

639.3
А 38



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

Научно-технические и методические
документы

АКВАКУЛЬТУРА

ВЫПУСК 3

Руководство по применению
микробиологических тестов
Petrifilm 3М для характеристики
рыбных кормов

Издательство ВНИРО

МОСКВА 2007

Министерство сельского хозяйства РФ
Федеральное агентство по рыболовству

Федеральное государственное унитарное предприятие
"Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии" (ВНИРО)

Научно-технические и методические документы

АКВАКУЛЬТУРА

Выпуск 3

РУКОВОДСТВО

**по применению микробиологических тестов
Petrifilm 3М для характеристики
рыбных кормов**



Издательство ВНИРО

Москва 2007

УДК 639.3.043.2:576.8

Разработано Всероссийским научно-исследовательским институтом рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Автор-составитель: И.В. Бурлаченко, канд. биол. наук.

Р 49 **Руководство** по применению микробиологических тестов Petrifilm ЗМ для характеристики рыбных кормов.- М.: Изд.-во ВНИРО. 2007.- 36 с.

Приведены методы ускоренного выявления в определенной навеске количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), энтеро- и колиформных бактерий, а также дрожжей, плесеней и стафилококков.

Руководство предназначено для применения в лабораториях организаций, осуществляющих контроль рыбных комбикормов, сырья, в лабораториях ветеринарной службы или иных организаций, в рыбоводных хозяйствах.

/ одобрено Ученым советом ВНИРО 13 мая 2006 г./

ISBN 978-5-85382-012-8 © Издательство ВНИРО, 2007

ВВЕДЕНИЕ

Вступление в силу в 2003 году закона "О техническом регулировании" предполагает ужесточение требований к безопасности комбикормов, т.е. к тому, что непосредственно связано с охраной жизни и здоровья объектов культивирования и человека.

Характеристика степени бактериальной обсемененности комбикормов и присутствие в них патогенных микроорганизмов относятся к основным показателям, по которым оценивается их безопасность. Особую актуальность микробиологический контроль приобретает в связи с тем, что комбикорма для рыб включают значительное количество рыбной муки, других высокобелковых компонентов, а также рыбий жир, растительные масла и так далее. Эти источники сырья, с одной стороны, обеспечивают биологическую ценность комбикормов, а с другой, - представляют собой потенциальный субстрат для развития микрофлоры. Следствием интенсивного размножения микроорганизмов, как правило, является не только снижение вкусовых качеств кормов, происходящее под действием про-

дуктов жизнедеятельности микрофлоры, но и также накопление токсинов, образуемых многими ее видами. Следует отметить, что образование токсических продуктов жизнедеятельности микрофлоры, в большинстве своем, идет по типу цепной реакции, при взаимном усилении токсинообразующего эффекта, который нарастает и далее в процессе хранения кормов.

Как показывают литературные и собственные экспериментальные данные, питание рыб комбикормами с высокой степенью обсемененности микроорганизмами (более 10^6 колонии образующих единиц на 1 г корма (КОЕ/г) может сопровождаться интоксикацией организма рыб, поражениями внутренних органов, нарушениями в обмене веществ, а также бактериальными заболеваниями и гибелью [Жезмер и др., 1991; Войнова, 1991; Бурлаченко и др., 2001, 2002].

В соответствии с действующими ТУ на лососевые и осетровые комбикорма, их бактериальный фон нормируется на уровне 5×10^5 КОЕ/г. Значимость этого показателя обусловлена необходимостью оценки бактериального заражения комбикормов и его последствий.

В то же время процедура микробиологического анализа достаточно сложна, продолжительна по времени и трудоемка. Поэтому в практике работы рыбоводных предприятий и комбикормовых заводов, исследование бактериальной обсеменен-

ности кормов в большинстве случаев затруднено. Подготовка и проведение анализов возможны лишь в специализированных бактериологических лабораториях и должны осуществляться квалифицированным персоналом. Кроме того, детальная идентификация основных групп микроорганизмов, необходимая для точной диагностики и назначения комплекса экстренных мероприятий, достаточно длительна. Потеря времени в условиях рыбоводных хозяйств, при значительном поражении комбикормов патогенными или условно патогенными формами, вызывающими бактериальные заболевания или сопутствующие инфекции, может сыграть отрицательную роль.

В целях упрощения процедуры микробиологического анализа комбикормов и обеспечения возможности его проведения непосредственно в хозяйствах или на комбикормовых заводах, не имеющих соответствующих лабораторий, мы предлагаем модификацию современной тест-системы Petrifilm 3M. Эта экспресс система была разработана в США Бобом Нельсоном (Bob Nelson) в 1984 г. и постоянно совершенствуется. В Европе система появилась в конце 80-х годов. На сегодняшний день она используется более чем на 3000 европейских предприятиях пищевой и сельскохозяйственной промышленности.

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Федеральный закон «О техническом регулировании» № 184-83 от 27.12.2002 г.

ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб.

