

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

И.В.Гаевский

18.07.2012г.

Регистрационный № 006-0712

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ ДЛЯ
ЧЕЛОВЕКА ТОВАРОВ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ, БУМАГИ И
КАРТОНА, КОНТАКТИРУЮЩИХ С ПИЩЕВЫМИ ПРОДУКТАМИ**

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы:

Н.В.Дудчик, Т.С.Трешкова, В.В.Трейлиб, Е.А.Будкина, Т.О.Козлова,
Л.Л.Ушкова

Минск 2012

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая Инструкция по применению «Методы определения и оценки микробиологических показателей безопасности и безвредности для человека товаров народного потребления, бумаги и картона, контактирующих с пищевыми продуктами» распространяется на средства личной гигиены, средства гигиены полости рта, средства индивидуальной защиты дерматологические, товары бытовой химии, бумагу и картон, контактирующие с пищевыми продуктами.

Настоящая Инструкция по применению предназначена для специалистов лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека вышеназванных товаров народного потребления, а также иных лабораторий, выполняющих определение и оценку соответствующих микробиологических показателей.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И РЕАКТИВЫ

Оборудование:

Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр)	НД (ГОСТ, ТУ) ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках	ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(45 \pm 0,5) ^\circ C$	ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г	ГОСТ 24104-88E
Весы лабораторные 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104-88E
Дистиллятор электрический	
Лупа с пятикратным увеличением	ГОСТ 25706-83
Микроскоп световой биологический с увеличением $900-1000^{\times}$	ГОСТ 8284-78
Прибор вакуумного фильтрования	
Прибор для счета колоний бактерий ПСБ	ТУ 64-1-2041-72
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569-89
Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры $(100-220)^\circ C$	ГОСТ 24437-89
Термометр $(0-100) ^\circ C$, цена деления $1 ^\circ C$	ГОСТ 24498-90
Термостаты электрические суховоздушные с	ТУ 64-1-1382-72

автоматическим терморегулятором до 50°С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1 °С	
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83
Материалы:	
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-091181-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопичная	ГОСТ 5556-81
Картон для предварительной фильтрации марки КФБЖ	ТУ 13-7308000-691-84
Картон для предварительной фильтрации марки КФМП	ТУ 13-7308001-673-84
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Колбы плоскодонные конические или круглые различной вместимости	ГОСТ 25336-82
Ножницы	ГОСТ 21241-89
Петли бактериологические	
Пипетки различной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 20292-74
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90 Е
Стекла предметные	ГОСТ 9284-75
Стекла покровные	ГОСТ 6672-75
Ступки фарфоровые	ГОСТ 9147-80
Цилиндры на 100–250 см ³	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100, 200, 500 см ³	ГОСТ 10782-85
Стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135-2004 ГСИ
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки Петри 90–100 мм	ГОСТ 25336-82
Питательные среды и реактивы:	
Агар микробиологический в порошке или волокнах	ГОСТ 17206-96
Агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов	ФС 42-188ВС-90
Агар Эндо	ФС 42-186ВС-88
Среда Козера	
Бульон мясопептонный	ГОСТ 10444.1-84
Бромкрезоловый пурпурный (индикатор)	ГФ РБ Т. 1.
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Вода мясная	ГОСТ 10444.1-84

Гидролизат казеина панкреатический	
Глюкоза	ГОСТ 6038-79
Глицерин	ГОСТ 6824-96
Желчь сухая медицинская	ГОСТ 49278-75
Калий серноокислый	ГОСТ 4145-74
Калия нитрат	ГОСТ 4217-77
Калий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 4198-75
Калий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 2493-75
Калия теллуриат, раствор с массовой концентрацией 2%	
Кислота соляная, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм ³	ГОСТ 3118-77
Кислота сульфаниловая	ГОСТ 5281-78
Кислота тиогликолевая	
Кислота уксусная ледяная	ГОСТ 61-75
Кислота карболовая (фенол)	ГОСТ 6417-72
Литий хлористый, б-водный	ГОСТ 4328-77
Магний хлористый	ГОСТ 4209-77
Малахитовый зеленый, индикатор	ГФ РБ Т. 1.
Маннит	ГОСТ 8321-74
Мальтоза	
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164-78
Масло иммерсионное	ГОСТ 13739-78
Метиленовый синий	
Натрия гидроокись, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм ³	ГОСТ 4238-77
Натрия резазурин, раствор массовой концентрацией 1,0 г/дм ³	
Натрий сернистокислый, раствор с массовой концентрацией 1,0 г/дм ³	ТУ 6-09-5313-86
Натрия тиогликолят	
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77
Натрий фосфорнокислый однозамещенный	ГОСТ 245-76
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	ГОСТ 4172-76
N,N-диметил-n-фенилендиамин дигидрохлорид, раствор массовой концентрации 1%	
1-Нафтиламин	ГОСТ 8827-79
1-Нафтол, спиртовой раствор	ГОСТ 5838-79
Основа бактериологическая питательных сред сухая (Бактофок-МК)	ФС 42-3407-97
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805-76
Питательная среда № 1 (для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), сухая	ВФС 42-1801-88

