

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФБУН «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и
биотехнологии»

_____ И.А. Дятлов

«__» _____ 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению питательной среды для выявления молочнокислых бактерий сухой
(среда Бликфельдта)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Среда Бликфельдта предназначена для выявления молочнокислых микроорганизмов в пищевых продуктах и кормах для животных (модификация 1 и модификация 2) и их подсчёта (модификация 2), а так же для выяснения причин возникновения порчи пищевых продуктов и испытания проб окружающей среды, отобранных из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

Область применения – санитарная микробиология.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Среда Бликфельдта представляет собой мелкодисперсный порошок зеленовато-серого цвета, который получают смешиванием сухих компонентов. Порошок гигроскопичен, светочувствителен. Выпускают в двух модификациях.

3. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Совокупность компонентов, входящих в состав питательной среды, обеспечивает выявление и рост молочнокислых микроорганизмов. В состав питательной среды входит кислотнo-основной индикатор бромкрезоловый пурпуровый водорастворимый, который обеспечивает изменение окраски среды с пурпурного на желтый при снижении значения рН в процессе роста молочнокислых микроорганизмов.

4. СОСТАВ

Состав, г/л*:

	Модификация 1	Модификация 2
– Панкреатический гидролизат казеина сухой-ТВ (ПГК-ТВ) по ТУ 10.51.56-276-78095326-2017	5,5	5,5
– Дрожжевой экстракт (Bio Springer 0251/0-PW-L, (тип D) Франция)	4,0	4,0
– Лактоза Фарма 200/15 по Европейской Фармакопее	10,0	10,0
– Глюкоза безводная фармацевтическая, FCC IV.....	10,0	10,0
– Натрий углекислый по ГОСТ 83-79	(0,1± 0,05)	(0,1±0,05)
– Бромкрезоловый пурпуровый водорастворимый по ТУ 6-09-2425-77	0,025	0,025
– Агар бактериологический (Pronadisa, Испания, кат. №1814)		0,9

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность (чувствительность среды, скорость роста, стабильность основных биологических свойств микроорганизмов).

Питательная среда модификации 1, приготовленная по п. 9.1 настоящей инструкции, не позднее 48 ч инкубации при температуре (37±1) °С обеспечивает рост следующих контрольных тест-штаммов:

Lactobacillus plantarum 8P-A3 в виде равномерного помутнения среды и изменения цвета с пурпурного на желтый, образования осадка;

Streptococcus thermophilus СТ-1 в виде изменения цвета среды с пурпурного на желтый при сохранении прозрачности среды, наличия взвешенных частиц по всему объёму среды и образования осадка.

Питательная среда модификации 2, приготовленная по п. 9.1 настоящей инструкции, не позднее 48 ч инкубации при температуре (37±1) °С обеспечивает рост следующих контрольных тест-штаммов:

L. plantarum 8P-A3 в виде отдельных колоний в форме тяжей по всему объёму среды с прозоной в верхней части;

S. thermophilus СТ-1 в виде отдельных колоний звездчатой формы по всему объёму среды с прозоной в верхней части.

Вокруг колоний тест-штаммов должно происходить диффузное изменение цвета

среды с пурпурного на желтый, возможно выделение газа.

6.МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2 Б (Приказ МЗРФ №4н от 06.06.2012 г).

При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Не использовать питательную среду по истечении срока годности.

Неиспользованную питательную среду с истёкшим сроком годности утилизируются любым методом, предотвращающим повторное использование по назначению.

7.ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- весы лабораторные 2 класса точности
- автоклав;
- пробирки стеклянные;
- пипетки стеклянные или механические, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5 мл;
- вода дистиллированная, стерильная;
- колбы стеклянные, объёмом не менее 1 л;
- термостат, обеспечивающий температуру (37±1) °С

8.АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Основным биологическим материалом для исследования служат пищевые продукты, корма для животных, смывы из зоны производства и переработки пищевых продуктов.

Питательную среду можно использовать также при работе с чистыми культурами молочнокислых микроорганизмов.

9.ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования образцов проводят в соответствии с рекомендациями, изложенными в ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые».

9.1. Подготовка к анализу

Приготовление питательной среды. Навеску среды Бликфельда в количестве,

указанном на этикетке для приготовления конкретной серии, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин, разливают по 9,0 мл в стеклянные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 112 °С в течение 20 мин.

Готовая питательная среда пурпурного цвета. Готовую среду можно использовать в течение 7-10 дней при условии хранения её при температуре от 2 до 8 °С.

9.2. Посев и инкубация.

Навеску для посева отбирают весовым или объемным методом непосредственно после вскрытия пробы продукта. Вскрытие проводят в условиях, исключающих загрязнение продукта микроорганизмами, в непосредственной близости от пламени горелки стерильными инструментами.

Навеску продукта отбирают так, чтобы в ней были представлены все его компоненты и в том же соотношении, что и в анализируемой пробе.

Для приготовления разведений навески продукта используют пептонно-солевой раствор.

Допускается исходные разведения продуктов с массовой долей хлорида натрия более 5% готовить с использованием пептонной воды, исходные разведения мясных, рыбных и молочных продуктов – с использованием 0,9 % раствора хлорида натрия.

Масса (объем) навески продукта, предназначенной для приготовления исходного разведения или гомогената, должна составлять не менее $(10 \pm 0,1)$ г/см³

Соотношение между массой (объемом) навески продукта и объемом пептонно-солевого раствора для исходного и последующих разведений составляет:

1:9 - для 10-кратного разведения (для продуктов, содержащих большое количество жира без поверхностно-активных веществ 1:10);

1:5 - для 6-кратного разведения;

1:3 - для 4-кратного разведения;

1:1 - для 2-кратного разведения.

При необходимости разведения навески продуктов, содержащих большое количество жира, допускается использовать поверхностно-активные вещества (двууглекислый натрий и др.), не обладающие антимикробной активностью.

Для приготовления разведения навески продуктов с высоким осмотическим давлением допускается использовать пептонную или дистиллированную воду.

При определении микробного загрязнения поверхности проводят смывы с помощью ватных тампонов.

Стерильный ватный тампон смачивают пептонно-солевым раствором и протирают им в разных местах поверхность различных кусков анализируемого продукта или внешних объектов окружающей среды общей площадью 100 см³.

Тампон помещают в пробирку, содержащую 10 см³ пептонно-солевого раствора. Содержимое пробирки тщательно перемешивают при помощи пипетки. Полученную суспензию считают исходным разведением.

Посев анализируемых образцов производят сразу же после приготовления исходных суспензий. При необходимости делают последующие десятикратные разведения в

9.3. Учёт результатов.

Учёт результатов проводят визуально по наличию характерных колоний (модификация 2) и изменению цвета среды с пурпурного на желтый (модификация 1 и модификация 2) через 24-72 ч инкубации.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Среду Бликфельдта транспортируют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 30 °С, допускается транспортировать при температуре от минус 18 до плюс 40 °С не более 7 суток.

Среду Бликфельдта хранят в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 30 °С. 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.

Срок годности – 2 года.

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

По вопросам, касающимся качества питательной среды для выявления молочнокислых бактерий сухой (среда Бликфельдта) в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. 8 (4967) 36-00-17.