ГОСТ Р 51419-99 (ИСО 6498-98) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб.

ГОСТ Р 51426-99 (ИСО 6887-83) Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований.

ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

ТУ 9296-003-13250589-2002. Технические условия на комбикорма для осетровых рыб. Зарегистрированы Госстандартом РФ 12.02.2003.

АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

Термостаты с диапазоном рабочих температур 15-55°C
ТУ 64-1-1382-83.

Лабораторная мельница.

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса
ГОСТ 24104.

Холодильник бытовой электрический ГОСТ 16137.

Стерилизаторы медицинские паровые и воздушные
ГОСТ 27437-87.

Пипетки градуированные исполнения 1,2 классов точно-
сти вместимостью 1 см³ и 10 см³ ГОСТ 29227.

Пробирки разной вместимости ГОСТ 25336-82.

Микродозаторы на 1 см³ и 5 см³.

Стерильные наконечники от 1 см³ и 5 см³.

Пластины Petrifilm 3М для определения количества:
аэробных бактерий (Petrifilm 3М Aerobic Count Plate) Cat.
№ 06400, 06406; ISO 9002;

энтеробактерий (Petrifilm 3М Enterobacteriaceae Count
Plate) Cat. № 06420, 06421; ISO 9002;

колиформных бактерий (Petrifilm 3М Coliform Count
Plate) Cat. № 06410, 06416 ISO 9002;

стафилококков (Petrifilm 3М Staph Express Count System)
Cat № 06490; диски для экспресс-анализов Cat № 06493;

дрожжей и плесеней (Petrifilm 3М Yeast and Mold Count)
Plate Cat. № 06407, 06417, ISO 9002

ПРИНЦИП МЕТОДА

В основе метода лежит использование для микробиологических посевов тест-пластин Petrifilm 3М с готовыми питательными средами. Находящиеся на пластинах специфичные среды, предназначены для идентификации и количественного учета различных групп микроорганизмов путем подсчета всех выросших видимых колоний.

Микробиологический анализ на пластинах имеет существенные преимущества перед традиционным, проводимым на чашках Петри. Использование пластин с готовыми стандартными питательными средами позволяет отказаться от обычной процедуры их приготовления из сухих сред, нанесения на чашки, охлаждения. При этом нет необходимости в стерильном помещении и автоклаве, большом количестве посуды, ее подготовке и стерилизации. Срок хранения пластин - более года. Сам процесс посева также упрощен, так как не нужны дополнительные усилия и время для равномерного распределения образца на чашке Петри. Для проведения анализов на пластинах, в отличие от традиционных, выполняемых в микробиологической лаборатории, не требуется специальной подготовки и высокой квалификации персонала. Все это, наряду с экономией времени и трудовых затрат, позволяет также значи-

тельно увеличить эффективность использования рабочих площадей. Кроме того, согласно информации фирмы – изготовителя, использование пластин при тех же материальных затратах позволяет увеличить количество анализов на 60%.

Стоимость комплексного анализа одного образца комбикорма, проводимого на пластинах, при существующем уровне цен в 2-3 раза ниже стоимости аналогичного анализа в отечественных микробиологических лабораториях.

Пластины Petrifilm 3М сертифицированы в США и Европе по системе ISO 9002 и 9001, что является свидетельством стабильного качества и высокого уровня их производства.

Предлагаемая нами модификация метода предусматривает его применение для количественной и качественной характеристики микрофлоры, обычно населяющей сырье и комбикорма для рыб.

Предварительно, с целью определения возможности использования метода, нами был изучен бактериальный фон более 100 образцов рыбных комбикормов различного назначения, изготовленных предприятиями нашей страны и за рубежом. Обобщение результатов позволило установить, что наиболее типичными являются 4 группы микроорганизмов. К ним относятся бактерии рода *Bacillus*, на долю которых приходилось 23% от общего числа микроорганизмов, встречающихся в

комбикормах, бактерии рода *Staphylococcus* (21%), плесени и дрожжеподобные грибы (21%), энтеробактерии (сем. *Enterobacteriaceae*), в число которых входят, преимущественно, бактерии группы кишечной палочки (18%). По 6% приходилось на бактерии р. *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. На долю остальных микроорганизмов - около 5%.

На основании полученных данных о преобладающих группах микроорганизмов, из предлагаемого фирмой 3М набора тест-пластин, нами были выбраны следующие: Petrifilm 3М АС (Petrifilm 3М Aerobic Count Plate) – для определений общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ); Petrifilm 3М Enterobacteriaceae Count Plate - для определения энтеробактерий; Petrifilm 3М Coliform Count Plate - для определения колиформных бактерий; Petrifilm 3М Yeast and Mold Count Plate - для дрожжей и плесеней; Petrifilm 3М Staph Express Count System - для определения стафилококков.