Питательная среда № 2 (для выращивания грибов), сухая	ВФС 42-1802-88
Питательная среда № 3 (для обогащения бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i>), сухая	ВФС 42-1803-88
Питательная среда № 6 (для определения ферментации глюкозы)	ВФС 42-2038-91
Питательная среда № 7 (для определения восстановления нитратов в нитриты)	ВФС 42-2020-90
Питательная среда № 8 (для выращивания <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>), сухая	ВФС 42-3181-95
Питательная среда № 9 (для выявления пигмента пиоцианина <i>P. aeruginosa</i>), сухая	ВФС 42-1909-89
Питательная среда № 10 (для идентификации <i>S.</i> <i>aureus</i>), сухая	ВФС 42-1908-89
Плазма кролика, сухая цитратная, для реакции плазмокоагуляции	
Растворы и реактивы для окраски мазков по Граму	ГОСТ 10444.1-84; ГОСТ 18963-73
Реактив Грисса	
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ 5962-67
Спирт этиловый ректифицированный технический	ГОСТ 18300-87
Феноловый красный, индикатор	ГФ РБ Т. 1.
Питательная среда для накопления сальмонелл, сухая (селенитовый бульон)	
Агар с эозин-метиленовым синим, сухой (среда Левина)	
Висмут-сульфит агар	
Среда Плоскирева	
Питательная среда для выделения энтеробактерий, сухая (Эндо)	
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
Среды Гисса с сахарами, сухие	
Системы индикаторные бумажные (СИБ)	
СИБ-лактоза	
СИБ-оксидаза	
СИБ-глюкоза	
Триптофановый бульон	
Реактив Ковача	
Цистин (цистеин)	
2,3,5-трифенилтетразолий хлористый	
Среда магниевая	
Среда селенитовая	
Среда тетрагидратная	
Агар трехсахарный	

L-триптофан Реактив Эрлиха

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного действия для исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны выработываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕАКТИВОВ

Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ГОСТ Р 51446-2001 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

При взвешивании компонентов сред и испытуемых образцов допускается погрешность 0,1%.

Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.».

Необходимое значение водородного показателя рН (далее – рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроксида натрия массовой концентрации 0,1 моль/дм³ или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм³; рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги.

Приготовление растворов реактивов:

Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор)

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 15 мин.

Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

Раствор фенолового красного массовой концентрации 1%

0,1 г фенолового красного растирают в ступке, добавляя небольшими порциями 2,82 см³ 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл 96% этилового спирта. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят водой до метки.

Хранят во флаконе из темного стекла в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 7 сут.

Раствор малахитового зеленого массовой концентрации 0,5%

0,5 г малахитового зеленого помещают в стерильный флакон, заливают 100 см³ горячей дистиллированной воды и помещают на 24 ч в термостат с температурой (37±1) °С, периодически перемешивая.

Хранят во флаконе из темного стекла в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 7-10 сут.

Приготовление реактива Грисса

Во флакон со 100 см³ водного раствора кислоты уксусной с массовой долей 12% вносят 10,0 г сухого реактива Грисса, растворяют при перемешивании.

При отсутствии сухого реактива Грисса его готовят следующим образом:

- раствор № 1: 0,5 г кислоты сульфаниловой растворяют в 30 см³ ледяной уксусной кислоты, прибавляют 100 см³ воды дистиллированной, фильтруют через бумажный фильтр. Раствор годен в течение 1 мес.;

- раствор № 2: 0,1 г 1-нафтиламина растворяют в 100 см³ кипящей дистиллированной воды, охлаждают, прибавляют 30 см³ ледяной уксусной кислоты, фильтруют через бумажный фильтр. Раствор годен в течение 7 суток.

Перед применением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Реактив для определения наличия фермента цитохромоксидазы

Раствор № 1: 1,0 г 1-нафтола растворяют в 100 см³ спирта этилового.

Раствор № 2: 1,0 г N,N-диметил-п-фенилендиамин дигидрохлорида растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

Перед употреблением смешивают растворы №1 и 2 в соотношении 2:3.

Хранят во флаконах из нейтрального светозащитного стекла при температуре (5±3) °С в течение 14 сут.

Приготовление питательных сред

Среды для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий

Мясо–пептонный агар с глюкозой: в колбу с 1 дм³ мясопептонного бульона (далее – МПБ) вносят 10,0 г пептона, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г глюкозы. Все ингредиенты растворяют, прибавляют 13,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения агара при перемешивании, фильтруют в горячем виде через воронку с ватно-марлевым или бумажным фильтром, устанавливают рН (7,3±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.; хранят при температуре (5±3) °С не более 1 месяца. Вместо МПБ можно использовать перевар Хоттингера с концентрацией аминного азота не менее 100 мг/дм³.

Питательный агар «МК» с глюкозой: в колбе с 1 дм³ воды дистиллированной растворяют 20,0 г Бактофока-МК, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г глюкозы, прибавляют 13,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения агара при перемешивании, фильтруют в горячем виде через воронку с ватно-марлевым или бумажным фильтром, устанавливают рН (7,3±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при

температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин.; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 1 мес. Допускается использовать агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов или питательную среду № 1 сухую.

Среды для выращивания плесневых грибов и дрожжей (Сабуро)

Среда для выращивания плесневых грибов и дрожжей (Сабуро): в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 10,0 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 40,0 г глюкозы или мальтозы, прибавляют 13,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения всех компонентов при перемешивании, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН $(5,8\pm 0,2)$, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 1 мес. Допускается использовать питательную среду № 2 сухую.

Среда Сабуро жидкая: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 10,0 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 40,0 г глюкозы или мальтозы, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения всех компонентов при перемешивании, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, устанавливают рН $(5,8\pm 0,2)$, разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Среда Сабуро с тетразолием

Навеску 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого из расчета 0,06 г на 1 дм³ вносят в агаризованную среду Сабуро, стерилизуют при температуре (112 ± 1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Среды обогащения для бактерий семейства Enterobacteriaceae

Среда для выращивания *Enterobacteriaceae*: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 20,0 г пептона сухого ферментативного или Бактофока-МК, 7,5 г натрия фосфат–двухзамещенного, 2,5 г калия фосфорнокислого однозамещенного. Смесь перемешивают при нагревании до полного растворения солей, вносят 10 г глюкозы, прибавляют 8 см³ 1%-го водного раствора фенолового красного и 3 см³ 0,5%-ного водного раствора малахитового зеленого, устанавливают рН $(7,5\pm 0,1)$, нагревают до полного растворения компонентов, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) С° в течение 20 мин.; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Среда Мак-Конки: в колбу с 1 дм³ воды дистиллированной вносят 20,0 г пептона сухого ферментативного или Бактофока-МК, 10,0 г лактозы, 5,0 г желчи сухой, 0,01 г бромкрезолового пурпурного. Все ингредиенты растворяют в воде, нагревают до полного растворения компонентов, устанавливают рН $(7,5\pm 0,1)$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °С не более 14 сут.

