

Для корреспонденции

Соколов Михаил Сергеевич – доктор биологических наук, профессор, научный консультант ООО «Лаб-БиоМед»
Адрес: 117105, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 19А
Телефон: (495) 225-52-32

Д.М. Соколов, И.В. Кашинцев, М.С. Соколов

Петрифильмы – современные тесты для микробиологического контроля пищевых продуктов, сырья и объектов среды обитания

ООО «Лаб-БиоМед», Москва
«Lab-BioMed», Moscow

Petrifilm – up-to-date tests for microbiological control of food products, raw materials and environmental objects

D.M. Sokolov, I.V. Kashintsev,
M.S. Sokolov

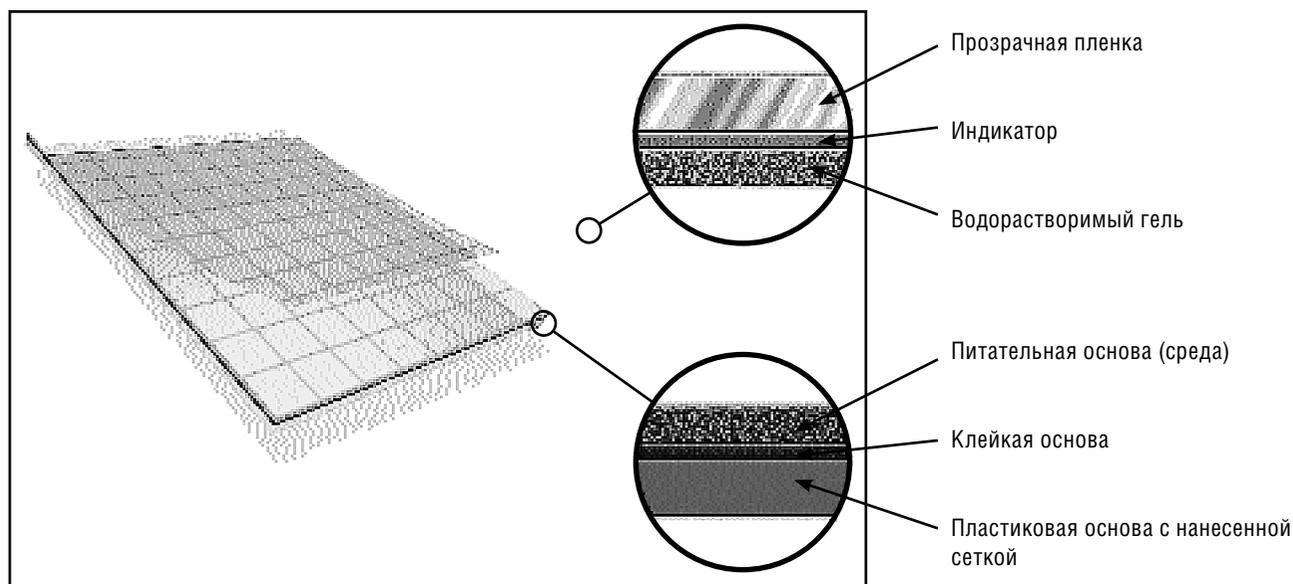
The principle of action, advantages and different types of Petrifilm as alternative test to the classical microbiological analysis are considered. Petrifilm is up-to-date high technology test systems for the rapid quantitative microbiological control in foodstuff of sanitary-significant and pathogenic microorganisms – yeast and moulds, coliforms, Enterobacteriaceae, Staphylococcus, Listeria spp. and Lactobacilli spp. Automatic testing of colonies on Petrifilm with use of the Petrifilm-Reader allows to reduce time for colony counting, to exclude errors of personnel and to document results of the analysis.

Key words: *petrifilms, pathogens, coliforms, Enterobacteriaceae, Listeria, Staphylococcus, Petrifilm-Reader, foodstuff, feeding stuffs*

Рассмотрены принцип действия, характеристики, преимущества и типы петрифильмов как дополнение и/или альтернатива классическому микробиологическому анализу. Петрифильмы – современные наукоемкие тест-системы для ускоренного количественного микробиологического контроля в продуктах питания и объектах среды обитания различных групп патогенных и условно-патогенных микроорганизмов – дрожжей, плесневых грибов, БГКП, энтеробактерий, стафилококков, листерий и молочнокислых бактерий. Автотестирование выросших на петрифильмах колоний с использованием Петрифильм-Ридер позволяет проводить их ускоренный автоматический учет, исключить ошибки персонала и документировать результаты анализа.