В последнем случае следует отметить, что предлагаемые тест-пластины для определения стафилококков предназначены для идентификации лишь золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*,) и сходных с ним по культуральным свойствам - *St. hyicus*, *St. intermedius*. Их встречаемость в кормах для рыб не велика и составляет около 4-5% от общего количества мик-

роорганизмов комбикормов (остальные бактерии этой группы представлены, в основном, белым стафилококком (*St. epidermidis*). Однако, принимая во внимание патогенность и опасность золотистого стафилококка для человека, мы включили пластины по определению этих бактерий в предлагаемую тест-систему оценки комбикормов для рыб.

Для подтверждения возможности использования пластин Petrifilm 3М при бактериологических анализах комбикормов были проведены сравнительные посеы 18 образцов кормов на тест пластинах и эритрит-агаре (определение общего количества микроорганизмов), среде Эндо (энтеробактерии) и среде Сабуро (грибы и дрожжи). Подготовка проб, посеы и их инкубация проводились в соответствии с традиционными методиками и рекомендациями фирмы 3М для тестов Petrifilm.

Полученные данные показали, что при определении общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 78% случаев пластины Petrifilm 3М зафиксировали большее или сопоставимое количество микроорганизмов. В 22% случаев пластины показали меньшие значения. Более детальный анализ, проведенный традиционным способом на специализированных питательных средах, позволил установить, что тесты не выявили, главным образом, присутствие бактерий *p. Acinetobacter*, встречаемость

которых в кормах невелика. В то же время, пластины оказались более чувствительными при обнаружении дрожжей и плесеней. Принимая во внимание высокую чувствительность пластин при выявлении основных групп микроорганизмов комбикормов, можно говорить о целесообразности их применения для качественной и количественной характеристик бактериальной обсемененности кормов.

ОПИСАНИЕ ПЛАСТИН PETRIFILM 3M

Пластина Petrifilm 3M представляет собой нанесенную на пластиковую основу многослойную систему. Первый слой состоит из клеящего состава с индикатором, который меняет цвет при прорастании колоний микроорганизмов; второй – гелеобразующее вещество, которое после посева образца удерживает влагу, необходимую для развития микроорганизмов, следующий слой – одна из стандартных (специфичных для различных групп микроорганизмов) питательных сред. Сверху пластина покрыта водонепроницаемой защитной пленкой. Защитная пленка имеет масштабную сетку (с шагом 1 см), облегчающую подсчет выросших колоний. Размер пластин - 7×10 см, вес – менее 1 г. Все пластины имеют маркировку, соответствующую каждому типу (рис.1).

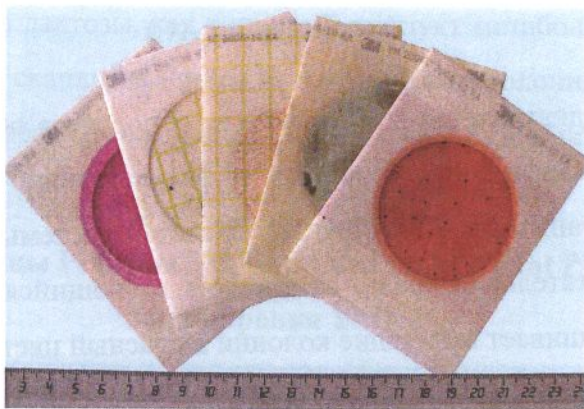


Рис.1. Пластины Petrifilm 3М

Для равномерного нанесения образца на пластины, вместо применяемого в обычной практике растирания шпателем, используется специальный пластиковый "распределитель", который прилагается к каждому комплекту пластин. Применение распределителя позволяет не только равномерно нанести образец на зону роста, но и стандартизировать площадь, занимаемую образцом. При этом, зона роста бактерий на пластинах для подсчета общего количества аэробных микроорганизмов, энтеро- и колиформных бактерий составляет 20 см^2 , а на пластинах для подсчета дрожжей и грибов, стафилококков – 30 см^2 .

Пластины Petrifilm 3M Aerobic Count Plate **(маркировка АС)**

Предназначены для выявления и подсчета общего количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ). В состав системы входит базовая питательная среда. Индикатор, имеющийся на пластинах, окрашивает выросшие колонии в красный цвет.

Пластины Petrifilm 3M Enterobacteriaceae Count Plate **(маркировка ЕВ)**

Используются для обнаружения и количественного определения бактерий кишечной группы. В состав системы входит питательная среда, содержащая специфичный комплекс компонентов на основе глюкозы и фиолетово-красной желчи. Индикатор окрашивает проросшие колонии в красный цвет.

Пластины Petrifilm 3M Coliform Count Plate **(маркировка СС)**

Предназначены для выявления и определения количества колиформных бактерий. В состав системы входит питательная

среда, содержащая модифицированный состав с лактозой. При ферментации лактозы, как конечный продукт метаболизма образуется газ, скапливающийся вокруг красных колоний. Индикатор окрашивает выросшие колонии в красный и синий цвет.

