ), окрашивающий колонии в красный цвет и облегчающий подсчет колоний.

10.2 Методы отбора проб по п. 7.

10.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

10.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

10.5 Порядок проведения испытания.

10.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

10.5.2 Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 10.3, отбирают пробу объемом $(1,0 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Опускают верхнюю пленку петрифильма.

10.5.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифильма выемкой вниз. Надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

10.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

10.5.5 Посевы инкубируют при температуре (30 ± 1) °С в течение (48 ± 3) ч (за исключением образцов молочных продуктов, сырых моллюсков и ракообразных). Образцы молочных продуктов, сырых моллюсков и ракообразных инкубируют в течение (72 ± 3) ч. Петрифильмы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

10.6 Обработка результатов.

10.6.1 После инкубирования посевов по п. 10.5.5 подсчитывают на петрифильме количество красных колоний визуальным или автоматическим способом с помощью Петрифильм-Ридера (3M™ Petrifilm™ Plate Reader).

10.6.2 Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 300 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1,0 см³ (г) образца.

10.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

Примечание.

При большом количестве колоний на петрифильме может наблюдаться окрашивание всей зоны роста в красный или розовый цвет. Иногда на петрифильмах с очень большим количеством колоний в центре может не оказаться видимых колоний, а по краям будет видно множество мелких колоний. В этих случаях необходимо увеличить степень разведения навески образца и заново провести анализ для более точного подсчета микроорганизмов.

Некоторые бактерии могут разжижать гель, что затрудняет подсчет колоний; в этом случае необходимо подсчитывать количество колоний только на неизмененных участках петрифильма.

11. Определение количества дрожжей и плесневых грибов

11.1 Для определения количества в образце дрожжей и плесневых грибов применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (YM)» или с аналогичными характеристиками. Питательная среда петрифильма (YM) содержит антибактериальный антибиотик и индикатор для облегчения подсчета колоний дрожжей и плесневых грибов.

11.2 Методы отбора проб по п. 7.

11.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

11.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

11.5 Порядок проведения испытания.

11.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

11.5.2 Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 11.3, отбирают пробу объемом $(1,0 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Опускают верхнюю пленку петрифильма.

11.5.3 Помещают специальный пластиковый распределитель (для петрифильма «3М™ Petrifilm™ YM») выемкой вниз в центр петрифильма. Надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму.

11.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

11.5.5 Посевы инкубируют при температуре (24 ± 1) °С в течение (72 ± 3) ч (для предварительного учета) и (120 ± 3) ч (для окончательного учета). Петрифильмы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

11.6 Обработка результатов.

11.6.1 После инкубирования посевов по п. 11.5.5 подсчитывают отдельно количество колоний дрожжей и плесневых грибов.

11.6.2 При росте дрожжей на петрифильме образуются колонии различного цвета - от розово-желтого до сине-зеленого цвета. Колонии дрожжей имеют округлую форму, края колоний ровные.

Плесневые грибы образуют колонии различного цвета (черные, желтые, зеленые, синие), плоские с диффузным краем и четким центром.

Для дифференциации колоний дрожжей и плесневых грибов используют Петрифильм-Ридер (3М™ Petrifilm™ Plate Reader) или проводят микроскопические исследования.

11.6.3 Для количественного подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей, и (или) от 5 до 50 колоний

плесневых грибов по ГОСТ 10444.12–88. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают число дрожжей или плесневых грибов в 1,0 см³ (г) образца. Результаты обрабатывают и пересчитывают отдельно для дрожжей и плесневых грибов.

11.6.4 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

Примечание.

Большое число колоний дрожжей может вызвать окрашивание всей зоны роста в голубой цвет, а большое число колоний плесневых грибов - в голубой, черный, желтый или другие цвета. В этих случаях необходимо увеличить степень разведения навески образца и заново провести анализ для более точного подсчета микроорганизмов.

