

УТВЕРЖДАЮ:

Директор

НПО «Альтернатива»

 М.В. Мордовин

24 » мая 2022 г



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 4.2-022-2016

Методы микробиологического экспресс-контроля
объектов окружающей среды и пищевых продуктов
с использованием продукции «Петритест™»

(с изм. от 01.07.2018, 05.03.2019, 24.05.2022)

Дата введения в действие: «01» июля 2016 г.

РАЗРАБОТАНО:

НПО «Альтернатива»

к.б.н., профессор РАЕН

Баракин А.А.


« 1 » июля 2016 г

г. Саратов, 2016 г.

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы проведения исследований по ускоренному выявлению и определению количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ/ОМЧ), грибов (плесеней) и дрожжей, энтеробактерий (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки)), стафилококков, сальмонеллы, листерий в объектах окружающей среды (вода, воздух, смывы) и пищевых продуктах с использованием подложек «Петритест™».

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. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней"

2.2. ГОСТ Р ИСО 7218-2015 "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 31747-2012 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)".

2.10. ГОСТ 30726-2001 "Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий вида *Escherichia coli*".

2.11. ГОСТ 31746-2012 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 10444.12-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов".

2.14. ГОСТ 32031-2012 "Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*"

2.15. ГОСТ 26809.1-2014 "Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молоко-содержащие продукты"

2.16. ГОСТ 30347-2016 "Молоко и молочная продукция. 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 31598-2012 "Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний".

2.19. ГОСТ 29227-91 "Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования".

2.20. ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) "Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия".

2.21. ГОСТ 16317-87 "Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия".

2.22. ГОСТ 25336-82 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры".

2.23. ГОСТ 23932-90 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия".

2.24. ГОСТ 6709-72 "Вода дистиллированная. Технические условия".

2.25. ГОСТ Р 51593-2000 "Вода питьевая. Отбор проб".

2.26. 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 и/или лаборатории, а также ее инфраструктура должны удовлетворять предъявляемым требованиям.

4. Аппаратура и материалы¹

4.1. Термостаты электрические с диапазоном измерения от 15 до 65°C с допустимой погрешностью регулирования температуры $\pm 1^\circ\text{C}$	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°C с погрешностью $\pm 2^\circ\text{C}$	
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°C	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. Растворы и питательные среды	
4.13.1. 0,1%-я пептонная вода	ГОСТ 10444.1-84 (п. 4.4)
4.13.2. Физиологический раствор	ГОСТ 10444.1-84 (п. 4.29)
4.13.3. Забуференная пептонная вода	ГОСТ 10444.1-84
4.13.4. Дистиллированная вода	ГОСТ 6709-72
4.14. «Петритесты™» с перечисленными характеристиками:	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.1. «Петритест™» –анализ на общее микробное число - ОМЧ (КМАФАнМ)	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.2. «Петритест™» –анализ на грибы (плесени) и дрожжи.	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.3. «Петритест™» –анализ на энтеробактерии (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки))	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.4. «Петритест™» –анализ на стафилококк	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.5. «Петритест™» –анализ на листерии	ТУ 2643-012-37794199-2016
4.14.6. «Петритест™» –анализ на сальмонеллу	ТУ 2643-012-37794199-2016

¹ Допускается применение средств измерения, испытательного и вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

4.14.7. «Петритест™ (Смыв)» на БГКП
4.14.8. «Петритест™ (Жидкость)» на БГКП
4.14.9 «Петритест™» (Жидкость МКБ)

ТУ 2643-012-37794199-2016
ТУ 2643-012-37794199-2016
ТУ 2643-012-37794199-2016

5. Описание и принцип действия

Тесты «Петритест™» представляют собой прозрачные пластиковые подложки с крышкой. Подложки заполнены готовыми питательными средами №1, №2, №3 по Госфармакопее, с добавлением ростовых и хромогенных добавок, формуляция которых является собственностью НПО «Альтернатива». Каждый «Петритест™» упакован в индивидуальный стерильный пакет.

6. Сущность метода

Метод выявления и определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ/ОМЧ), грибов (плесеней) и дрожжей, энтеробактерий (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки)), стафилококков, сальмонеллы, листерий основан на высеве навески определенной массы исследуемого образца или его разведений на «Петритест™», инкубировании посевов, выявлении и подсчете характерных колоний.

В случае работы с жидкими средами («Петритест™ (Смыв)» и («Петритест™ (Жидкость)»)) наличие/отсутствие (качественный анализ) микроорганизмов определенной группы определяется по изменению их окраски.

