

Инструкция по определению количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в сыром молоке

1. Назначение

Инструкция предназначена для определения КМАФАнМ в сыром молоке биoluminesцентным методом.

- диапазон определения КМАФАнМ – от 50 тыс. до 20 млн. КОЕ/мл молока
- длительность анализа – 20 - 25 мин на 1 образец
- набор рассчитан на анализ 20 образцов молока

2. Комплектация набора

Реагенты стерильные

Флакон N 1 - АТФ-реагент ЛЮМТЕК	- 2 флакона.
Флакон N 2 - Раствор для растворения АТФ-реагента	- 1 флакон
Флакон N 3 - АТФ-контроль	- 1 флакон
Флакон N 4 - Реагент для разрушения бактериальных клеток	- 1 флакон
Флакон N 5 - Реагент для предобработки молока	- 20 пробирок
Флакон N 6 - Промывочный раствор для КМАФАнМ	- 1 флакон

Одноразовые расходные материалы в составе набора (стерильные)

- Фильтр-авета - 43 шт
- Полоски фильтровального картона (комплект – 10 шт.) - 1 комплект

Расходные материалы многократного использования, обязательные для первого заказа, но не входят в набор

- Штатив для фильтров
- Шприц с резиновым наконечником

Расходные материалы и оборудование, поставляемые по заказу

- Автоматические пипетки фиксированного объема на 0,02 мл и 0,10 мл - по 1 шт
- Наконечники для пипеток (комплект – 50 шт) - 2 комплекта
- Биolumинометр «ЛЮМ-1» или другой с аналогичными техническими характеристиками

ВНИМАНИЕ!

Для получения воспроизводимых результатов анализа молока необходимо соблюдать меры предосторожности, принятые при работе в микробиологической лаборатории, в частности:

- перед проведением анализа поверхность лабораторного стола обработать 70% этанолом,
- использовать автоматические пипетки и стерильные одноразовые наконечники к ним,
- для выполнения каждой операции использовать новый стерильный наконечник,
- после анализа каждого образца молока штатив для фильтров, фланцевый наконечник шприца, пинцет и автоматические пипетки обрабатывать 70% этанолом.

3. Проведение анализа

Подготовка раствора АТФ-реагента

1. Во флакон № 1 внести 2 мл раствора из флакона № 2, выдержать 30 мин перед использованием. Полученный раствор АТФ-реагента можно хранить при комнатной температуре в течение рабочего дня, а при 4°C – в течение 2-3 дней.

Подготовка раствора АТФ-контроля

2. Во флакон № 3 внести 1 мл раствора из флакона № 4, перемешать.

Измерение сигнала для раствора АТФ-контроля

3. Поместить фильтр-авету с помощью пинцета в кюветное отделение люминометра. Внести в нее 0,02 мл раствора АТФ-контроля из флакона № 3 и 0,10 мл раствора АТФ-реагента из флакона № 1, быстро перемешать и измерить биoluminesцентный сигнал (I_1).
4. Повторить измерения по п. 3 еще два раза и найти среднее значение биoluminesцентного сигнала для АТФ-контроля (I_1)'.

Анализ пробы молока

5. Образец отфильтрованного молока объемом 50 мл довести до комнатной температуры и тщательно перемешать.
6. Во **флакон № 5** с реагентом для предобработки молока внести 1 мл молока и тщательно перемешать. Флакон закрыть и поместить в водяную баню с температурой $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 10 мин.
7. В штатив для фильтравет с помощью пинцета поместить полоску фильтровального картона и установить на него две **фильтраветы**.
8. В одну **фильтравету** внести 0,10 мл предобработанного молока и продавить его на фильтровальный картон, создавая избыточное давление с помощью шприца с резиновым наконечником.
9. Полоску фильтровального картона сдвинуть таким образом, чтобы под **фильтраветой** оказался сухой участок полоски.
10. Внести в ту же **фильтравету** 3-4 капли промывочного раствора из **флакона № 6** и продавить его в фильтровальную бумагу, создавая избыточное давление с помощью шприца с резиновым наконечником.
11. Поместить **фильтравету** с помощью пинцета в кюветное отделение люминометра и внести 0,02 мл раствора из **флакона № 4**.
12. Через 1-2 мин в ту же **фильтравету** добавить 0,10 мл раствора АТФ-реагента из **флакона № 1**, быстро перемешать и измерить максимальный биолюминесцентный сигнал (I_2).
13. Повторить операции по пп. **8-12** со второй **фильтраветой**. Найти среднее значение биолюминесцентного сигнала для образца молока (I_2).
14. Концентрацию АТФ в молоке рассчитать по формуле (1),

$$[\text{АТФ}]_{\text{молоко}} = 2 * (I_2)' : (I_1)', \text{ пикомоль/мл} \quad (1),$$

15. По величине концентрации АТФ в молоке ($[\text{АТФ}]_{\text{молоко}}$), пользуясь таблицей, определить величину КМАФАнМ.

Таблица . Определение КМАФАнМ в сыром молоке биолюминесцентным методом по концентрации АТФ

Концентрация АТФ в молоке, пикомоль/мл	КМАФАнМ в молоке, КОЕ/ мл
менее 0,6	до 50 тыс.
0,6 - 1,21	50 - 100 тыс.
1,2 - 2,7	100 - 200 тыс.
2,7 - 4,2	200 - 300 тыс.
4,2 - 7,3	300 - 500 тыс.
7,3 - 74,0	500 - 4000 тыс.
74,0 - 442	4000 - 20000 тыс.

По вопросам использования и приобретения набора ЛЮМТЕК обращаться по тел. (095)-9392660, E-mail iut@enz.chem.msu.ru web-site www.lumtek.ru

Примечание: 1 мл равен 1 см³ ,

1 пикомоль/мл равен 10⁻¹² моль/см³