Допускается использовать среду № 3 сухую.

Питательные среды для идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

Агар Эндо: готовят из среды Эндо сухой по указанию (прописи) на этикетке; хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 5 сут.

Среда для определения ферментации глюкозы: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 10 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 5 г хлорида натрия, растворяют при нагревании, вносят 40 г глюкозы, прибавляют 8 см³ 1%-го водного раствора фенолового красного, устанавливают рН $(7,4\pm 0,2)$, кипятят на электроплитке в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки с поплавками по $(4-5)$ см³ и стерилизуют при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. По окончании стерилизации среду как можно скорее охлаждают; хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 14 сут. Допускается использовать среду № 6 сухую.

Среда для определения восстановления нитратов в нитриты: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 5 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 5 г натрия хлорида, 1,5 г калия нитрата, растворяют при перемешивании и нагревании, устанавливают рН $(7,2\pm 0,2)$, кипятят на электроплитке в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по $(4-5)$ см³ и стерилизуют при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин; хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 14 сут. Допускается использовать среду № 7 сухую.

Среда Хью-Лейфсена: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 2 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 10,0 г глюкозы, 5 г натрия хлорида, 0,3 г калия фосфорнокислого двузамещенного, добавляют 3 г агара микробиологического, растворяют при перемешивании и нагревании, кипятят на электроплитке в течение 2-3 мин, устанавливают рН $(7,4\pm 0,1)$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 10-15 см³ и стерилизуют при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Цвет среды до автоклавирования – синий, после – травянисто-зеленый. Хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 14 сут.

Среды для обогащения бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

Мясо-пептонный бульон с глюкозой: в колбу с 1 дм³ мясной воды вносят 10,0 г пептона ферментативного сухого, 5 г натрия хлорида, 1 г глюкозы, растворяют при перемешивании и нагревании, устанавливают рН $(7,3\pm 0,2)$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин; хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 14 сут.

Питательный бульон «МК» с глюкозой: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 10 г Бактофока-МК, 1 г глюкозы, 5 г натрия хлорида. Все ингредиенты растворяют при перемешивании и нагревании, устанавливают рН $(7,3\pm 0,2)$, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре $(121\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Хранят при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ не более 14 сут.

Среда для обогащения бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*: в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 10,0 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 5,0 г натрия хлорида, 2,5 г калия фосфорнокислого двузамещенного, растворяют при перемешивании и нагревании, вносят 2,5 г глюкозы, устанавливают рН (7,3±0,2), кипятят на электроплитке в течение 1 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы по 100 см³ и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5±3)°С не более 14 сут. Допускается использовать среду № 8 сухую.

Среды для идентификации бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

Среда для выявления пигмента пиоцианина (Среда Кинг-А): в колбу с 1 дм³ дистиллированной воды вносят 20,0 г пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, 5,0 г магния хлорида безводного, 1,0 г калия сульфата безводного. Все ингредиенты растворяют в воде и оставляют на 15 мин. Затем вносят 10,0 см³ глицерина, тщательно перемешивают, растворяют при нагревании, устанавливают рН (7,2±0,2), кипятят на электроплитке в течение 1 мин, прибавляют агар микробиологический, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. Хранят при температуре (5±3)°С не более 14 сут. Допускается использовать среду № 9 сухую.

Среды для обогащения бактерий вида *Staphylococcus aureus*

Солевой бульон: в колбу со 100 см³ мясо-пептонного бульона вносят 6,0 г хлорида натрия, устанавливают рН (6,9±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин; хранят при температуре (5±3)°С не более 14 сут. Допускается использовать среду № 8 сухую.

Среды для идентификации бактерий вида *Staphylococcus aureus*

Желточно-солевой агар:

эмульсия яично-желточная: куриное яйцо протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, помещают в стерильную чашку Петри, стерильным инструментом пробивают с противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно отверстие полностью удаляют белок, затем, увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу с 50 см³ физиологического раствора, содержимое встряхивают до однородной массы; хранят при температуре (5±3)°С не более 72 ч.

Перед анализом 1 дм³ мясо-пептонного агара расплавляют и растворяют в нем 95,0 г хлористого натрия, охлаждают до температуры (45±1) °С и добавляют 100 см³ яично-желточной эмульсии. Смесь тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри; хранят при температуре (5±3)°С не более 5 сут.

Агар Байрд-Паркер: в 1 дм³ мясопептонного бульона вносят 17,9 г лития хлорида, 15 г агара микробиологического в волокнах или порошке, 5,0 г мясного экстракта и 5,0 см³ экстракта дрожжевого, перемешивают и нагревают до полного растворения компонентов. Охлаждают до 50–60°С, устанавливают

pH ($6,9\pm 0,1$), разливают во флаконы по 100 см^3 и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °C в течение 20 мин.

К 90 см^3 основы среды добавляют асептически $5,0\text{ см}^3$ желточной эмульсии и стерилизованные фильтрованием через мембранный фильтр растворы: $6,3\text{ см}^3$ раствора глицина концентрации 200 г/дм^3 , $5,0\text{ см}^3$ раствора пирувата натрия концентрации 200 г/дм^3 и $1,0\text{ см}^3$ раствора теллурита калия концентрации 10 г/дм^3 ; хранят при температуре (5 ± 3) °C не более 48 ч.

Маннитно-солевой агар: в колбу с 1 дм^3 дистиллированной воды вносят $10,0\text{ г}$ пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, $75,0\text{ г}$ натрия хлорида безводного, 10 г маннита. Все ингредиенты растворяют в воде, затем вносят $2,5\text{ см}^3$ 1%-го раствора фенолового красного, тщательно перемешивают, устанавливают pH ($7,6\pm 0,2$), кипятят на электроплитке в течение 1 мин, прибавляют агар микробиологический, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре (121 ± 1) °C в течение 15 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °C не более 14 сут.

Допускается использовать среду № 10 сухую (для идентификации стафилококков).