12. Выявление и определение количества колиформных бактерий (БГКП) и *E.coli*

12.1 Выявление и определение количества колиформных бактерий (БГКП)

12.1.1 Для выявления и определения количества колиформных бактерий (БГКП) применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Coliform Count Plate (CC)» или с аналогичными характеристиками. Петрифильм (CC) содержит среду VRB (кристаллический фиолетовый с желчью), рН-индикатор для обнаружения кислоты и тетразолиевый индикатор, который окрашивает колонии микроорганизмов в красный цвет и облегчает подсчет колоний. При ферментации лактозы происходит изменение цвета среды вокруг колоний за счет содержащегося в среде рН-индикатора. Образующийся при ферментации лактозы газ задерживается верхней пленкой петрифильма и скапливается вокруг колоний. Наличие газа вокруг колоний при ферментации лактозы является важным биохимическим признаком колиформных бактерий.

12.1.2 Методы отбора проб по п.7

12.1.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

12.1.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

12.5 Порядок проведения испытания.

12.1.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку петрифильма.

12.1.5.2 Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 12.1.3, отбирают пробу объемом (1,0±0,1) см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма, избегая захвата пузырьков воздуха.

12.1.5.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифильма плоской стороной вниз (выемкой вверх). Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует

перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

12.1.5.4 Распределитель убирают и петрифильм оставляют на 1–2 мин для затвердевания геля.

12.1.5.5 Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч. Петрифильмы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

12.1.6 Обработка результатов.

12.1.6.1 После инкубирования посевов по п. 12.1.5.5 подсчитывают на петрифильме количество колоний колиформных бактерий. Колиформные бактерии на петрифильмах образуют колонии красного цвета с пузырьками газа вокруг колоний. Подсчитывают количество красных колоний, которые связаны с пузырьками газа, визуальным или автоматически с помощью Петрифильм-Ридера (3М™ Petrifilm™ Plate Reader).

12.1.6.2 Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колиформных бактерий (БГКП) в $1,0 \text{ см}^3$ (г) образца.

12.1.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

12.1.6.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ Р 52816 и ГОСТ 30726.

Примечание.

Не учитывают колонии, выросшие на пенопластовом ограничителе зоны роста.

Если на петрифильме отмечается окрашивание всей зоны роста в темно-красный цвет (из-за большого числа колоний), то для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

12.2 Выявление и определение количества бактерий вида *Escherichia coli*

12.2.1 Для выявления и определения количества *Escherichia coli* в анализируемых образцах применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Select *E.coli* Count Plate (SEC)» или с аналогичными характеристиками. Петрифильм (SEC) содержит хромогенный субстрат (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронид) для выявления специфического фермента, продуцируемого *E.coli*-β-глюкуронидазы. Данный фермент расщепляет хромогенный субстрат с образованием окрашенных продуктов реакции, в результате чего колонии *E.coli* приобретают темно-зеленый или сине-зеленый цвет. Рост при температуре (42 ± 1) °С создает дополнительные селективные условия для выявления термотолерантных микроорганизмов, в том числе *E.coli*. Газ, образующийся при ферментации лактозы, скапливается вокруг колоний *E.coli* и является дополнительным диагностическим признаком.

12.2.2 Методы отбора проб по п. 7.

12.2.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

12.2.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

12.2.5 Порядок проведения испытания.

12.2.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

12.2.5.2 Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 12.2.3, отбирают пробу объемом $(1,0 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма, избегая захвата пузырьков воздуха.

12.2.5.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифильма плоской стороной вниз (выемкой вверх). Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

12.2.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

12.2.5.5 Посевы инкубируют при температуре (42 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх в условиях повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

12.2.6 Обработка результатов.

12.2.6.1 После инкубирования посевов по п. 12.2.5.5 на петрифильме учитывают количество колоний зеленого цвета (от темно-зеленого до голубовато-зеленого) с пузырьками газа (или без) вокруг колоний.

12.2.6.2 Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колоний *E.coli* в 1,0 см³ (г) образца.

12.2.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

12.2.6.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ Р 52816 и ГОСТ 30726.

Примечание.

Не учитывают колонии, выросшие на пенопластовом ограничителе зоны роста.