Ключевые слова: *петрифильмы, патогенные микроорганизмы, БГКП, колиформы, энтеробактерии, листерии, стафилококки, Петрифильм-Ридер, продукты питания, корма*

До последнего времени большинство бактериологических лабораторий России проводят количественное определение санитарно-показательных микроорганизмов в пищевых продуктах, сырье, технологическом оборудовании, объектах среды обитания по классической схеме (с использованием питательных сред в чашках Петри). Основные недостатки традиционного метода – его высокая трудоемкость и длительность проведения, а также зависимость качества приготовленных сред от квалификации персонала. Традиционный метод трудно реализуем в недорогих компактных производственных микробиологических лабораториях, а также в мобильных мини-лабораториях, предназначенных для контроля различных продуктов и объектов в местах производства. Отмеченных недостатков лишены принципиально новые тесты – петрифильмы, которые в последнее время стали применяться в разных странах (главным



Мультислойное устройство петрифильма

образом в США, Канаде, странах ЕС, Японии и др.) для проведения ускоренного микробиологического контроля указанных выше объектов.

Петрифильмы («3М Petrifilm»: *Petri* – от чашки Петри, *film* – пленка) представляют тест-пластины с питательной средой. В 1995 г. они были запатентованы в США [14] и в настоящее время производятся американской компанией 3М [13]. Петрифильмы в основном используются для оценки качества и безопасности пищевых продуктов, санитарно-гигиенического контроля пищевого производства, объектов технологической и окружающей среды, в том числе по системе HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points – анализа рисков по критическим контрольным точкам) путем быстрого количественного определения различных групп микроорганизмов.

Петрифильм имеет мультислойную структуру (см. рисунок). Он состоит из подложки и покрывающей ее прозрачной пленки. Тест содержит питательную среду, водорастворимый гель, хромогенные субстраты (позволяющие выявить специфические биохимические ингредиенты) и индикаторы, которые окрашивают колонии микроорганизмов в характерный цвет. При посеве анализируемой пробы в комнатной температуре гель желируется и растворяется. Через несколько минут он затвердевает. На поверхность петрифильма нанесена сетка (1 квадрат = 1 см²), облегчающая визуальный подсчет количества колоний. Петрифильм сохраняет стерильность благодаря внешней пленке. Питательная среда петрифильма доступна микроорганизмам только после добавления образца (увлажнения подложки). В отсутствие увлажнения петрифильм не активен; в стандартной упаковке он может храниться в холодильнике (при 2–8° С) до 1,5 лет.

В настоящее время для санитарно-гигиенического контроля различных продуктов и объектов предлагается использовать более 10 типов петрифильмов, сертифицированных авторитетными международными организациями (табл. 1). Контроль их качества осуществляется производителем в строгом соответствии со стандартом ИСО 11133, регламентирующим качественные и количественные показатели питательных сред для микробиологических исследований [5].

Согласно [12], все пищевые продукты, пищевое сырье, питьевая вода [3, 6, 11], а также корма [7] и объекты производственной среды (включая воздух рабочих помещений) [10] подлежат нормированию по микробиологическим показателям.

Объектами гигиенического нормирования являются следующие группы микроорганизмов.

- санитарно-показательные – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечных палочек (БГКП), бактерии семейства *Enterobacter* (энтеробактерии);
- условно-патогенные – *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Proteus*, *Bacillus cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*;
- патогенные – *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, бактерии рода *Yersinia*;
- микроорганизмы порчи – дрожжи и плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы.

Согласно данным табл. 1, большинство этих микробных групп можно контролировать в различных объектах с помощью петрифильмов. Соответствующие протоколы по их применению были введены Минздравом России в 2004 г. [8, 9]. Для использования рекомендованы 6 типов петрифильмов (АС, УМ,