Среда Гисса с маннитом и мальтозой: в колбу с 1 дм^3 дистиллированной воды вносят $10,0\text{ г}$ пептона ферментативного сухого или Бактофока-МК, $5,0\text{ г}$ натрия хлорида безводного, 10 г маннита или мальтозы. Все ингредиенты растворяют в воде, затем вносят $2,5\text{ см}^3$ 1%-го раствора фенолового красного, тщательно перемешивают, устанавливают pH ($7,6\pm 0,2$), кипятят на электроплитке в течение 1 мин, прибавляют заранее замоченный агар микробиологический, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре (115 ± 1) °C в течение 15 мин; хранят при температуре (5 ± 3) °C не более 14 сут.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ

Определение микробиологических показателей безопасности и безвредности осуществляют перед выполнением физико-химических, органолептических и других видов испытаний.

Отбор проб для определения микробиологических показателей безопасности и безвредности осуществляют с соблюдением правил асептики, чтобы исключить вторичное загрязнение продукта.

Подготовка проб для определения микробиологических показателей безопасности и безвредности

Для определения данных параметров следует использовать образцы испытуемых изделий, не подвергавшихся внешнему воздействию.

Отбирают ($10,0\pm 0,1$) г (см^3) (или в соответствии с требованиями нормативного документа) средней пробы с соблюдением правил асептики и помещают в стеклянные колбы или флаконы, содержащие (90 ± 1) см^3 физиологического раствора, содержимое тщательно перемешивают.

Взятие смывов производят стерильным ватным увлажненным в физиологическом растворе тампоном с поверхности размером 10×10 см (или в соответствии с требованиями нормативного документа). Тампон помещают в 100 мл стерильного физиологического раствора, содержимое тщательно перемешивают.

Получают первое разведение подготовленной пробы, в 10 см³ которой содержится 1 г (1 см², 1 см³) образца - 1:10 (10⁻¹). Из первого разведения 1 см³ материала переносят в пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора, перемешивают новой стерильной пипеткой и получают второе разведение 1:100 (10⁻²). Из второго разведения 1 см³ переносят в следующую пробирку с 9 см³ стерильного физиологического раствора, перемешивают новой стерильной пипеткой и получают третье разведение 1:1000 (10⁻³) и т.д. В результате исследуемая продукция оказывается разведенной в 100 (10⁻²), 1000 (10⁻³) и более раз. Полученные разведения используют для посевов.

Посев подготовленных образцов должен быть выполнен в течение 30 мин. При невозможности выполнения этого условия посев допускается проводить не позже чем через 3 ч после подготовки проб, сохраняя их в холодильнике при (5±3)°С.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ

При определении показателей микробиологической безопасности и безвредности используют стандартизированные методы микробиологического посева.

Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Сущность метода

Метод основан на выявлении и количественном подсчете всех выросших колоний микроорганизмов при культивировании посевов в аэробных условиях при температуре (30±1) °С в течение (72±3) часов и в последующем пересчете их количества на 1 г (1 см², 1 см³) исследуемого образца.

Определение общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Метод глубинного посева:

исследуемый материал в количестве 1 см³ из соответствующего разведения (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой в две параллельные чашки Петри и не позже чем через 15 мин заливают расплавленной и охлажденной до (45±1) °С одной из сред для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий в количестве (10–15) см³. Быстро перемешивают, аккуратно вращая чашку по поверхности стола. После застывания среды чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (30±1) °С в течение (72±3) ч.

Двухслойный агаровый метод:

исследуемый материал в количестве 1 см³ из соответствующего разведения (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой в две пробирки с 4 см³ одной из сред для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45±1) °С. Быстро перемешивают содержимое пробирок и переносят в две параллельные чашки Петри с застывшей средой для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, распределяя его равномерно по поверхности среды. После застывания чашки перемещают в термостат вверх дном и термостатируют при температуре (30±1) °С в течение (72±3) ч.

Обработка и выражение результатов

Результаты оцениваются по каждой пробе отдельно.

Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 15 до 300 колоний микроорганизмов, колонии суммируют и вычисляют среднее арифметическое из посевов одного разведения.

Допускается учитывать колонии с помощью лупы с пятикратным увеличением.

Полученное среднее арифметическое число колоний округляют следующим образом:

- если число меньше 100, его округляют до ближайшего числа, кратного 5;
- если число больше 100 и его последняя цифра 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 20;
- если число больше 100 и его последняя цифра не 5, его округляют до ближайшего числа, кратного 10.

Общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \times 10^N}{q}$$

где a – округленное среднее арифметическое число колоний;

q – объем посевного материала, внесенного в чашки, см³;

N – степень десятикратного разведения образца продукта.

Результаты анализа выражают числом (от 1,0 до 9,9) × 10^N,

где «N» - соответствующая степень десятикратного разведения продукта.

Если среднеарифметическое значение числа колоний, выросших на чашках Петри, в посевах одного разведения меньше 15, то результаты выражают следующим образом: количество микроорганизмов меньше 15 умножают на $\frac{10^N}{q}$ КОЕ/г (см², см³).

Если на чашках с разведением 1:10 не обнаружено роста микроорганизмов, то результаты выражают следующим образом: менее 1,0 × 10¹ КОЕ/г (см², см³).

Если на чашках выросло более 300 колоний, то учитывают результаты на чашках с последующим разведением.

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Определение общего количества дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов

Сущность метода

Метод основан на выявлении и количественном подсчете всех выросших колоний микроорганизмов, типичных по макро- и (или) микроскопической морфологии, на селективной агаризованной питательной среде Сабуро, при культивировании посевов при температуре (24 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч и в последующем пересчете их количества на 1 г (1 см^2 , 1 см^3) исследуемого образца.

Определение общего количества дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов

Метод глубинного посева:

исследуемый материал в количестве 1 см^3 из соответствующего разведения (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой в две параллельные чашки Петри и не позже чем через 15 мин заливают расплавленной и охлажденной до (45 ± 1) °С средой Сабуро в количестве $(10\text{--}15)\text{ см}^3$. Быстро перемешивают, аккуратно вращая чашку по поверхности стола. После застывания среды чашки с посевами помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре (24 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч.