Пластины Petrifilm 3M Yeast and Mold Count Plate (маркировка YM)

Применяются для идентификации и подсчета дрожжей и плесеней. Пластины содержат питательную среду с антибиотиком, тормозящим рост бактерий. Индикатор окрашивает колонии дрожжей в сине-зеленый, а плесеней - в черный или другие, характерные для них цвета.

Система Petrifilm 3M Staph Express Count System (маркировка STX)

Система предназначена для выявления и подсчета количества стафилококков. Состоит из пластин Petrifilm 3M Staph Express и дисков Petrifilm 3M Staph Express, которые упакованы отдельно. На пластины нанесена селективная питательная среда для *St. aureus*. Имеющийся индикатор окрашивает колонии в красно-фиолетовый цвет. Диск содержит индикатор, ко-

торый способствует визуализации *St. aureus*, *St. hyicus*, *St. intermedius*, относящихся к коагулазо-положительным стафилококкам. На диске вокруг колоний *St. aureus* появляется светлая зона, окрашенная в розовый цвет. Диск используется для более полного подсчета стафилококков, в случае присутствия на пластине Staph Express колоний разного цвета.

ХОД АНАЛИЗА

1. Отбор проб

Проводится в соответствии с ГОСТ 13496.0-80.

Пробы отбирают в стерильные или одноразовые пластиковые пакеты или посуду с помощью стерильных инструментов следующим образом:

1.1. От исследуемой партии корма или сырья из 10 различных мест отбирают не менее 10 образцов проб (по 200 г) и объединяют их в стерильном пакете. Объединенную пробу (2 кг) тщательно перемешивают встряхиванием;

1.2. Из объединенной пробы отбирают среднюю, весом 20 г и делят ее на две части:

одну часть помещают в чистый одноразовый или стерильный герметичный пакет из полиэтилена, опечатывают и отправляют на анализ;

вторую половину средней пробы, также помещенную в стерильный герметичный пакет, опечатывают и хранят не менее месяца на случай проведения контрольных испытаний.

2. Подготовка проб к испытанию

Проводится в соответствии с ГОСТ Р 51419-99 и другими действующими нормативными документами на конкретные виды сырья и продуктов.

2.1. Для извлечения микроорганизмов из кормов и сырья готовятся их водные вытяжки. Навеска, предназначенная для приготовления стандартного исходного разведения (1:10), должна составлять не менее 1,0 г;

2.2. Твердые образцы измельчают до порошкообразного состояния на лабораторной мельнице, предварительно обработанной спиртом, или в стерильной ступке;

2.3. Приготовление исходного раствора:

измельченную навеску (1 г) помещают в стерильную колбу и добавляют стерильный физиологический раствор в соотношении 1:10. Полученную взвесь интенсивно встряхивают не менее 5 минут, затем дают отстояться 20-30 минут;

из надосадочной жидкости для посева на пластину или для последующего разведения берут 1 мл, который соответствует экстракту из 0,1 г корма или разведению 1:10.

2.4. Необходимость последовательных разведений обусловлена высокой степенью обсемененности кормов микроорганизмами. Без разведений, как правило, проводят посевы для определения дрожжей и плесеней, стафилококков. Для определения количества энтеро- и колиформных бактерий требуются 1-2 последовательных десятикратных разведения. Определение общего количества микроорганизмов в комбикормах и сырье обычно требует не менее двух-трех разведений (т.е. 1:100 или 1:1000).

Разведения осуществляют в соответствии с ГОСТ Р 51426-99. Для этого берут ряд стерильных пробирок, надписи на которых соответствуют степени разведения. В каждую из них вносят по 9 мл стерильного физиологического раствора. Затем в первую пробирку стерильной пипеткой, не касаясь ею стенок пробирки и жидкости, вносят 1 мл исходного раствора (надосадочной жидкости). Содержимое пробирки тщательно перемешивают стерильной стеклянной палочкой, степень разведения в этом случае составляет 1:100 (или 10^{-2}). Для следующего разведения (1:1000 или 10^{-3}) чистой стерильной пипеткой берут 1 мл из первой пробирки, вносят его в следующую пробирку и перемешивают. Для разведения 10^{-4} из второй пробирки берут 1 мл и помещают его в пробирку в следующую и т.д. При необходимости кратность разведений увеличивают.

3. Подготовка пластин Petrifilm 3М

3.1. До использования закрытые упаковки с пластинами хранят в холодильнике при температуре не выше 8°C. Продолжительность хранения - более года. Срок хранения каждой партии указан на упаковке.

3.2. Подготовка пластин к анализу ведется следующим образом:

перед использованием упаковку с пластинами вынимают из холодильника и выдерживают до достижения ими комнатной температуры;

для анализа из вскрытой упаковки отбирают необходимое количество пластин. Упаковку с неиспользованными пластинами плотно закрывают и заклеивают скотчем.

3.3. Вскрытую упаковку с пластинами можно хранить не более месяца в сухом прохладном месте. Во избежание излишнего увлажнения пластины вскрытые упаковки не рекомендуется хранить в холодильнике.

