

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН

Государственный научный центр

прикладной микробиологии и биотехнологии

_____ И.А. Дятлов

« ____ » _____ 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

**«Питательной среды для определения и подсчета
молочнокислых стрептококков сухой (Агар М 17)»**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Питательная среда для определения и подсчета молочнокислых стрептококков сухая (Агар М 17)» предназначена для культивирования и подсчета молочнокислых стрептококков в йогуртах и в других молочнокислых продуктах, содержащих *Streptococcus thermophilus*.

Область применения среды – бактериологическое исследование продуктов питания (подсчет количества молочнокислых стрептококков в йогуртах и других молочнокислых продуктах, содержащих *Streptococcus thermophilus*, производство заквасок для кисломолочных продуктов и сыра).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

Агар М 17 представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный порошок светло-желтого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов.

Агар М 17 расфасован по 250 г или по 100 г в полиэтиленовые банки.

2.1. Принцип действия

Совокупность компонентов, входящих в состав среды М 17, обеспечивает питательные потребности *Streptococcus thermophilus*. Ферментативные гидролизаты казеина, рыбной муки, дрожжевой экстракт служат источником азотистых питательных веществ, витаминов группы В, микроэлементов и других веществ, необходимых для роста *Streptococcus thermophilus*. Глицерофосфат натрия, входящий в состав среды, обеспечивает высокую буферную емкость среды, что позволяет поддерживать рН среды выше 5,7 при активном росте *Streptococcus thermophilus*. Рост *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* при таких значениях рН среды и условиях культивирования подавляется.

2.2. Состав

Агар М 17 представляет собой смесь сухих компонентов из расчета, г/л:

Панкреатический гидролизат казеина сухой	10,0
Панкреатический гидролизат рыбной муки Ф сухой	5,0
Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей	5,0
Дрожжевой экстракт	2,5
Кислота аскорбиновая	0,5
Магний сернокислый 7-водный	0,25
Натрий глицерофосфат 5-водный	5,0
Сахар молочный (лактоза)	5,0
Агар бактериологический	10,0±2,0

рН от 6,9 до 7,3

Определение рН проводят потенциометрическим методом с применением стеклянного электрода в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» в экстракте, приготовленном путем добавления к 2,00 г сухого агара М 17 100 мл дистиллированной воды, настаивания с периодическим перемешиванием в течение 1 ч при температуре 18 - 25 °С и последующего фильтрования через бумажный фильтр.

Величина рН, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению рН готовой среды и может незначительно меняться после стерилизации. Пределы значения рН, указанные выше, учитывают отклонения рН после стерилизации среды.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность. Агар М 17 обеспечивает визуально обнаруживаемый рост тест-штамма *Streptococcus thermophilus* ATCC 14450 во всех засеянных пробирках и чашках Петри при посеве по 1,0 мл микробной взвеси тест-штамма в каждую пробирку и чашку Петри со средой методом глубинного посева из разведений 10^{-6} (1×10^3 кл/мл) и 10^{-7} (1×10^2 кл/мл) не позднее 48 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С в аэробных условиях в виде «дисков» или «гречишных зерен», а на поверхности агара в виде мелких круглых белесых колоний.

Рост тест-штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 при посеве по 1,0 мл микробной взвеси тест-штамма в каждую пробирку и чашку Петри со средой «Агар М 17» по 1,0 мл микробной взвеси тест-штамма методом глубинного посева из разведений 10^{-6} (1×10^3 кл/мл) и 10^{-7} (1×10^2 кл/мл) через 72 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) °С в аэробных условиях отсутствует.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При анализе исследуемого материала необходимо соблюдение СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат, обеспечивающий температуру 37 °С;
- Весы лабораторные 2 класса точности;
- Автоклав;
- Пипетки стеклянные позволяющие отбирать объемы жидкости 1 мл, 2 мл, 5 мл;
- Пипетки стеклянные, объемы жидкости 1 и 2 мл;
- Цилиндр стеклянный мерный вместимостью 1000 мл;
- Пробирки стеклянные;
- Вода дистиллированная;
- Колбы;
- Флаконы объемом 250 и 450 мл;
- Воронки стеклянные.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Кисломолочные продукты, содержащие в своем составе *Streptococcus thermophilus*, (йогурт, ряженка, и др.), закваски для кисломолочных продуктов и сыра и другие тестируемые материалы, содержащие термофильные стрептококки.