Двухслойный агаровый метод:

исследуемый материал в количестве 1 см^3 из соответствующего разведения вносят стерильной пипеткой в две пробирки с 4 см^3 предварительно расплавленной и охлажденной до температуры (45 ± 1) °С агаризованной среды Сабуро. Быстро перемешивают содержимое пробирок и переносят в две параллельные чашки Петри с застывшей агаризованной средой Сабуро, распределяя его равномерно по поверхности среды. После застывания чашки перемещают в термостат вверх дном и термостатируют при температуре (24 ± 1) °С в течение (120 ± 3) ч.

Обработка и выражение результатов

Предварительный учет типичных колоний проводят через (72 ± 3) ч термостатирования посевов, а окончательный – через (120 ± 3) ч. Результаты оцениваются по каждой пробе отдельно.

На поверхности плотной среды рост и развитие дрожжей характеризуется появлением плоских или выпуклых колоний белого или кремового, иногда серо-белого цвета. В глубине агара дрожжи образуют чечевицеобразные колонии.

Развитие плесневых грибов характеризуется появлением сметанообразных, слизистых колоний различной окраски с последующим опушением.

Для количественного подсчета отбирают чашки, на которых выросло от 5 до 150 колоний дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов, колонии суммируют и вычисляют среднее арифметическое значение из посевов одного разведения.

Допускается учитывать колонии с помощью лупы с пятикратным увеличением.

Полученное среднее арифметическое число колоний округляют как описано выше (обработка и выражение результатов).

Общее количество дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \times 10^N}{q}$$

где а – округленное среднее арифметическое число колоний;

q – объем посевного материала, внесенного в чашки, см³;

N – степень десятикратного разведения образца продукта.

Результаты анализа выражают числом (от 1,0 до 9,9) × 10^N,

где «N» – соответствующая степень десятикратного разведения продукта.

Если среднее арифметическое значение числа колоний дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов меньше 5, то результаты выражают следующим образом: общее количество дрожжей, дрожжеподобных и/или плесневых грибов, меньшее 5, умножают на $\frac{10^N}{q}$ КОЕ/г (см², см³).

Если на чашках с разведением 1:10 не обнаружено роста дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов, то результат выражают «не обнаружены».

Если на чашках выросло более 150 колоний дрожжей, дрожжеподобных и плесневых грибов, то учитывают результаты на чашках с последующим разведением.

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Выявление культуральных признаков *Candida albicans*

На среде Сабуро или агаризованном сусле колонии *Candida albicans* имеют беловато-кремовый цвет, по мере роста и увеличения размеров они иногда приобретают перламутровый оттенок и куполообразное возвышение. Для идентификации отбирают колонии с указанными признаками.

18.5. Определение способности восстанавливать ТТХ

Исследуемые дрожжи высевают штрихом на поверхность агаризованной среды с ТТХ. Посевы инкубируют при температуре (30±1) °С в течение 48 ч. *Candida albicans*, в отличие от других видов рода *Candida*, не восстанавливают 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый до окрашенного в красный цвет формазана. В случае принадлежности исследуемых дрожжей к *Candida albicans*, выросшая культура дает на указанной среде обильный пастообразный матовый беловато-кремовый рост. Наличие розового или красного окрашивания культуры исключает ее принадлежность к *Candida albicans*.

Учет результатов.

Результаты выявления дрожжей *Candida albicans* записывают «Обнаружены в X г (мл), см²» или «Не обнаружены в X г(мл), см²».

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Выявление и идентификация бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (колиформных бактерий)

Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с использованием накопительных и селективных питательных сред с дальнейшей идентификацией бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

К семейству *Enterobacteriaceae* относятся грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты и восстанавливают нитраты в нитриты.

Выявление и идентификация бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (колиформных бактерий)

Подготовленный образец в количестве 10 см³ (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой во флакон с 90 см³ одной из питательных сред обогащения для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Содержимое перемешивают и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24–48±3) ч. При наличии признаков роста на средах (помутнение среды, изменение ее цвета) делают пересев петлей обогащенной культуры на среду Эндо, разлитую в две стерильные чашки Петри в количестве (10 – 15) см³, которые инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24–48±2) ч.

Если после инкубации на среде Эндо отмечен рост колоний темно-красного цвета с металлическим блеском и без него или розовых, бесцветных, выпуклых, диаметром (2-4) мм, т.е. подозрительных на принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae*, проводят подтверждающие идентифицирующие тесты.

Петлей снимают подозрительные колонии (каждую отдельно) и готовят мазки на предметных стеклах для окраски по Граму. Мазки фиксируют трехкратным проведением над пламенем. На препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги, на нее наливают пипеткой (0,5–1,0) см³ карболового раствора генциана фиолетового на 1 мин. Затем бумагу снимают, на препарат пипеткой наливают (0,5–1,0) см³ раствора Люголя, выдерживают в течение 1 мин, препарат тщательно промывают спиртом этиловым ректификатом, затем водой дистиллированной и докрашивают (1–2) мин раствором Фуксина Циля, предварительно разведенным водой дистиллированной в объемном соотношении 1:10. Учитывают наличие грамотрицательных неспорообразующих палочек (окрашенных в розовый цвет).

Колонии, выросшие на среде Эндо, подозрительные по морфологии (каждую отдельно), пересевают петлей на одну из скошенных сред для

культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Полученные чистые культуры наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. В месте внесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета, если оксидазный тест отрицательный, и синее в течение 2-5 мин, если бактерии обладают оксидазой активностью.

Культуры пересевают петлей на среду для определения ферментации глюкозы (допускается проведение О/Ф-теста). В половину пробирок со средой для определения ферментации глюкозы вносят $0,5 \text{ см}^3$ стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. При наличии роста ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды из красного в желтый в пробирках с маслом и без него.