3.4. Пластины с измененной окраской для работы не пригодны.

4. Проведение испытаний

4.1. Перед нанесением образца пластину Petrifilm-3М следует положить на ровную горизонтальную поверхность.

Шариковой ручкой или маркером подписать шифр образца и степень разведения.

4.2. Нанесение образца на пластину проводят стерильной пипеткой или автоматическим дозатором со стерильным накопечником:

для этого немного приподнять защитную пленку пластины и пипеткой, расположив ее перпендикулярно к пластине, и в ее центр нанести 1 мл образца (рис. 2);

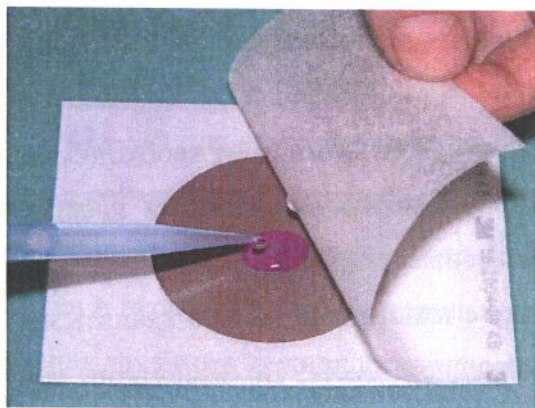


Рис. 2. Нанесение образца на пластину

далее следует аккуратно опустить защитную пленку, не допуская ее скручивания и попадания под нее пузырьков воздуха, и легко придавить каплю одной из поверхностей, распределителя, при этом распределитель не должен скользить по пластине. Гладкая сторона распределителя используется на пластинах, предназначенных для подсчета общего количества микроорганизмов, неровная – на пластинах для энтеро- и колиформных

бактерий; пластины для подсчета дрожжей, грибов и стафилококков имеют свой распределитель.

4.3. После того, как под действием распределителя капля приобретает форму круга, его следует снять.

4.4. Для предотвращения вытекания образца, пластины должны оставаться в горизонтальном положении в течение одной-двух минут, т.е. времени, необходимого для образования геля.

4.5. Посев на диск Staph Express:

перед использованием следует довести температуру упаковки с дисками до уровня комнатной;

затем, держа диск за табулятор, снять с него упаковку;

поднять защитную пленку на пластине петрифилем Staph Express и поместить диск между пластиной и защитной пленкой. (Внимание: иногда гель пластины при поднятии защитной пленки может разорваться, однако, на точности определений это не сказывается, т.к. диск покрыт питательной средой с обеих сторон);

опустить защитную пленку на диск, и скользящим движением пальца по пластине обеспечить равномерный контакт диска с гелем и удаление пузырьков воздуха. Не следует давить очень сильно на диск, т. к. это может повредить гель, что

приведет к нечеткости контуров зон; в то же время, слишком слабое давление на диск может привести к подъему защитной пленки и подсушиванию геля.

5. Инкубация посевов

5.1. Пластины укладывают в термостат в горизонтальном положении, защитной пленкой вверх. Их можно накладывать одну на другую, но не более 20 в стопке. Диски Staph Express инкубируют внутри пластин.

5.2. Условия инкубации приведены в табл. 1:

Таблица 1

Условия инкубации пластин 3М Petrifilm

Тип пластин 3М Petrifilm	Температура, °С	Продолжительность, ч
Aerobic Count Plate (КМАФАнН)	30±1°С	48
Enterobacteriaceae Count Plate (энтеробактерии)	35±1°С	24
Coliform Count Plate (E. coli и колиформы)	35±1°С	24
Yeast and Mold Count Plat (дрожжи и плесневые грибы)	20-25	120; первый просмотр - через 24-48
Пластины Staph Express Count System (стафилококки)	37±1°С	24±2
Диски Staph Express Count System (стафилококки)	37±1°С	2-3

5.3. Во время инкубации дисков Staph Express следует регулярно проверять окрашивание вокруг колоний, и, если вокруг всех колоний появилось розовое окрашивание, то инкубацию можно прекратить, если нет - ее следует продолжить, но не более трех часов.

6. Обработка и подсчет результатов

6.1. Если нет возможности проведения подсчета колоний сразу после окончания инкубации, пластины можно сложить и хранить в морозильной камере холодильника при температуре не ниже -15°C в течение недели.

При необходимости любые колонии микроорганизмов, выросшие на пластинах, могут быть изолированы для дальнейшей идентификации. Для этого следует поднять верхнюю защитную пленку пластины и микробиологической петлей снять колонию с геля для дальнейшего пересева; из колоний можно также готовить мазки.

6.2. Для подсчета результатов проводят учет колоний, окрашенных в соответствии со спецификой типов пластин и индикаторов.

