

WYROBY PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	N O R M A B R A N Ż O W A	BN-84
	Wyroby piekarskie i ciastkarskie	8070-06
	Mikrobiologiczne metody badań	Zamiast BN-76/8070-06
		Grupa katalogowa 1239

1. WSTĘP

Przedmiotem normy są mikrobiologiczne metody badań półproduktów, gotowych wyrobów ciastkarskich i piekarskich.

2. SPOSÓB POBIERANIA PRÓBEK

2.1. Pobieranie próbek wyrobów gotowych i półproduktów ciastkarskich do posiewów mikrobiologicznych

2.1.1. Sposób pobierania, wielkość i opakowanie próbek. Próbki wyrobów i półproduktów ciastkarskich należy pobierać losowo, metodą na ślepo, posługując się wyjałowionym sprzętem (załącznik 2 p. 1.). Sposób pobierania próbki, jej wielkość i opakowanie powinny być zgodne z warunkami przedstawionymi w tabl. 1. Próbki wyrobów lub półproduktów należy pakować bezpośrednio po pobraniu.

Opakowanie próbki oraz protokół jej pobrania powinny być zgodne z PN-78/A-74250.

Tablica 1

Lp.	Produkt badany	Wielkość próbki	Sposób pobierania próbki	Sposób opakowania
1	Wyroby na wagę o masie jednostkowej do 30 g	300 g	z różnych miejsc partii	bezpośrednio w jałowy papier pergaminowy lub folię aluminiową, a następnie czysty pojemnik np. z tworzywa syntetycznego
2	Wyroby o masie jednostkowej 30÷100 g	7 sztuk (próbka ogólna) lecz nie mniej niż 300 g		
3	Wyroby i półprodukty wypiekane o masie jednostkowej powyżej 100 g	300 g	przez wykrojenie od środka części wyrobu o kształcie klina przez wykrojenie kawałków wzdłuż osi poprzecznej z poszczególnych sztuk wyrobu przez wykrojenie kawałków o kształcie zależnym od formy produktu z poszczególnych sztuk	
	— torty	300 g z jednej sztuki		
	— placki, strucle, mazurki, keksy, serniki	300 g z 3 sztuk		
4	— kapsle, spody, ranty itp. półprodukty wypieczone	300 g z 3 sztuk	z różnych miejsc partii z uwzględnieniem warstwy zewnętrznej i wewnętrznej z różnych miejsc partii po uprzednim wymieszaniu przez wykrojenie kawałków z różnych miejsc	
	Półprodukty na wagę	300 g		
	— kremy, masy, ciasta surowe, pomady, glazury, kruszonki	300 g		
	— syropy, konfitury, przeciery owocowe	300 g		
	— polewy, galaretki	300 g		

Zgłoszona przez SPOŁEM CZSS Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego
Ustanowiona przez Dyrektora SPOŁEM CZSS Zakładu Badawczego Przemysłu Piekarskiego
dnia 30 stycznia 1984 r. jako norma obowiązująca od dnia 26 kwietnia 1984 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 4/1984 poz. 7)

2.1.2. Przechowywanie próbek. Próbki półproduktów i wyrobów ciastkarskich powinny być przekazane natychmiast po pobraniu do badań mikrobiologicznych. Próbki, które ze względu na transport nie mogą być przekazane do badań w ciągu 1 h, powinny być umieszczone w temperaturze $0 \div 4^{\circ}\text{C}$ i dostarczone do badania w czasie nie dłuższym niż 4 h.

2.2. Pobieranie próbki bułki tartej do posiewów mikrobiologicznych. Bułka tarta do posiewów mikrobiologicznych powinna być pobierana zgodnie z PN-72/A-74001. Opakowanie próbki powinno spełniać warunek jakości (załącznik 2 p. 1).

3. METODY BADAŃ

3.1. Przygotowanie próbki do badań

3.1.1. Rozdrobnienie próbki. Próbkę półproduktów lub wyrobów należy z zachowaniem warunków jakości przenieść do wyjałowionego (załącznik 2 p.2) pojemnika młynka huraganowego (rozdrabniacz GM-2) i rozdrobnić w ciągu $3 \div 5$ s w zależności od rodzaju materiału lub do woreczka Stomachera i rozdrabniać zgodnie z instrukcją.

W przypadku braku rozdrabniacza próbkę ogólną rozetrzeć dokładnie w jałowym moździerzu porcelanowym do uzyskania jednorodnej masy.

3.1.2. Homogenizacja próbki. Z rozdrobnionej próbki odważyć 20 g i przenieść z zachowaniem warunków jakości do jałowego naczynia homogenizatora (załącznik 2 p. 2) lub woreczka Stomachera. Następnie dodać 9-krotną ilość tj. 180 cm^3 płynu Ringera (załącznik 4 p. 2.1) lub płynu do rozcieńczeń (załącznik 4 p. 2.2) i homogenizować za pomocą homogenizatora obrotowego przez 2-3 min, tak aby uzyskać ogólną

liczbę obrotów $15\ 000 \div 20\ 000$, lub w aparacie Stomachera (wg instrukcji).

Otrzymany w ten sposób homogenizat stanowi podstawowe 10-krotne rozcieńczenie produktu, z którego w zależności od potrzeb sporządza się dalsze rozcieńczenia lub bezpośrednio wysiewa na odpowiednie podłoża.