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 Р 54004-2010, ГОСТ 26809-86, 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 4.2.3690-21.

8.2. Подготовка проб пищевых продуктов проводят по ГОСТ 26669-85 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 ($18-22^\circ\text{C}$).

9. Подготовка «Петритест™»

9.1. Упаковку с нескрытыми пакетами с агаризованными «Петритест™» хранят в холодильнике при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

9.2. Перед использованием «Петритест™» выдерживают при комнатной температуре в течение 30 мин.

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

10.1. Для определения в образце количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов применяется «Петритест™» – экспресс-анализ на общее микробное число - ОМЧ (КМАФАнМ).

10.2. Методы отбора проб по п. 7.

10.3. Подготовка образца к испытанию по п. 8.

10.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

10.5. Порядок проведения испытания.

10.5.1. «Петритест™» помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

10.5.2. Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 10.3, отбирают пробу объемом $(0,2 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр «Петритеста™». Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

10.5.3. Плавными горизонтальными движениями (из стороны в сторону) держа тест горизонтально, распределите исследуемую жидкость равномерно по поверхности питательной среды.

10.5.4. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (12-24) ч (за исключением образцов молочных продуктов, сырых моллюсков и ракообразных). Образцы молочных продуктов, сырых моллюсков и ракообразных инкубируют в течение (48 ± 3) ч. «Петритест™» инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз. Допускается размещать «Петритест™» друг на друга по 5 штук.

10.6. Обработка результатов.

10.6.1. После инкубирования посевов по п. 10.5.4 подсчитывают на «Петритест™» количество колоний.

10.6.2. Для подсчета отбирают «Петритест™», 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 0,2 см³ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

10.6.3. Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670-91.

Примечание.

При большом количестве колоний на «Петритест™» может наблюдаться сплошной рост микроорганизмов. Иногда на «Петритест™» 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 агаровый слой, что затрудняет подсчет колоний; в этом случае необходимо подсчитывать количество колоний только на неизмененных участках «Петритеста™».

11. Определение количества дрожжей и плесневых грибов

11.1. Для определения количества в образце дрожжей и плесневых грибов применяется «Петритест™» – анализ на грибы (плесени и дрожжи).

11.2. Методы отбора проб по п. 7.

11.3. Подготовка образца к испытанию по п. 8.

11.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

11.5. Порядок проведения испытания.

11.5.1. «Петритест™» помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

11.5.2. Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 11.3, отбирают пробу объемом $(0,2 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр «Петритест™». Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

11.5.3. Плавными горизонтальными движениями (из стороны в сторону) держа тест горизонтально, распределите исследуемую жидкость равномерно по поверхности питательной среды.

11.5.4. Посевы инкубируют при температуре $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение $(12-72)$ ч (для предварительного учета) и (120 ± 3) ч (для окончательного учета). «Петритест™» инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз. Допускается размещать «Петритест™» друг на друга по 5 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 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.

11.6.3. Для количественного подсчета отбирают «Петритест™», 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 $0,2$ см³ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

11.6.4. Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670-91.

Примечание.

Большое число колоний дрожжей и плесневых грибов может вызвать сплошной рост на «Петритест™». В этих случаях необходимо увеличить степень разведения навески образца и заново провести анализ для более точного подсчета микроорганизмов.

12. Выявление и определение количества энтеробактерий (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки))

12.1. Для выявления и определения количества энтеробактерий (БГКП) применяется «Петритест™» – анализ на энтеробактерии (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки)).

«Петритест™» содержит 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.

12.2. Методы отбора проб по п. 7.

12.3. Подготовка образца к испытанию по п. 8.

12.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

12.5. Порядок проведения испытания.

12.5.1. «Петритест™» помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

12.5.2. Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 12.3, отбирают пробу объемом $(0,2 \pm 0,1)$ см³ и вносят на поверхность подложки в центр «Петритеста™». Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

12.5.3. Плавными горизонтальными движениями (из стороны в сторону) держа тест горизонтально, распределите исследуемую жидкость равномерно по поверхности питательной среды.

12.5.4. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение $(12-24)$ ч (для предварительного учета). «Петритест™» инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз. Допускается размещать «Петритест™» друг на друга по 5 штук.

12.6. Обработка результатов.