6.2.1 Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

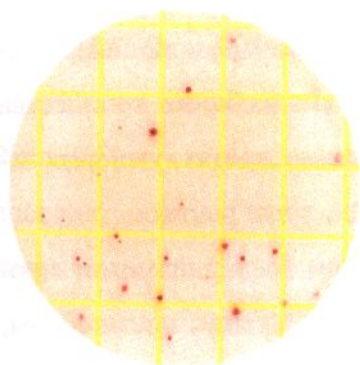
После инкубации пластин 3М Petrifilm Aerobic Count Plate (AC) проводят подсчет всех красных колоний, независимо от их размера и интенсивности окраски (рис. 3, а).

При высоких концентрациях колоний - более 150 на одной пластине - подсчет ведут в одном или нескольких квадратах (площадь одного квадрата равна 1 см^2) и вычисляют среднее значение. Затем среднее число колоний в одном квадрате умножают на 20, т.к. общая площадь зоны роста для пластин этого типа составляет около 20 см^2 (рис. 3, б).

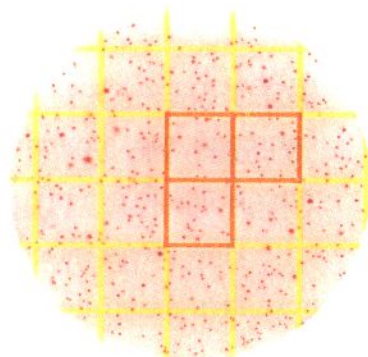
Пластины не подлежат подсчету в случаях:

- наличия очень большого количества колоний (свыше 250);
- окрашивания пластины в светло-розовый цвет;
- неравномерного распределения колоний – их отсутствия в центре зоны роста и большого количества по краям зоны.

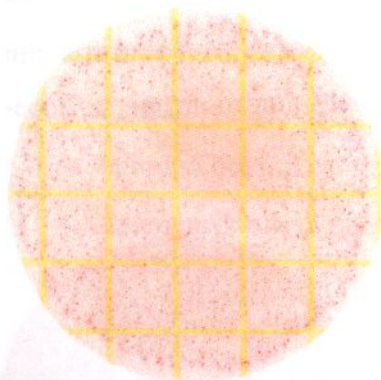
В подобных случаях для получения результатов необходимо увеличить степень разведения исходного раствора и повторить посеvy.



a



б



в

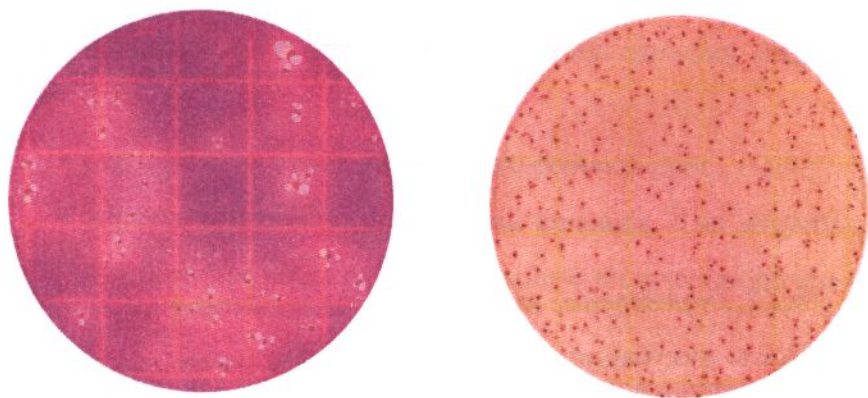
Рис. 3. Примеры подсчетов результатов определения общего микробного числа: а) подсчитывают все колонии; б) подсчитывают количество колоний в двух или трех квадратах; в) пластина не подлежит подсчету (слишком большое количество колоний по краям)

6.2.2. Определение количества энтеробактерий

После инкубации пластин Petrifilm 3M Enterobacteriaceae Count Plate (EB) учитывают все красные колонии (рис. 4, *a*), в том числе с пузырьками газа или окруженные желтой зоной (на расстоянии, не превышающем диаметр одной колонии). Колонии, находящиеся за пределами круга с питательной средой, учету не подлежат.

При высоких концентрациях (более 100 колоний), подсчет ведут так же, как и при определении общего количества бактерий, т.е. в одном или нескольких квадратах, умножая затем среднюю величину на 20 - площадь зоны роста .

При очень высокой концентрации бактерий может происходить заметное осветление или пожелтение цвета среды, свидетельствующее о недостаточности количества питательных веществ для обеспечения роста всех колоний данного образца (рис 4, б). В этом случае необходимо увеличение степени разведения исходного образца и проведение повторных посевов.