Взятие, посев исследуемого материала проводят в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 27205-2013 «Продукты кисломолочные. Бактериальные заквасочные культуры. Стандарт идентичности». ГОСТ ISO 29981-2013 «Подсчет характерных микроорганизмов, Методика подсчета колоний микроорганизмов после инкубации при температуре 37° С», ГОСТ ISO 6887-1 2017 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований».

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследование проводят в условиях санитарно-бактериологической лаборатории медицинскими специалистами.

7.1. Приготовление среды Агар М 17.

Навеску среды, указанную на этикетке для конкретной серии среды, тщательно размешивают в 1,0 л воды дистиллированной, кипятят в течение 1-2 мин, периодически перемешивая, до полного расплавления агара, разливают по 9,0 мл в пробирки, по 200 мл в

колбы или флаконы, закрывают пробками и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин. Готовая питательная среда прозрачная светло-желтого цвета.

Готовую среду можно использовать в течение 7 суток после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С.

Готовую среду можно использовать в течение 7 суток после её приготовления при условии хранения при температуре 2-8 °С. При использовании хранившейся готовой среды ее необходимо расплавить на водяной бане, при необходимости разлить в стерильные пробирки или использовать при глубинном посеве в чашки Петри. Перед посевом охладить до температуры 50-45°С.

7.2. Исследуемый материал, подготовленный согласно соответствующим документам по п. 6, засевают в пробирки или чашки Петри методом глубинного посева. Инкубируют в аэробных условиях в течение 48-72 часов при температуре 37°С.

При посеве в пробирки по 1 мл образца или его десятикратного разведения вносят в пробирку со стерильным Агаром М 17, охлажденным до 50 - 45° С, погружая пипетку до дна пробирки и медленно поднимая вращательными движениями до поверхности среды без принудительного выдувания посевного материала, равномерно распределяя его в среде.

При посеве в чашки Петри 1 мл образца или его десятикратного разведения вносят в пустую стерильную чашку Петри и осторожно смешивают с 15 – 20 мл стерильной среды Агар М 17, охлажденной до 45-50 °С, не допуская попадания пузырьков воздуха в среду. Сразу после застывания агара чашки переворачивают вверх дном и инкубируют в аэробных условиях в течение 48-72 часов при температуре 37°С.

8. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов проводят через 48 – 72 ч инкубации посевов, визуально определяя наличие и характер роста. Просматривают посевы через каждые сутки. Подсчету подлежат типичные для *Streptococcus thermophilus* колонии.

При посеве образца, содержащего *Streptococcus thermophilus* (термофильный стрептококк) и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (болгарская палочка) на среду Агар М 17 рост термофильного стрептококка наблюдается в толще агарового столбика или пластины в виде «дисков» или «гречишных зерен», на поверхности агара в виде круглых мелких колонии белесого цвета. Рост *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* на среде Агар М 17 подавляется.

9. УТИЛИЗАЦИЯ

Серии Агара М 17, пришедшие в негодность (нарушение целостности упаковки), а также в связи с истекшим сроком годности, утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «А» - эпидемиологически безопасные

отходы, любым способом, предотвращающим повторное использование, например, сжиганием.

Уничтожение Агара М 17 после проведения биологического контроля осуществляется по СанПиН 2.1.7.2790-10 как отходы, принадлежащие к классу «Б» с обязательным предварительным обезвреживанием путем автоклавирования в течение 2 ч при температуре (126 ± 1) °С.

Обращение с отходами следует выполнять согласно схеме, принятой в конкретной организации. Данная схема разрабатывается в соответствии с требованиями вышеуказанных санитарных правил и утверждается руководителем организации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Агар М 17 необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С и относительной влажности не более 60 %. После вскрытия банку со средой хранят до истечения срока годности плотно закрытой, в сухом месте при температуре от 2 до 30 °С, избегая попадания влаги.

Агар М 17 транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре хранения, допускается транспортирование при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Срок годности: 2 года. Среда с истекшим сроком годности и в поврежденной упаковке использованию не подлежит.

Изготовитель гарантирует соответствие Агара М 17 заявленным в ТУ 21.20.23-275-78095326-2017 требованиям и функциональным характеристикам с начала использования в течение всего срока годности и при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По всем вопросам, касающимся качества «Питательной среды для определения и подсчета молочнокислых стрептококков сухой (Агар М 17)», для получения консультации обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.