При проведении О/Ф-теста посев производят уколом в два столбика со средой Хью-Лейфсена, один из которых заливают 1 см^3 стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. При положительной реакции происходит изменение цвета среды из зеленого в желтый при культивировании, как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Параллельно исследуемые культуры пересевают петлей на среду для определения способности восстанавливать нитраты в нитриты. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. О наличии нитритов в среде судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса. К суточной культуре на среде для определения способности восстанавливать нитраты в нитриты приливают $(0,2-0,3) \text{ см}^3$ реактива Грисса, погружая пипетку до дна пробирки. Появление красного окрашивания свидетельствует о наличии нитратов.

Обработка и выражение результатов

Если в исследуемом образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты и восстанавливают нитраты в нитриты. Это значит, что исследуемый образец контаминирован бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Результат выражают следующим образом: в М г (см^2 , см^3) изделия обнаружены бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (условное обозначение – «*Enterob. обн.*»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

В исследуемом образце бактерии семейства *Enterobacteriaceae* отсутствуют, если при визуальном контроле на чашках с соответствующими средами после инкубации не обнаруживают колоний с характерной морфологией. Результат выражают следующим образом: М г (см^2 , см^3) изделия бактерии семейства *Enterobacteriaceae* не обнаружены (условное обозначение – «*Enterob. н.о.*»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Выявление *Escherichia coli*

Escherichia coli – термотолерантные энтеробактерии, не утилизирующие цитрат, продуцирующие индол из триптофана при температуре $(44\pm 1,0)$ °С в течение (22 ± 2) ч.

Для подтверждения наличия *Escherichia coli* осуществляют посев 3-4 типичных колоний со среды Эндо (колонии темно-красного цвета с металлическим блеском и без него, розовые, диаметром 2-4 мм) в предварительно прогретую до (43 ± 1) °С среду и инкубируют при $(44\pm 1,0)$ °С в течение (24 ± 2) ч.

Первичный учет кислоты и газа на подтверждающих средах возможен через 4-6 ч. При обнаружении кислоты и газа выдают положительный ответ. При отсутствии кислоты и газа или при наличии только кислоты пробирки с посевами оставляют до 24-48 ч.

При отсутствии через 24 ч газообразования в пробирках, инкубирующихся при температуре $(44\pm 1,0)$ °С, получают окончательный отрицательный ответ, при наличии газообразования проводится дальнейшая идентификация.

Подтверждение способности продуцировать индол из триптофана

Колонии со скошенного питательного агара пересевают петлей в пробирки с триптофановым бульоном и инкубируют при температуре $(44\pm 1,0)$ °С в течение (22 ± 2) часов. После инкубирования определяют образование индола путем добавления 0,2-0,3 мл реактива Ковача.

Образование вишнево-красной окраски на поверхности триптофанового бульона считают положительной индольной реакцией, подтверждающей образование индола.

Определение способности усваивать цитрат натрия

Предполагаемые *Escherichia coli* из пяти-восьми колоний со среды Эндо пересевают петлей в пробирки со средой Козера. Посевы помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на время от 18 до 24 ч. О принадлежности исследуемых бактерий к роду *Escherichia* свидетельствует отсутствие роста на среде Козера (цвет среды не меняется).

20.4. Учет результатов.

Термотолерантные энтеробактерии, не утилизирующие цитрат, продуцирующие индол из триптофана при температуре $(44\pm 1,0)$ °С в течение (22 ± 2) ч, учитывают как *Escherichia coli*.

Результаты выявления бактерий *Escherichia coli* записывают так: «Обнаружены в X г (мл), см²» или «Не обнаружены в X г(мл), см²».

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническим нормативами.

Выделение и идентификация бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* с использованием накопительных и селективных питательных сред с последующей идентификацией бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* представляют собой грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию, образуют проникающий в субстрат пигмент феназинового ряда, имеющий буроватый оттенок с вариантами от сине-зеленого (пиоцианин) до коричнево-красного, и способны к росту при температуре (43 ± 1) °С.

Выделение и идентификация бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*

Подготовленный образец в количестве 10 см^3 (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой во флакон с 90 см^3 одной из питательных сред для обогащения бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*.

Содержимое перемешивают и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение $(24-48\pm 3)$ ч. При наличии признаков роста в среде делают пересев обогащенной культуры петлей на одну из сред для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий, инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение $(24-48\pm 3)$ ч.

При наличии роста характерных колоний, обладающих специфическим неприятным запахом, выделяющих сине-зеленый пигмент пиоцианин, колонии микроскопируют и исследуют на наличие фермента цитохормоксидазы.

При микроскопировании мазков, окрашенных по Граму, учитывают наличие грамотрицательных неспорообразующих палочек.

Колонии, подозрительные по морфологии (каждую отдельно), пересевают петлей на одну из скошенных сред для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Посевы инкубируют при (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч.

Выросшие культуры наносят штрихом на фильтровальную бумагу, предварительно смоченную реактивом для определения цитохромоксидазы. В месте внесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета, если оксидазный тест отрицательный, и синее в течение 2-5 мин., если бактерии обладают оксидазной активностью.

Оксидазоположительные колонии пересевают на среду Кинг-А и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение $(24-48\pm 3)$ часов. На среде Кинг-А бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* образуют пигмент феназинового ряда, имеющий буроватый оттенок с вариантом от сине-зеленого (пиоцианин) до коричнево-красного и проникающий в субстрат.

Для дополнительного подтверждения принадлежности к виду *Pseudomonas aeruginosa* чашки со средой Кинг-А инкубируют при температуре

(43±1) °С в течение (24±3) ч. Культура *Pseudomonas aeruginosa* растет в вышеуказанных условиях с образованием сине-зеленого пигмента.

Обработка и выражение результатов

Если в результате исследований обнаружены колонии грамотрицательных неспорообразующих палочек, дающих положительную оксидазную реакцию, образующие пигмент или без него и дающие рост при (43±1) °С, считают, что исследуемый образец контаминирован *Pseudomonas aeruginosa*. Результат выражают следующим образом: в М г (см², см³) изделия обнаружены бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* (условное обозначение – «P. aerug. обн.»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*.