12.6.1. После инкубирования посевов по п. 12.5.4 подсчитывают на «Петритест™» количество колоний энтеробактерий. Энтеробактерии на «Петритест™» образуют колонии красного цвета

12.6.2. Для подсчета отбирают «Петритест™», на которых выросло от 15 до 150 колоний.

Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колиформных бактерий (БГКП) в $0,2 \text{ см}^3$ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

12.6.3. Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670-91.

12.6.4. При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ 31747-2012 и ГОСТ 30726.

Примечание.

Если на «Петритест™» 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.

13. Выявление и определение количества стафилококков

13.1. Для выявления и определения количества стафилококков применяется «Петритест™» – анализ на стафилококк. Данный тип «Петритест™» 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.

13.2. Методы отбора проб по п. 7.

13.3. Подготовка образца к испытанию по п. 8.

13.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

13.5. Порядок проведения испытания.

13.5.1. «Петритест™» помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

13.5.2. Из исследуемого образца или его соответствующего разведения, приготовленного по п. 13.3, отбирают пробу объемом $(0,2 \pm 0,1) \text{ см}^3$ и вносят на поверхность подложки в центр «Петритест™». Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

13.5.3. Плавными горизонтальными движениями (из стороны в сторону) держа тест горизонтально, распределите исследуемую жидкость равномерно по поверхности питательной среды.

13.5.4. Посевы инкубируют при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (12-24) ч (для предварительного учета). «Петритесты™» инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз. Допускается размещать «Петритест™» друг на друга по 5 штук.

13.6. Обработка результатов.

13.6.1. После инкубирования посевов по п. 13.5.4 подсчитывают количество колоний стафилококка. На «Петритест™» стафилококк образует круглые, непрозрачные, выпуклые, блестящие колонии.

Для подсчета отбирают «Петритест™», на которых выросло от 15 до 150 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество колоний стафилококка в $0,2 \text{ см}^3$ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

13.6.2. Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670-91.

13.6.3. При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ 31747-2012 и ГОСТ 30726.

Примечание.

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

14. Контроль микробиологической обсемененности объектов среды обитания

14.1. Микробиологический контроль смывов с поверхностей

14.1.1. Выявление и определение общего микробного числа, количества дрожжей и плесневых грибов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококков (*S. aureus*) в смывах с рабочих поверхностей, тары, оборудования, рук персонала, сырья, продуктов и т.д.

Используется:

- «Петритест™» – анализ на общее микробное число - ОМЧ (КМАФАнМ);
- «Петритест™» – анализ на грибы (плесени) и дрожжи;
- «Петритест™» – анализ на энтеробактерии (БГКП (ОКБ) (бактерии группы кишечной палочки));
- «Петритест™» – анализ на стафилококк;
- «Петритест™» – анализ на листерии;
- «Петритест™» – анализ на сальмонеллу;
- «Петритест™ (Смыв)» на БГКП.

14.1.1.2. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

14.1.1.3. Метод отбора смывов.

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

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

14.1.1.3.3. После взятия смыва тампон опускают в пробирку.

14.1.1.3.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

14.1.1.4. Подготовка смывов к испытанию.

14.1.1.4.1. Пробирки с тампонами тщательно встряхивают в течение 10 с.

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

14.1.1.5. Порядок проведения испытания

14.1.1.5.1. «Петритест™» (подложка) помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

14.1.1.5.2. Вносят 0,2 см³ (мл) смывной жидкости из пробирки (п. 14.1.4.2.) на поверхность подложки в центр «Петритест™» и равномерно распределяют по всей поверхности. Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

14.1.1.5.3. Посевы инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз (для снижения количества образующегося конденсата) при температуре и времени, оптимальном для культивирования определяемого вида микроорганизма и типа используемого «Петритест™». Температура и время культивирования определяемых микроорганизмов указаны в соответствующих инструкциях на каждый «Петритест™». Допускается размещать «Петритест™» друг на друга по 5 штук.

14.1.1.6. Обработка результатов.

14.1.1.6.1. После инкубирования посевов по 14.1.5.3 подсчитывают на «Петритест™» количество колоний.

14.1.1.6.2. Для подсчета отбирают несколько «Петритест™», на которых выросло от 15 до 300 колоний. Полученный результат умножают на величину соответствующего разведения и получают количество микроорганизмов в 0,2 см³ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

14.1.1.6.3. Результат исследований округляют и записывают по ГОСТ 26670-91 как КОЕ на исследуемую площадь.

Примечание.

При большом количестве колоний на «Петритест™» может наблюдаться сплошной рост микроорганизмов. Иногда на «Петритест™» 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 образца и заново провести анализ для более точного подсчета микроорганизмов.