Таблица 1. Определение микроорганизмов на петрифилмах

Микроорганизмы	Тип петрифилма	Время инкубации, ч
КМАФАнМ	3М Petrifilm «Petrifilm Aerobic Count Plate» (AC) ^{1, 2, 3}	48
Дрожжи и плесневые грибы	3М Petrifilm «Yeast and Mould Count Plate» (YM) ^{2, 3}	72–120
БГКП	3М Petrifilm «Coliform Count Plate» (CC) ^{1, 2, 3}	24
	3М Petrifilm «E. coli / Coliform Count Plate» (EC) ^{2, 3}	24–48
	3М Petrifilm «Series 2000 Rapid Coliform Count Plate» (RCC)	6–24
	3М Petrifilm «High-Sensitivity Coliform Count Plate» (HSCC) ^{1, 2}	24
<i>Escherichia coli</i>	3М Petrifilm «Select E. coli Count Plate» (SEC) ^{1, 3}	24
	3М Petrifilm «E. coli/Coliform Count Plate» (EC) ^{2, 3}	24–48
Бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	3М Petrifilm «Enterobacteriaceae Count Plate» (EB) ^{1, 2, 3}	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	3М Petrifilm «Staph Express Count Plate + Staph Express Disk» (STX) ^{1, 2, 3}	24
Листерии	3М Petrifilm «Environmental Listeria Plate» (EL) ²	28
Молочнокислые бактерии (МКБ)	3М Petrifilm «Petrifilm Aerobic Count Plate» (AC) + MRS broth	48

Примечание. ¹ – Association Francaise de Normalisation (Французская ассоциация по стандартизации); ² – International Official Method of Analysis (Международная организация по официальным методам анализа); ³ – Nordis System for Validation of Alternative Microbiological Methods (Организация северных стран Европы по аккредитации альтернативных микробиологических методов исследования) [13].

СС, ЕС, RCC и HSCC), предназначенные для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), дрожжей и плесневых грибов, колиформных бактерий (БГКП) и *E. coli* в образцах пищевых продуктов, объектах технологической и окружающей среды [8, 9]. В последние годы для практического использования предложены еще 4 типа петрифилмов: SEC, EB, STX, EL [13]. С их помощью осуществляется селективный анализ *E. coli*, энтеробактерий, листерий и *Staphylococcus aureus*.

Выявление и определение количества микроорганизмов на петрифилмах основано на высеве навески исследуемого образца (или его разведения), инкубировании посева (в аэробных условиях или в анаэробном состоянии) и подсчете количества выросших, характерно окрашенных колоний с образованием газа или без него.

Целевые микроорганизмы на петрифилмах (табл. 2) идентифицируют по трем важнейшим признакам: цвету колоний, наличию газообразования и специфической окраске зоны роста. Содержащийся в подложке хромогенный субстрат позволяет выявить характерную ферментативную активность анализируемых бактерий (фосфатазную, β-глюкуронидазную, термонуклеазную и др.) по характерной окраске их колоний. Для энтеробактерий, колиформных и некоторых молочнокислых бактерий дополнительным идентифицирующим признаком является газообразование. Характерная окраска зоны роста ряда бактериальных колоний, связанная с изменением кислотности среды, регистрируется рН-индикатором [13].

При необходимости колонии микроорганизмов можно изолировать для дальнейшей идентификации согласно ГОСТ Р 52816 и ГОСТ 30726 [2,4]. Для

этого необходимо поднять верхнюю пленку петрифилма, извлечь колонию из геля, пересеять ее на другую среду или микроскопировать.

Петрифилмы, предназначенные для выявления и количественного учета микроорганизмов в воздухе, подвергают процедуре активирования. С этой целью к петрифилму добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды, и через 1 ч он готов к использованию. Время контроля воздуха при применении активированных петрифилмов – в пределах 15 мин. После завершения экспонирования верхнюю пленку опускают на подложку, и петрифилм инкубируют в термостате согласно регламенту [8, 9, 13, 15]. Для контроля методом отпечатков технологических поверхностей (а также рук оператора) активированный петрифилм раскрывают и прикладывают к тестируемой поверхности. После этого верхнюю и нижнюю пленки петрифилма соединяют, и посев инкубируют в термостате в соответствии с регламентом [8, 9, 13].