В исследуемом образце изделия бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* отсутствуют, если при визуальном контроле на чашках со средами после инкубации не обнаруживают характерных по морфологии колоний. Результат выражают следующим образом: в М г (см², см³) изделия бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* не обнаружены (условное обозначение – «P. aerug. н.о.»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*.

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Выделение и идентификация бактерий вида *Staphylococcus aureus*

Сущность метода

Метод основан на выявлении бактерий вида *Staphylococcus aureus* с использованием накопительных и селективных питательных сред с дальнейшей идентификацией выявленных бактерий по нижеследующим биохимическим тестам.

Бактерии вида *Staphylococcus aureus* представляют собой грамположительные кокки, обладающие лецитиназной активностью, сбраживающие маннит в аэробных и анаэробных условиях или мальтозу в анаэробных условиях и дающие положительную реакцию плазмокоагуляции.

Проведение выделения и идентификации бактерий вида *Staphylococcus aureus*

Подготовленный образец в количестве 10 см³ (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой во флакон с 90 см³ одной из питательных сред для обогащения бактерий вида *Staphylococcus aureus*.

Содержимое перемешивают и инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (24-48±3) часов. При наличии признаков роста делают пересев обогащенной культуры петлей на одну из следующих сред: желточно-солевой агар, Байрд-Паркер агар, маннитно-солевой агар. Посевы на желточно-солевом агаре и Байрд-Паркер агаре инкубируют при температуре (37±1) °С в течение (48±3) ч, а посевы на маннитно-солевом агаре – (24-48±3) ч.

При росте на желточно-солевом агаре бактерии вида *Staphylococcus aureus* образуют круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара колонии с ровными краями диаметром 2–2,5 мм, окрашенные в желтый, золотистый, кремовый, палевый или белый цвет, окруженные зоной лецитиназной активности.

На среде Байрд–Паркер бактерии вида *Staphylococcus aureus* растут в виде черных блестящих колоний диаметром 1–1,5 мм, окруженных зоной лецитиназной активности.

Наличие на маннитно-солевом агаре колоний, окруженных желтыми зонами, свидетельствует о способности этих микроорганизмов ферментировать маннит.

При наличии характерных колоний производят микроскопию и при необходимости исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы.

Из подозрительных по морфологии колоний делают мазки и окрашивают по Граму. Стафилококки по Граму окрашиваются положительно, имеют шарообразную или близкую к ней форму с диаметром (0,6–1,0) мкм и располагаются обычно в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда.

Отсутствие в мазках грамположительных кокков, окрашенных в сине-фиолетовый цвет и расположенных скоплениями в виде гроздьев, свидетельствует об отсутствии стафилококков. В этом случае дальнейшие исследования не производят.

При обнаружении грамположительных кокков делают пересев на одну из скошенных сред для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. Выделенную чистую культуру пересевают на среду Гисса с маннитом или мальтозой, разлитую высоким столбиком (посев производят уколом). Инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (24 ± 3) ч. В случае роста стафилококков на среде Гисса с маннитом или мальтозой наблюдается ферментация или окисление углевода, сопровождающиеся изменением цвета среды.

Выделенную чистую культуру исследуют на наличие фермента плазмокоагулазы. Для проведения реакции сухую кроличью цитратную плазму разводят согласно наставлению по применению и разливают по 0,5 см³ в четыре стерильные пробирки. В пробирки с раствором плазмы вносят по одной петле исследуемой суточной культуры с каждой пробирки со средой для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных бактерий и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (4–6) ч. Обязательна постановка двух параллельных контролей: первый контроль – пробирка только с раствором плазмы; второй контроль – пробирка с раствором плазмы, в которую внесена суточная культура стафилококка, заведомо обладающего ферментом коагулазой. Если в эти сроки не наблюдается свертывание плазмы в опытной и первой контрольных пробирках, то реакция плазмокоагуляции считается отрицательной; если плазма в опытной пробирке коагулирована аналогично второму контролю – положительной.

Обработка и выражение результатов

Если в результате исследований обнаружены колонии грамположительных кокков, ферментирующие маннит в аэробных и анаэробных условиях или мальтозу в анаэробных условиях, обладающие лецитиназной активностью и дающие положительную реакцию плазмокоагуляции, считают, что изделие контаминировано *Staphylococcus aureus*. Результат выражают следующим образом: в М г (см², см³) изделия обнаружены бактерии вида *Staphylococcus aureus* (условное обозначение – «S. aureus обн.»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии вида *Staphylococcus aureus*.

В исследуемом образце изделия бактерии вида *Staphylococcus aureus* отсутствуют, если при визуальном контроле на чашках со средами после инкубации не обнаруживают характерных по морфологии колоний или при выявлении подозрительных колоний микроскопией не подтверждают наличие грамположительных кокков. Результат выражают следующим образом: в М г (см², см³) изделия бактерии вида *Staphylococcus aureus* не обнаружены (условное обозначение – «S. aureus н.о.»),

где М – масса (площадь, объем) образца изделия, в котором выявляли бактерии вида *Staphylococcus aureus*.

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.

Выявление бактерий рода *Salmonella*

Принцип метода. Из объектов исследования бактерии рода *Salmonella* выделяют с помощью посева на среды обогащения. Предварительное обогащение может способствовать выявлению ослабленных сальмонелл.

Для предварительного обогащения подготовленный образец в количестве 10 см³ (или в соответствии с требованиями нормативного документа) вносят стерильной пипеткой в 20-100 мл забуференной пептонной воды. Посевы инкубируют 16-20 ч при 37 °С.

Пробу после предварительного обогащения засевают в две среды для селективного обогащения в отношении 1:10 (например, к 100 мл среды обогащения прибавляют 10 мл пробы после предварительного обогащения). Для этого используют две среды: магниевую и тетратионатную или селенитовую и тетратионатную среды.