Некоторые бактерии могут разжижать агаровый слой, что затрудняет подсчет колоний; в этом случае необходимо подсчитывать количество колоний только на неизмененных участках «Петритеста™».

14.1.1.7. Метод отбора смывов с использованием «Петритест™ (Смыв)» на БГКП.

14.1.1.7.1. Откройте крышку и осторожно выньте тампон из пробирки.

14.1.1.7.2. Проведите смыв тестируемой поверхности с площади 10x10 см. Исследуемую поверхность тщательно протирают тампоном три раза в разных направлениях. Для более полного сбора материала рекомендуется вращать тампон. Тампон необходимо держать строго за крышку.

14.1.1.7.3. Поместите тампон в пробирку с жидкой питательной средой. Плотно закройте пробирку и встряхните 3-5 раз.

14.1.1.7.2. Порядок проведения испытания.

14.1.1.7.2.1. Промаркируйте пробирку, поместите в термостат

14.1.1.7.2.2. Посевы инкубируют в вертикальном положении при температуре 35-37°C в течение 12-24 ч.

14.1.1.7.2.3. По истечении времени инкубации проведите регистрацию результатов. Бактериальный рост дает изменение цвета среды. Если среда изменила цвет с **фиолетового на желтый**, результат интерпретируется как положительный (БГКП (ОКБ) в смывах присутствуют). Если в ходе инкубации цвет среды не меняется, результат интерпретируется как отрицательный (БГКП (ОКБ) в смывах отсутствуют).

14.1.1.8. Обработка результатов.

14.1.1.8.1. По истечении времени инкубации проведите регистрацию результатов. Бактериальный рост дает изменение цвета среды. Если среда изменила цвет с **фиолетового на желтый**, результат интерпретируется как положительный (БГКП (ОКБ) в смывах присутствуют). Если в ходе инкубации цвет среды не меняется, результат интерпретируется как отрицательный (БГКП (ОКБ) в смывах отсутствуют).

14.1.1.8.2. При необходимости жидкость из пробирки может быть изолирована для дальнейшей идентификации на соответствующих типах «Петритест™».

14.1.2. Выявление и определение количества листерий.

14.1.2.1. Для ускоренного выявления и определения количества листерий (*Listeria monocytogenes* и др.) в смывах с поверхностей применяется «Петритест™» – анализ на листерии. В процессе роста на среде визуализируются круглые колонии серо-желтого цвета диаметром 0,2-1,2 мм. Среда вокруг колоний образует характерную чёрную зону.

14.1.2.2. Метод отбора смывов при исследовании на листерии.

14.1.2.2.1. Стерильный тампон увлажняют стерильным физиологическим раствором.

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

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

14.1.2.3. Подготовка «Петритест™» – анализ на листерии к испытанию по п. 9.

14.1.2.4. Подготовка смывов к испытанию.

14.1.2.4.1. Пробирки с тампонами тщательно встряхивают в течение 10 с.

14.1.2.4.2. Выдерживают образцы при комнатной температуре 20—30 С в течение 1—1,5 ч.

14.1.2.5. Порядок проведения испытания с использованием «Петритест™».

14.1.2.5.1. «Петритест™» помещают на ровную поверхность. Поднимают верхнюю крышку.

14.1.2.5.2. Отбирают пробу смывной жидкости объемом $(0,2 \pm 0,1)$ см³. Пробу вносят на поверхность подложки в центр «Петритест™» и равномерно распределяют по всей поверхности. Закрывают крышку «Петритест™» на защелки.

14.1.2.5.3. Посевы инкубируют в горизонтальном положении крышкой вниз (для снижения количества образующегося конденсата) при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение (28 ± 2) ч. Допускается размещать «Петритест™» друг на друга в количестве до 5 штук.

14.1.2.6. Обработка результатов.

14.1.2.6.1. После инкубирования посевов по п. 14.1.2.5.3 подсчитывают колонии серо-желтого цвета диаметром 0,2-1,2 мм. Среда вокруг колоний образует характерную чёрную зону. Полученный результат, при необходимости, умножают на величину соответствующего разведения и получают количество микроорганизмов в 0,2 см³ (г) образца. Далее этот результат умножают на 5 для приведения результатов в соответствие с классическим методом с использованием чашки Петри.

14.1.2.6.2. Результат контроля округляют и записывают по ГОСТ 26670-91 как КОЕ на исследуемую площадь.