Микробиологический контроль воды с помощью петрифилмов осуществляют следующим образом: при определении общего микробного числа 1 мл анализируемой воды вносят пипеткой в центр петрифилма АС, опускают верхнюю пленку и инкубируют посев в термостате согласно регламенту [8, 9, 13]. При определении общего числа колиформных бактерий в воде методом мембранной фильтрации исследуемую пробу воды концентрируют, пропуская через фильтр диаметром 35, 47 или 50 мм (с диаметром пор 0,45 мкм). К петрифилмам СС, RCC, HSCC, SEC, ЕС добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды, после чего на подложку петрифилма помещают мембранный фильтр. Затем верхнюю пленку петрифилма аккуратно опускают на мем-

Таблица 2. Идентификация колоний санитарно-показательных микроорганизмов на петрифильмах

Микроорганизмы (тип петрифильма)	Выявляемый фермент	Цвет колоний	Газ	Цвет зоны роста
КМАФАНМ (3М Petrifilm AC)	–	Красный	–	–
Дрожжи, плесневые грибы (3М Petrifilm YM)	Фосфатаза	Зеленый	–	–
Колиформные бактерии (3М Petrifilm CC; 3М Petrifilm HSCC)	–	Красный	+	Красный
Колиформные бактерии (3М Petrifilm RCC)	–	Красный	+	Желтый
Колиформные бактерии (3М Petrifilm EC)	–	Красный	+	–
<i>Escherichia coli</i> (3М Petrifilm EC)	β -глюкуронидаза	Синий	+	–
<i>Escherichia coli</i> (3М Petrifilm SEC)	β -глюкуронидаза	Зеленый	+	–
Энтеробактерии (3М Petrifilm EB)	–	Красный	+	Желтый
<i>Staphylococcus aureus</i> (3М Petrifilm STX) + Staph Express Disk	β -глюкопиранозидаза, термонуклеаза	Красно-фиолетовый	–	Розовый
Листерии (3М Petrifilm EL)	α -глюкозидаза	Красно-фиолетовый	–	–
МКБ (3М Petrifilm AC + MRS broth)	–	Красный	±	–

бранный фильтр. После этого посев инкубируют в термостате в соответствии с регламентом [8, 9, 13].

Результаты анализа обрабатывают, подсчитывая количество выросших колоний бактерий, дрожжей и грибов в инкубированных посевах. Подсчет проводят визуально или автоматически, используя Петрифильм-Ридер (3М Petrifilm Plate Reader), который за 4 с регистрирует количество колоний на петрифильме (БГКП, *E. coli* и энтеробактерий). Работой прибора управляют с помощью компьютера, который автоматически сохраняет все полученные данные в табличном редакторе Excel и в графическом формате. Петрифильм-Ридер распознает микроколонии и близкорасположенные колонии бактерий. Важные преимущества автоматического учета на Петрифильм-Ридер – высокая скорость подсчета, исключение случайных ошибок и более корректное сравнение результатов, полученных разными лабораториями и исполнителями. Окончательный результат анализа численности микроорганизмов в исходном образце (с учетом разведения) выдается прибором в КОЕ/см³ (г). Показатель округляют и записывают согласно ГОСТ 26670 [1].

Очевидные преимущества использования петрифильмов по сравнению с классическим методом заключаются в следующем:

- простая процедура посева, при которой микробиолог освобождается от многих громоздких рутинных работ – приготовления питательных сред, их розлива, стерилизации и разогрева, тем самым исключаются случайные ошибки из-за разной квалификации персонала, отпадает необходимость утилизации неиспользованных или испорченных сред;
- петрифильмы можно использовать в течение более длительного срока (12–18 мес), чем стандартные чашки Петри с готовыми средами; они более

удобны для микробиологического контроля различных объектов, поскольку их масса на порядок легче чашек Петри (с питательными средами);

- споровая микрофлора не мешает подсчету выросших на петрифильме колоний, тогда как при классическом методе исследования учет таких посевов затруднен или даже невозможен;
- при анализе грамотрицательных колиформных бактерий (БГКП – *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* и др.) четким идентификационным биохимическим признаком служит продуцирование пузырьков газа (в процессе ферментации лактозы), которые локализованы вокруг колоний и отсутствуют при росте бактерий на агаризованных средах;
- сокращается время микробиологического анализа минимум в 2 раза (с 3–5 до 1–2 сут): идентификация БГКП (благодаря проявлению газообразования) и *E. coli* (из-за выявления специфической ферментативной активности на хромогенной среде) осуществляется только на этапе первичного посева, что исключает необходимость постановки дополнительных тестов;
- петрифильмы лучше защищают персонал от вредного микробного воздействия: после посева тест запечатывается, тем самым зона роста микроорганизмов строго ограничивается; это исключает контаминацию помещения и оборудования, что особенно важно при работе с плесневыми грибами, споры которых представляют угрозу здоровья персонала и контаминируют оборудование;
- по окончании учета петрифильмы легко утилизировать: для их обеззараживания пригодны автоклавы небольшой вместимости, поскольку общий объем отходов микробиологического анализа минимум в 10 раз меньше, чем при классическом методе;

- анализ микроорганизмов на петрифильмах характеризуется большей чувствительностью (из-за большого объема высеваемой пробы) и воспроизводимостью (из-за отсутствия термического шока при контакте микроорганизмов с нагретой средой и более равномерного распределения клеток при посеве);
- автоматизированная система регистрации и учета колоний при микробиологических исследованиях с использованием Петрифильм-Ридера позволяет проводить ускоренный автоматический учет количества выросших колоний, исключить случайные ошибки персонала и документировать результаты анализа.