Посевы инкубируют в течение 24-48 ч на магниевой и селенитовой средах при температуре (36±1) °С, а на тетратионатной среде – при температуре (43±1) °С.

Для выделения и идентификация культур на агаризованных дифференциально-диагностических средах культуры через 24 и 48 ч инкубирования пересевают на три агаризованные среды: висмут-сульфит агар, среду Плоскирева и среду Эндо (или среду Левина). Допускается использование одной чашки каждой из сред для одновременного посева с двух селективных сред.

Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С, в течение 24-48 ч.

После 24 ч инкубации посевов проводят предварительный учет результатов, а после 48 ч – окончательный.

После инкубирования посевов отмечают на дифференциально-диагностических средах рост колоний, характерных для бактерий рода *Salmonella*:

- на висмут-сульфит агаре колонии черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и пигментированием среды под колониями;

- на среде Плоскирева колонии бесцветные прозрачные, но более плотные, чем на среде Эндо;

- на среде Эндо колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные;

- на среде Левина колонии прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые.

При отсутствии в посевах на дифференциально-диагностических средах характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний дают заключение об отсутствии таковых в анализируемом объеме продукта.

При наличии хотя бы на одной дифференциально-диагностической среде характерных для бактерий рода *Salmonella* колоний необходимо дальнейшее изучение.

Для биохимического подтверждения принадлежности выделенных характерных колоний к бактериям рода *Salmonella* не менее трех характерных колоний с каждой дифференциально-диагностической среды пересевают на скошенную поверхность мясо-пептонного агара или среды из сухого питательного агара. Часть колоний пересевают штрихом на поверхности и уколом в столбик трехсахарного агара. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч.

Из отобранных для биохимического подтверждения колоний готовят мазки и окрашивают по Граму и микроскопируют:

- на обезжиренное спиртом предметное стекло наносят петлей 1 каплю дистиллированной воды, вносят небольшое количество культуры из анализируемой колонии и распределяют ее по поверхности стекла;

- мазок высушивают при комнатной температуре и фиксируют трехкратным проведением через пламя горелки;

- на препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают раствор кристаллического фиолетового, через 0,5-1,0 мин бумагу снимают;

- наливают раствор Люголя на 0,5-1,0 мин, затем сливают его и промывают стекло обесцвечивающей жидкостью, пока не перестанет отходить краситель (15-30 с);

- стекло тщательно промывают водой и докрашивают в течение 1-2 мин раствором фуксина или сафранина;

- стекло промывают и просушивают фильтровальной бумагой;

- препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

Грамотрицательные микроорганизмы имеют розовую окраску, грамположительные окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, колиформные бактерии являются грамотрицательными палочками.

Бактерии рода *Salmonella* являются грамотрицательными палочками с закругленными концами.

После инкубации посевов проводят учет результатов ферментации лактозы, глюкозы и сахарозы на трехсахарном агаре:

- пожелтение скошенной части среды указывает на ферментацию лактозы или сахарозы или обоих сахаров;

- пожелтение столбика среды с разрывом агара или пузырьками газа указывает на ферментацию глюкозы с образованием газа, пожелтение столбика среды без разрывов или пузырьков указывает на ферментацию глюкозы без образования газа;

- почернение среды в столбике указывает на образование сероводорода.

Типичными для бактерий рода *Salmonella* являются культуры, ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа, не ферментирующие лактозу и сахарозу, образующие сероводород.

Дальнейшему изучению подвергают также лактозоположительные бактерии или бактерии, не образующие сероводород, но обязательно ферментирующие глюкозу с образованием или без образования газа.

У культур изучают возможность расщепления мочевины, образования ацетоина и индола, ферментации сахарозы и маннита и подвижность.

Для определения расщепления мочевины культуры пересевают штрихом на поверхность агара Кристенсена с мочевиной.

Посевы инкубируют при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

При положительной реакции – расщепление мочевины цвет среды от розового до светло-вишневого. Для уреазоположительных бактерий реакция часто становится видимой после 2 ч инкубирования.

Бактерии рода *Salmonella* не расщепляют мочевины.

Для определения образования ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра) культуры пересевают в мясо-пептонный бульон с глюкозой. Посевы инкубируют при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. После инкубирования к 1 мл отобранной культуральной жидкости прибавляют 0,6 мл раствора α -нафтола, и 0,2 мл раствора гидроокиси калия концентрации 400 г/мл. После прибавления каждого реактива пробирку встряхивают. Появление розового окрашивания через 15 мин указывает на положительную реакцию. Бактерии рода *Salmonella* не образуют ацетоина (реакция Фогес-Проскауэра отрицательная).

Для определения образования индола культуры пересевают в бульон Хоттингера, или в мясо-пептонный бульон с L-триптофаном. Посевы инкубируют при температуре $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. После инкубирования к посевам прибавляют по 1 мл реактива Эрлиха или Ковача. Образование красного слоя указывает на положительную реакцию.

Бактерии рода *Salmonella* не образуют индол.

Для определения ферментации маннита и сахарозы культуры пересевают в среды Гисса с маннитом или сахарозой. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. Бактерии рода *Salmonella* не сбраживают сахарозу и маннит.

При сбраживании маннита и сахарозы цвет среды изменяется, образуется или не образуется газ.

Для определения подвижности культуры пересевают уколом в полужидкий мясо-пептонный агар. Посевы инкубируют при температуре (36 ± 1) °С в течение 24 ч. При росте подвижных культур отмечается диффузный рост по всему столбику агара, при росте неподвижных культур – вдоль места укола.

Большинство штаммов бактерий рода *Salmonella* подвижны.

Оценка результатов

Культуры, показавшие типичные биохимические реакции, относят к бактериям рода *Salmonella*.

Результаты выявления бактерий рода *Salmonella* записывают «Бактерии рода *Salmonella* обнаружены в X г(мл), см²» или «Бактерии рода *Salmonella* не обнаружены в X г(мл), см²».

Оценка осуществляется путем сравнения выраженного результата с гигиеническими нормативами.