При наличии большого количества мелких колоний на петрифильме для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

12.3 Одновременное выявление и определение количества *E.coli* и колиформных бактерий (БГКП)

12.3.1 Для одновременного выявления и определения количества *Escherichia coli* и колиформных бактерий тип петрифилма – «3М™ Petrifilm™ E.coli/Coliform Count (EC)» или с аналогичными характеристиками. Петрифилм (EC) содержит питательную основу среды VRB (кристаллический фиолетовый с желчью), а также хромогенный субстрат (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронид) для выявления специфического фермента, продуцируемого *E.coli*-β-D-глюкуронидазы. Данный фермент расщепляет хромогенный субстрат с образованием окрашенных продуктов реакции, в результате чего колонии *E.coli* приобретают синий цвет. Среда содержит тетразолиевый индикатор, в результате чего колонии колиформных бактерий окрашиваются в красный цвет. Образующийся при ферментации лактозы газ задерживается верхней пленкой петрифилма и скапливается вокруг колоний. Наличие газа вокруг колоний при ферментации лактозы является важным биохимическим признаком колиформных бактерий.

12.3.2 Методы отбора проб по п. 7.

12.3.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

12.3.4 Подготовка петрифилмов к испытанию по п. 9.

12.3.5 Порядок проведения испытания.

12.3.5.1 Петрифилм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

12.3.5.2 Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 12.3.3, отбирают пробу объемом $(1,0 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифилма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифилма, избегая захвата пузырьков воздуха.

12.3.5.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифилма плоской стороной вниз (выемкой вверх). Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифилму!

12.3.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифилм на 1–2 мин для затвердевания геля.

12.3.5.5 Для определения колиформных бактерий (БГКП) посеы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх в условиях повышенной влажности. Для определения *E.coli* инкубацию продлевают до (48 ± 4) ч. Допускается размещать петрифилмы друг на друга по 20 штук.

12.3.6 Обработка результатов.

12.3.6.1 После инкубирования посевов по п. 12.3.5.5 на петрифилме учитывают количество колоний визуально или автоматически (с помощью

Петрифильм-Ридера - 3М™ Petrifilm™ Plate Reader). Колиформные бактерии образуют колонии красного цвета, а *E.coli* - колонии синего цвета с пузырьками газа вокруг колоний. Для учета *E.coli* подсчитывают количество синих колоний с пузырьками газа. Общее количество колиформных бактерий включает как красные, так и синие колонии, связанные с образованием газа в течение 24–48 ч.

12.3.6.2 Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колоний *E.coli* в 1,0 см³ (г) образца.

12.3.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

12.3.6.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ Р 52816 и ГОСТ 30726.

Примечание.

Не учитывают колонии, выросшие на пенопластовом ограничителе зоны роста.

При окрашивании зоны роста петрифильма в синий или красный цвет либо при потемнении цвета геля (большое число колоний *E.coli* или колиформных бактерий) для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

13. Выявление и определение количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

13.1 Для определения количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (далее - энтеробактерий) применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate (EB)» или с аналогичными характеристиками. Петрифильм (EB) содержит основу среды VRBG (кристаллический фиолетовый с желчью и глюкозой). Среда содержит тетразолиевый индикатор, который окрашивает колонии в красный цвет. При ферментации глюкозы энтеробактерии образуют желтые зоны подкисления вокруг колоний с пузырьками газа или без них.

13.2 Методы отбора проб по п. 7.

13.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

13.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

13.5 Порядок проведения испытания.

13.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

13.5.2 Из исследуемого образца или его разведения, приготовленного по п. 13.3, отбирают пробу объемом (1,0±0,1) см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма, избегая захвата пузырьков воздуха.

13.5.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифильма плоской стороной вниз. Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

13.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

13.5.5 Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

13.6 Обработка результатов.

13.6.1 После инкубирования посевов по п. 13.5.5 подсчитывают количество колоний визуальным или автоматическим (с помощью Петрифильм-Ридера - 3М™ Petrifilm™ Plate Reader). Энтеробактерии образуют красные колонии с желтыми зонами и пузырьками газа (или без них). Колонии, которые не образуют желтые зоны или не образуют газ, не являются энтеробактериями.

13.6.2 Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний по ГОСТ 29184–91. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колоний энтеробактерий в $1,0 \text{ см}^3$ (г) образца.

13.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

13.6.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ 29184.

Примечание.

Не учитывают колонии, выросшие на пенопластовом ограничителе зоны роста.