14.1.2.6.3. При необходимости колонии могут быть изолированы для дальнейшей идентификации по ГОСТ 31747-2012 и ГОСТ 30726.

14.2. Микробиологический контроль воздушной среды помещений

14.2.1. Используются - «Петритест™» – анализ на общее микробное число - ОМЧ (КМАФАнМ), «Петритест™» – анализ на грибы (плесени и дрожжи).

14.2.2. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

14.2.3. Методы отбора.

14.2.3.1. Нижнюю часть «Петритест™» можно прикрепить клейкой лентой с внешней стороны к горизонтальной или вертикальной поверхности или просто оставить открытой.

14.2.4. Порядок проведения испытания.

14.2.4.1. «Петритесты™» со средой ОМЧ (КМАФАМ) оставляют открытыми на 5-20 мин в классе, в цехах молочного завода, мясокомбината (время экспозиции зависит от предполагаемой загрязненности).

14.2.4.2. Далее «Петритест™» закрывают и помещают в термостат. Посевы инкубируют в горизонтальном положении прозрачной стороной вверх при повышенной влажности при температуре, оптимальной для культивирования определяемого вида микроорганизмов и типа используемого «Петритест™».

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

14.2.5. Обработка результатов.

14.2.5.1. После инкубирования посевов по п. 14.2.4.2 подсчитывают количество колоний для определяемого вида микроорганизмов визуально.

14.2.5.2. Подсчет количества выросших колоний и обработка результатов указаны в соответствующих пунктах настоящих указаний в соответствии с определяемым видом микроорганизма и типом используемого «Петритест™».

14.2.5.3. После подсчета выросших колоний на «Петритест™», определяют количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха по формуле Омелянского (в пересчете на «Петритест™»), согласно которой **предполагается** (*т.е. это не совсем точный метод*), что в чашки с питательной средой площадью 100 см² в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха. Для определения количества бактерий в 1 м³ воздуха применяют формулу Омелянского:

$$x = \frac{A * 100 * 1000 * 5}{v * 10 * T}$$

Где:

X – количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха;

A – число колоний выросших на МПА на «Петритест™»;

v – площадь Петритеста (19,6 см²);

5 – время экспозиции по правилу Омелянского;

T – время, в течение которого «Петритест™» был открыт (минуты);

10 – 10 л воздуха по правилу Омелянского;

1000 – 1 м³ воздуха;

100 – 100 см² питательной среды.

Для более точных результатов целесообразнее делать посев на несколько «Петритест™» (4-5 единиц) и в формуле показатель «*v*» (площадь «Петритест™» – 19,6 см²) умножить на 4-5 в зависимости от количества «Петритест™», принимающих участие в исследовании.

14.3. Микробиологический контроль жидкостей (качественный анализ)

14.3.1. Выявления присутствия бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и лактобактерий (МКБ) в жидких продуктах питания.

Используются «Петритест™ (Жидкость)» на БГКП и «Петритест™ (Жидкость)» МКБ.

14.3.2. Методы отбора проб по п. 7.

14.3.3. Подготовка образца к испытанию по п. 8.

14.3.4. Подготовка «Петритест™» к испытанию по п. 9.

14.3.5. Порядок проведения испытания.

14.3.5.1. Откройте крышку пробирки.

14.3.5.2. Добавьте 1,0 мл исследуемой жидкости (предварительно приготовленного исходного разведения (1 мл на 9 мл стерильного физраствора или дистиллированной воды или готовится в соответствии с методическими документами, регламентирующими данную процедуру для конкретного продукта).

Если после внесения продукта среда сразу изменила цвет, то в нее необходимо добавить несколько капель буферного раствора, поставляемого в комплекте со средой до возвращения исходного цвета

14.3.5.3. Закройте пробирку, промаркируйте, поместите в термостат и инкубируйте при температуре 35-37⁰С в течение 12-24 ч.

14.3.6. Обработка результатов.

14.3.6.1. По истечении времени инкубации проведите регистрацию результатов. Бактериальный рост дает изменение цвета среды. Если среда изменила цвет с зеленого (БГКП) или фиолетового (МКБ) на желтый, результат интерпретируется как положительный (в жидкости присутствуют микроорганизмы соответствующей группы). Если в ходе инкубации цвет среды не меняется, результат интерпретируется как отрицательный (бактерии в жидкости отсутствуют).

14.3.6.2. При необходимости жидкость из пробирки может быть изолирована для дальнейшей идентификации согласно НД.