а

б

Рис. 4. Примеры подсчетов результатов определения энтеробактерий:
а) учитывают все колонии; б) пластина подсчету не подлежит
(изменился цвет среды)

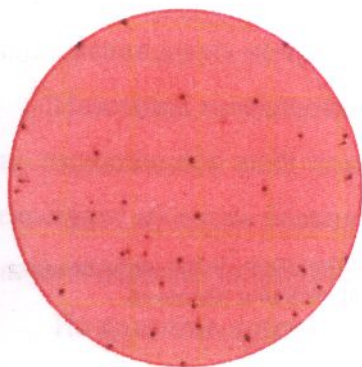
6.2.3. Определение количества колиформных бактерий

После инкубации пластин Petrifilm 3M Coliform Count Plate (CC) для определения количества колиформных бактерий проводят подсчет всех обычных колоний красного и синего цвета, а так же газообразующих колоний (рис. 5, а).

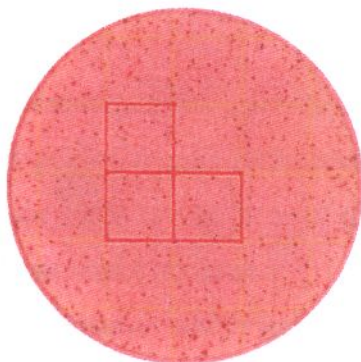
Большое количество колоний (более 100, рис. 5, б) подсчитывают так же как в пп. 6.2.1 и 6.2.2.

Пластины не подлежат подсчету в случаях:

- наличия большого количества (более 150) мелких колоний;
- наличия большого количества мелких пузырьков газа;
- изменений цвета среды.



а



б

Рис. 5 Примеры подсчетов результатов определения колиформных бактерий: а) учитывают все колонии; б) следует подсчитывать колонии в двух или трех квадратах

6.2.4. Определение количества дрожжей и плесневых грибов

После инкубации пластин Petrifilm 3M Yeast and Mold Count Plate (YM) учитывают количество дрожжей и плесневых грибов.

Колонии дрожжей на пластинах имеют небольшие размеры, четкий контур, равномерное окрашивание. Цвет от бежево-розового до сине-зеленого.

Колонии плесневых грибов - большего размера и более диффузны, чем колонии дрожжей. Они могут быть окрашены в голубой цвет, но могут иметь и свой естественный цвет, а именно черный, желтый, зеленый и т.д. (рис. 6).

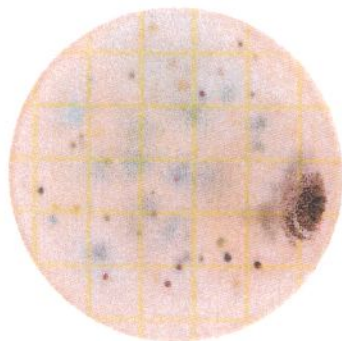


Рис. 6. Различные типы окрашивания колоний дрожжей и плесеней

При высокой концентрации колоний микроорганизмов, так же как в пп. 6.2.1 – 6.2.4 учет проводят в одном или нескольких квадратах. Найденное для одного квадрата среднее

значение, умножают на 30, так как площадь зоны роста для пластин этого типа составляет 30 см².

Большое количество колоний дрожжей может вызвать окрашивание всей области роста в голубой цвет, а большое количество плесневых грибов – в голубой, черный, желтый и другие цвета. В этом случае необходимо увеличить степень разведения исходного образца и провести повторные посеvy.

6.2.5. Определение стафилококков

Тест считается завершенным, если после инкубации на пластине Staph Express наблюдаются только красно - фиолетовые колонии. Они указывают на присутствие *St. aureus*. Подсчет ведется так же как и в пп. 6.2.1-6.2.4. В этом случае использование диска не требуется.

Пластины признаются не подлежащими подсчету в случае окрашивания всей пластины в розовый цвет, что свидетельствует об очень большом количестве колоний. В этом случае необходимы дополнительные разведения образца.

На пластине помимо красно-фиолетовых могут находиться колонии иного цвета (черные или сине-зеленые). Колонии черного цвета соответствуют ослабленным колониям *St. aureus*, сине-зеленые колонии не являются *St. aureus* (рис. 7). В этом случае, для получения более точного результата следует

использовать диск Staph Express. Посев на диск производится в соответствии с п. 4.5.

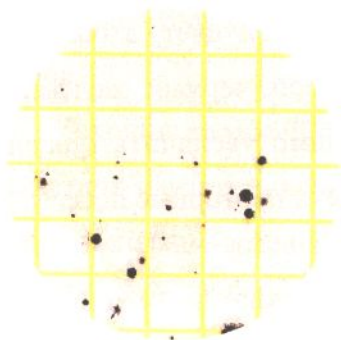


Рис. 7. Колонии *St. aureus* окрашены в черный цвет

Подсчет результатов на диске:

на диске проводится учет всех розовых зон как окружающих колонии, так и не имеющих колоний в центре. Как правило, розовые зоны указывают на присутствие *St. aureus*, но могут так же окрашивать колонии *St. hyicus* и *St. intermedius*. Колонии, не имеющие розовых зон, не являются колониями *St. aureus*.

В случае равномерного розового окрашивания всего диска он признается не подлежащим подсчету (вследствие высокой обсемененности), и для получения результата требуется дополнительное разведение образца.