При окрашивании зоны роста петрифильма в желтый цвет, при сильном потемнении зоны роста, а также при наличии большого числа мелких колоний для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

14. Выявление и определение количества

Staphylococcus aureus

14.1 Для выявления и определения количества *Staphylococcus aureus* применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX)» + «3М™ Petrifilm™ Staph Express Disk» или с аналогичными характеристиками. Петрифильмы (STX) содержат модифицированную хромогенную среду на основе среды Байрд-Паркера. *S.aureus* образует красно-фиолетовые колонии. Если на петрифильме (STX) вырастают колонии других цветов (черные, сине-зеленые), то проводят их дополнительную идентификацию с использованием петрифильм-диска (3М™ Petrifilm™ Staph Express Disk). Диск содержит краситель (толуидин синий) и ДНК

(дезоксирибонуклеиновую кислоту). *S.aureus* продуцирует фермент термонуклеазу, который расщепляет ДНК и реагирует с красителем диска, образуя зоны розового цвета.

Данный тип петрифильма используется для анализа пищевых продуктов с предполагаемым низким загрязнением бактериями *Staphylococcus aureus* (не более 300 КОЕ/г) без предварительного разведения, при большем уровне загрязнения необходимо проведение соответствующих разведений.

14.2 Методы отбора проб по п. 7.

14.3 Подготовка образца к испытанию по п. 8.

14.4 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

14.5 Порядок проведения испытания.

14.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

14.5.2 Из исследуемого образца или его разведения, приготовленного по п. 14.3, отбирают пробу объемом $(1,0 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма.

14.5.3 Помещают специальный пластиковый распределитель (для петрифильма «3М™ Petrifilm™ Staph Express») в центр петрифильма. Надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

14.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

14.5.5 Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 2) ч в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга по 20 штук.

14.6 Обработка результатов.

14.6.1 После инкубирования посевов по п. 14.5.5 подсчитывают количество колоний *S.aureus*. На петрифильме *S.aureus* образует колонии красно-фиолетового цвета.

Для подсчета отбирают петрифильмы, на которых выросло от 15 до 150 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колоний *S.aureus* в 1,0 см³ (г) образца.

14.6.2 При росте на петрифильме колоний черного, сине-зеленого или иных цветов проводят их идентификацию с использованием диска «3М™ Petrifilm™ Staph Express Disk».

Приподнимают верхнюю пленку петрифильма и помещают диск на поверхность подложки петрифильма. Выступ диска остается снаружи петрифильма. Опускают верхнюю пленку и аккуратно прижимают ее всей поверхностью к диску, обеспечивая плотный контакт диска и среды на петрифильме.

Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 1–3 ч.

После инкубирования посевов учитывают на диске все зоны розового цвета, образуемые *S.aureus*. Получают количество *S.aureus* в 1,0 см³ (г) образца.

14.6.3 Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670.

14.6.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ Р 52815 и ГОСТ 30347.

Примечание.

Не учитывают колонии, выросшие на пенопластовом ограничителе зоны роста.

При большом количестве колоний на петрифилме (свыше 300) для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

При окрашивании диска в розовый цвет без четко выраженных зон для получения количественного результата готовят разведения образца и заново проводят анализ.

15. Контроль микробиологической обсемененности объектов среды обитания

15.1 Микробиологический контроль смывов с поверхностей

15.1.1 Выявление и определение общего микробного числа, количества дрожжей и плесневых грибов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококков (*S. aureus*).

Используемые петрифилмы подобны перечисленным или с аналогичными характеристиками:

«3М™ Petrifilm™ Aerobic CountPlate (AC)» - для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

«3М™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (YM)» - для определения количества дрожжей и плесневых грибов

«3М™ Petrifilm™ Coliform Count Plate (CC)» - для выявления и определения количества колиформных бактерий (БГКП)

«3М™ Petrifilm™ Select E.coli Count Plate (SEC)» - для выявления и определения количества *Escherichia coli*

«3М™ Petrifilm™ E.coli/Coliform Count (EC)» - для выявления и определения количества *E.coli* и колиформных бактерий (БГКП)

«3М™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate (EB)» - для выявления и определения количества энтеробактерий

«3М™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate (STX)» + «3М™ Petrifilm™ Staph Express Disk» - для выявления и определения количества стафилококков (*S.aureus*).