Таким образом, петрифильмы – современная, удобная форма готовых питательных сред. Это инновационные тесты, широко используемые в течение двух последних десятилетий за рубежом в пищевой промышленности, санитарно-эпидемиологической и клинической практике. Только в странах ЕС петрифильмы используют свыше 3000 производителей и фирм. Их применение в России для ускоренного количественного определения

санитарно-показательных микроорганизмов – перспективное направление микробиологического контроля в сфере пищевой и санитарной микробиологии. В числе наиболее важных преимуществ петрифильмов – снижение в 1,5–2 раза прямых затрат, связанных с приобретением материалов для микробиологического анализа и сокращением времени исследования.

Вследствие компактности петрифильмы занимают мало места в лаборатории. Для инкубирования посевов на петрифильмах вполне пригодны мини-термостаты. Поэтому в первую очередь петрифильмами могут быть укомплектованы стационарные компактные микробиологические мини-лаборатории. Организация и содержание таких производственных лабораторий потребует значительно меньших затрат за счет уменьшения производственных площадей, обеспечивающих проведение санитарно-бактериологического анализа. Петрифильмы окажутся также востребованными в составе мобильных бактериологических лабораторий, предназначенных для оперативного анализа продуктов питания, сырья, воды, смывов с поверхностей и воздуха помещений.

Литература

1. ГОСТ 26670-91 – Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. Введен 01.01.1993. – М.: Стандартинформ, 2005. – 7 с.
2. ГОСТ 30726-2001 – Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий количества бактерий вида *Escherichia coli*. Введен 01.07.2002. – М.: Стандартинформ, 2006. – 13 с.
3. ГОСТ Р 53426-2005 (ИСО 9308-1:2000). Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий. – М.: Стандартинформ, 2006. – 12 с.
4. ГОСТ Р 52816-2007 – Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). Введен 01.01.2009. Изменен в 2007 г. – М.: Мэсоцразвития РФ. – 20 с.
5. ИСО 11133 – ГОСТ Р ИСО 11133-2-2008. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям культуральных сред (Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2. Practical guidelines on performance testing of culture media). Введен в действие 01.01.2010. – М.: РИСО. – 32 с.
6. Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества». МУ 2.1.4.1184-03/ Минздрав России. – М., 2003. – 63 с.
7. Методические указания по отбору проб пищевой продукции животного и растительного происхождения, кормов, кормовых добавок с целью лабораторного контроля их качества и безопасности (утв. Россельхознадзором 21.05.2009). – М.: Россельхознадзор России, 2009. – 31 с.
8. Методы определения колиформных бактерий, бактерий вида *E. coli* с применением пластин «Petrifilm» производства компании 3М (США). Методические рекомендации № 24 ФЦ/6289. – М.: МЗ РФ, 2006. – 10 с.
9. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, количества дрожжей и плесневых грибов с применением пластин «Petrifilm» 3М «Petrifilm» АС (3М Petrifilm Aerobic Count Plate) и 3М «Petrifilm» УМ (3М Petrifilm Yeast and Mould Count Plate) производства компании 3М (США). Методические рекомендации № 24 ФЦ/6290. – М.: МЗ РФ, 2006. – 11 с.
10. Микробиологический мониторинг производственной среды. МУК 4.2.734-99. МЗ России. – М., 1999. – 16 с.
11. СанПин 2.1.4.1074-01. «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения». – М.: Роспотребнадзор, 2006. – 103 с.
12. СанПиН 2.3.2.1078-01 (с изменениями и дополнениями) «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»: Сборник. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 267 с.
13. 3M Petrifilm. Quality file. Our standard is excellence. Package Insert. 3M. 2009. www.3m.com/microbiology – 281 p.
14. US Patent 5681712 – Surface colony counting device and method of use. US Patent Issued on October 28, 1997. – 27 p.