6.3. Расчеты

Для подсчета результатов проводят учет колоний, окрашенных в соответствии со спецификой типов пластин и индикаторов. Полученные ответы выражают в виде числа КОЕ /г.

При отсутствии предварительных разведений результаты анализа вычисляют по формуле:

$$\text{КОЕ/г} = 10 \times K, \quad (1)$$

где 10 - первое десятикратное разведение образца при приготовлении исходного раствора (п.2.3); K - количество колоний, выросших на пластине после ее инкубации;

В случае проведения предварительных разведений результаты анализов вычисляют по формуле:

$$\text{КОЕ/г} = K \times N, \quad (2)$$

где K - количество колоний, выросших на пластине после ее инкубации; N - степень разведения.

Если посев образца проводился после разведений, а подсчет колоний по нескольким квадратам, формула расчета выглядит следующим образом:

$$\text{КОЕ/г} = K_{\text{ср.}} \times S \times N, \quad (3)$$

где $K_{\text{ср.}}$ - среднее значение количества колоний, рассчитанное по нескольким квадратам; S - площадь зоны роста на пластине; N - степень разведения.

Полученные результаты округляют (в соответствии с ГОСТ 26670-91):

- до числа, кратного 5, если число колоний менее 100;
- до числа, кратного 10, если число колоний более 100 и не оканчивается цифрой 5;
- до числа, кратного 20, если число колоний более 100 и оканчивается цифрой 5.

Примеры расчетов

Пример № 1

Посев на пластину для подсчета колиформных бактерий был проведен без предварительного разведения. После инкубации на пластине обнаружено 25 колоний. В этом случае, рассчитанное по формуле (1) количество колиформных бактерий в 1 г исследуемого образца будет равно: $10 \times 25 = 250$ КОЕ/г.

Пример № 2

Посев на пластину для подсчета энтеробактерий был проведен после двукратного (1:100) предварительного разведения. После инкубации на пластине обнаружены многочисленные колонии, подсчет которых затруднен из-за их большого числа. При этом цвет среды не изменен, а колонии распределены равномерно по всей зоне роста. В этом случае прово-

дят подсчет колоний в одном или нескольких квадратах. Полученную среднюю величину умножают на количество квадратов, которое для данного типа пластин равно 20, затем умножают на величину, обратную степени разведения, и получают количество энтеробактерий, присутствующих в 1 г исследуемого образца.

Например, количество колоний в первом квадрате составляет 25, во втором – 29, в третьем – 31. В этом случае в соответствии с формулой (3), находим среднюю величину, равную 28,3 умножаем на 20 (площадь зоны роста) и на 10^2 (разведение 1:100 или 10^{-2}), в результате получаем 56600. Это число после округления будет составлять 57000 КОЕ/г или $5,7 \times 10^4$ (табл. 2).

Таблица 2

Образец записи результатов микробиологического анализа комбикормов (КОЕ/г комбикорма)

Дата	Наименование образца	Группы микроорганизмов			
		КМАФАнМ*	Энтеробактерии	Колиформы	Грибы и дрожжи
01.01.06	Комбикорм для форели	$1,2 \times 10^6$	$5,7 \times 10^4$	250	-

* общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н.
2002. Влияние бактериальной обсемененности кормов на рост и физиологическое состояние молоди стерляди // Труды ВНИРО, Т. 141. С. 194-207.

Бурлаченко И.В., Аветисов К.Б., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н.
2002. Влияние бактериальной обсемененности кормов на физиологическое состояние молоди рыб // Материалы Международной научно-практической конференции «Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития» М.: Изд-во ВНИРО. С. 245-253.

Войнова Н.В. 1991. Кандидомикоз и смешанная инфекция, вызванная грибами р.*Candida* и бактериями р. *Bacillus*, карповых рыб в рыбоводных хозяйствах Ростовской области // Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. М.: 25с.

Жезмер В.Ю., Ляшенко Е.В., Кутинцева Н.В., Галдина Е.А. 1991. Протейная инфекция в установках с оборотным водообеспечением // Рыбное хозяйство. № 11. 1991.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Нормативные ссылки	6
Аппаратура и материалы	6
Принцип метода	10
Описание пластин Petrifilm 3М	12
Ход анализа	16
1. Отбор проб	16
2. Подготовка проб к испытанию	17
3. Подготовка пластин Petrifilm 3М	19
4. Проведение испытаний	19
5. Инкубация посевов	22
6. Обработка и подсчет результатов	23
Примеры расчетов	32
Список использованной литературы	34

АКВАКУЛЬТУРА

Выпуск 3

Бурлаченко *Ирина Виленовна*

Руководство

**по применению микробиологических тестов
Petrifilm 3M для характеристики рыбных кормов**

Подписано в печать 15.03.2007 г.

Печ. л. 2,25. Формат 60x84 1/16.

Тираж 50. Заказ № 150.

Издательство ВНИРО

107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел. (495) 264-65-33

Факс: (495) 264-91-87