15.1.1.1 Метод отбора смывов.

15.1.1.1.1 Стерильный тампон увлажняют в пробирке с 1 мл стерильного физиологического раствора.

15.1.1.1.2 Исследуемую поверхность тщательно протирают тампоном три раза в разных направлениях.

15.1.1.1.3 После взятия смыва тампон опускают в пробирку.

15.1.1.2 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

15.1.1.3 Подготовка смывов к испытанию.

15.1.1.3.1 Пробирки с тампонами тщательно встряхивают или перемешивают в вортексе в течение 10 с.

15.1.1.3.2 Отжимают смывную жидкость из тампона, надавливая тампоном на стенки пробирки, одновременно вращая тампон.

15.1.1.4 Порядок проведения испытания.

15.1.1.4.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

15.1.1.4.2 Вносят $(1,0 \pm 0,1)$ см³ смывной жидкости из пробирки (п. 15.1.1.3.2) на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма, избегая захвата пузырьков воздуха.

15.1.1.4.3 Помещают пластиковый распределитель в центр петрифильма плоской стороной вниз (кроме петрифильмов (АС) и (УМ), для них - выемкой вниз). Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

15.1.1.4.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 1–2 мин для затвердевания геля.

15.1.1.4.5 Посевы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности, при температуре и времени, оптимальном для культивирования определяемого вида микроорганизма и типа используемого петрифильма. Температура и время культивирования определяемых микроорганизмов указаны в соответствующих пунктах настоящих указаний.

15.1.1.5 Обработка результатов.

15.1.1.5.1 После инкубирования посевов по п. 15.1.1.4.5 подсчитывают количество характерно окрашенных колоний визуально или с помощью Петрифильм-Ридера (ЗМ™ Petrifilm™ Plate Reader).

15.1.1.5.2 Подсчет количества выросших колоний и обработка результатов указаны в соответствующих пунктах настоящих указаний в соответствии с определяемым видом микроорганизмов и типом используемого петрифильма.

15.1.1.5.3 Результат контроля записывают как КОЕ на исследуемую площадь.

15.1.1.5.4 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации согласно НД на определяемый вид микроорганизма.

15.1.2 Выявление и определение количества листерий.

15.1.2.1 Для ускоренного выявления и определения количества листерий (*Listeria monocytogenes*, *L.innocua*, *L.welshimeri*) в смывах с поверхностей применяется тип петрифильма – «3М™ Petrifilm™ Environmental Listeria Plate (EL)» или с аналогичными характеристиками. Содержащийся в питательной среде хромогенный субстрат окрашивает колонии листерий в красно-фиолетовый цвет.

15.1.2.2 Метод отбора смывов.

15.1.2.2.1 Стерильный тампон увлажняют стерильным физиологическим раствором.

15.1.2.2.2 Исследуемую поверхность тщательно протирают тампоном три раза в разных направлениях.

15.1.2.2.3 После взятия смыва тампон опускают в пробирку с 5 мл стерильной забуференной пептонной воды.

15.1.2.3 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

15.1.2.4 Подготовка смывов к испытанию.

15.1.2.4.1 Пробирки с тампонами тщательно встряхивают или перемешивают в вортексе в течение 10 с.

15.1.2.4.2 Выдержать образцы при комнатной температуре 20–30 °С в течение 1–1,5 ч.

15.1.2.5 Порядок проведения испытания.

15.1.2.5.1 Петрифильм помещают на ровную поверхность. Приподнимают верхнюю пленку.

15.1.2.5.2 Отбирают пробу смывной жидкости объемом $(3,0 \pm 0,1)$ см³. Пробу вносят на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма на образец, избегая захвата пузырьков воздуха.

15.1.2.5.3 Помещают специальный пластиковый распределитель (для петрифильмов Petrifilm EL) в центр петрифильма. Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения образца. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

15.1.2.5.4 Убирают распределитель и оставляют петрифильм на 10 мин для затвердевания геля.

15.1.2.5.5 Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (28 ± 2) ч в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности. Допускается размещать петрифильмы друг на друга в количестве до 10 штук.

15.1.2.6 Обработка результатов.

15.1.2.6.1 После инкубирования посевов по п. 15.1.2.5.5 подсчитывают количество краснофиолетовых колоний.

15.1.2.6.2 Результат контроля записывают как КОЕ листерий на исследуемую площадь.

15.1.2.6.3 При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ Р 51921–2002.

Примечание.

Не учитывают колонии, образующиеся на пенопластовом ограничителе зоны роста. При большом количестве на петрифильме мелких колоний розово-коричневого цвета готовят разведения образца и заново проводят анализ.

15.2 Микробиологический контроль воздушной среды помещений

15.2.1 Используемые петрифильмы подобны перечисленным или с аналогичными характеристиками:

15.2.1.1 «ЗМ Petrifilm Aerobic Count Plate (AC)» - для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ).

15.2.1.2 «ЗМTM PetrifilmTM Yeast and Mold Count Plate (YM)» - для определения количества дрожжей и плесневых грибов.

15.2.1.3 «ЗМTM PetrifilmTM Coliform Count Plate (CC)» - для выявления и определения количества колиформных бактерий (БГКП).

15.2.1.4 «ЗМTM PetrifilmTM E.coli/Coliform Count (EC)» - для выявления и определения количества *E.coli* и колиформных бактерий (БГКП).

15.2.1.5 «ЗМTM PetrifilmTM Enterobacteriaceae Count Plate (EB)» - для выявления и определения количества энтеробактерий.

15.2.1.6 «ЗМTM PetrifilmTM Staph Express Count Plate (STX)» + «ЗМTM PetrifilmTM Staph Express Disk» - для выявления и определения количества стафилококков (*S.aureus*).

15.2.2 Подготовка петрифильмов к испытанию по п. 9.

15.2.2.1 Дополнительно для исследования петрифильмы активируют.

15.2.2.2 Приподнимают верхнюю пленку петрифильма.

15.2.2.3 Добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды на поверхность подложки в центр петрифильма. Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма на образец, избегая захвата пузырьков воздуха.

15.2.2.4 Помещают пластиковый распределитель (для соответствующей марки петрифильма) в центр петрифильма. Мягко надавливают на центр распределителя для равномерного распределения воды. Не следует перемещать или крутить распределитель по петрифильму!

15.2.2.5 Убирают распределитель и оставляют петрифильм минимум на 1 ч для затвердевания геля. Теперь петрифильмы можно использовать для контроля воздуха помещений. Активированные петрифильмы можно хранить до 7 дней в закрытых пластиковых пакетах в отсутствии света при температуре 2–8 °С.

15.2.3 Методы отбора.

15.2.3.1 Верхнюю пленку активированного петрифильма прикрепить клейкой лентой с внешней стороны к горизонтальной или вертикальной поверхности.

15.2.3.2 Время контроля воздуха составляет не более 15 мин.

15.2.4 Порядок проведения испытания.

15.2.4.1 Помещают петрифильм на ровную поверхность.

15.2.4.2 Аккуратно опускают верхнюю пленку петрифильма на подложку петрифильма, избегая захвата пузырьков воздуха.

15.2.4.3 Посевы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности при температуре, оптимальной для культивирования определяемого вида микроорганизмов и типа используемого петрифильма.

Температура и время культивирования определяемых микроорганизмов указаны в соответствующих пунктах настоящих Методических указаний.

15.2.5 Обработка результатов.

15.2.5.1 После инкубирования посевов по п. 15.2.4.3 подсчитывают количество характерно окрашенных колоний для определяемого вида микроорганизмов визуально или с помощью Петрифильм-Ридера (3M™ Petrifilm™ Plate Reader).

15.2.5.2 Подсчет количества выросших колоний и обработка результатов указаны в соответствующих пунктах настоящих указаний в соответствии с определяемым видом микроорганизма и типом используемого петрифильма.

15.2.5.3 Результат контроля воздуха помещений, полученный на петрифильмах 15.2.1.1, записывают как КОЕ/20 см² петрифильма.

15.2.5.4 Результат контроля воздуха помещений, полученный на петрифильмах 15.2.1.2, записывают как КОЕ/30 см² петрифильма.

15.2.5.5 Результат контроля воздуха помещений, полученный на петрифильмах 15.2.1.1.6, записывают как КОЕ/30 см² петрифильма.