Przed przystąpieniem do sporządzania dalszych rozcieńczeń lub posiewów należy odczekać 10 min, aby nastąpiło oddzielenie warstwy płynnej od stałej. Do dalszych rozcieńczeń lub posiewów pobiera się płyn z nad osadu.

3.1.3. Przygotowanie rozcieńczeń. Z przygotowanego wg 3.1.2 homogenizatu pobrać jałową pipetą 1 cm^3 materiału i przenieść do próbki zawierającej 9 cm^3 płynu Ringera (załącznik 4 p. 2.1) lub płynu do rozcieńczeń (załącznik 4 p. 2.2) uważając, aby nie zanurzyć pipety. Po jej samoczynnym opróżnieniu pipetę należy odłożyć. Zawartość próbki dokładnie wymieszać za pomocą okrężnych ruchów dłonią, albo przy użyciu mikrowytrząsarki (np. Micro-Shaker typ 302 m prod. „Premed“), a następnie przenieść 1 cm^3 do kolejnej próbki z 9 cm^3 płynu Ringera lub płynu do rozcieńczeń i postępować analogicznie jak poprzednio. W ten sposób można dowolnie zwiększyć rozcieńczenie produktu, uzyskując w każdej następnej próbce rozcieńczenie 10-krotnie większe od poprzedniego. Równoległe z przygotowywaniem następnego rozcieńczenia należy wykonać posiewy, posługując się tą samą pipetą (najpierw należy przenieść 1 cm^3 uzyskanego rozcieńczenia do kolejnej próbki z płynem Ringera lub płynem do rozcieńczeń, a następnie po 1 cm^3 do płytek lub probówek).

3.2. Rodzaje oznaczeń i warunki posiewów — wg tabl. 2.

Tablica 2

Lp.	Rodzaj oznaczenia	Wysiewane rozcieńczenia	Rodzaj podłoża	Warunki inkubacji	
				temperatura $^{\circ}\text{C}$	czas h
1	2	3	4	5	6
1	Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych w 1 g produktu	(1:10) ¹⁾ 1:100, 1:1000, 1:10000, (1:100000) ²⁾	agar z ekstraktem drożdżowym	30	72
2	Miano coli	1:10, 1:100, 1:1000, (1:10000) ²⁾	podłoże z żółcią i zieloną brylantową	37	48
3	Liczba przetrwalników <i>Bacillus cereus</i> w 1 g produktu	1:10, 1:100	agar z czerwiecią fenolową, z żółtkiem jaja i polimyksyną	30	72
4	Liczba przetrwalników tlenowych bakterii amylolitycznych 1 g produktu	1:10, 1:100, (1:1000) ²⁾	agar ze skrobią wg Waksmana	37	48
5	Wykrywanie obecności gronkowców koagulazododatnich w 0,1 g produktu	1:10	zgodnie z PN-75/A-04024		
6	Wykrywanie obecności pałeczek Salmonella w 25 g produktu	rozdrobniona próbka (25 g)	— woda peptonowa lub — podłoże SF i podłoże z czterotianem sodu	37 37	24 24
7	Miano beztlenowych laseczek (dla produktów w hermetycznych opakowaniach)	1:10, 1:100	podłoże Wrzoska	37	24÷48
8	Liczba pleśni i drożdży w 1 g produktu	1:10, 1:100, 1:1000	podłoże Sabouraud	30	48÷72

¹⁾ Wysiewać w przypadku produktów o niskim stopniu zakażenia.

²⁾ Wysiewać w przypadku produktów podejrzanych o wysoki stopień zakażenia.

3.3. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, mezofilnych

3.3.1. Wykonanie posiewu. Przed przystąpieniem do właściwych posiewów należy dermatografem zaznaczyć na każdej płytce: numer próby, rozcieńczenie, datę wysiewu i rodzaj podłoża.

Z 3 kolejnych rozcieńczeń 1:100, 1:1000, 1:10000, przygotowanych zgodnie z 3.1.3 przenieść pipetą po 1 cm³ materiału równolegle na 2 płytki Petriego.

Badany materiał zalać (najpóźniej po 20 min) rozpuszczonym i ostudzonym do temperatury 45÷50°C agarom z ekstraktem drożdżowym (załącznik 4 p. 3.3) w ilości około 15 cm³. Pożywkę wymieszać dokładnie z materiałem badanym, poruszając ostrożnie zamkniętą płytką w kierunkach wzajemnie prostopadłych.

Po zestaleniu agaru płytki odwrócone dnem do góry wstawić do ciepłarki o temperaturze 30°C na 72 h.

3.3.2. Odczytanie wyniku. Po okresie inkubacji płytki należy obejrzyć, a do liczenia przeznaczyć te, na których liczba kolonii waha się w granicach 30÷300. Przy liczeniu kolonii należy zaznaczać je dermatografem, aby uniknąć pomyłek. W celu ułatwienia liczenia kolonii płytkę umieścić w specjalnym aparacie do liczenia lub położyć na ciemnym tle. Przy liczeniu bardzo drobnych kolonii użyć lupy.

3.3.3. Obliczanie i podawanie wyników

a) Jeżeli jedna lub obie płytki z tego samego rozcieńczenia zawierają liczbę kolonii zawartą w granicach 30÷300 obliczyć średnią arytmetyczną kolonii z obu płytek. Otrzymane liczby zaokrąglić w następujący sposób:

— jeżeli otrzymana liczba jest mniejsza niż 100, zaokrąglić do najbliższej wielokrotności 5:

np. 83 — 85,

82 — 80,

— jeżeli otrzymana liczba jest większa niż 100 i kończy się na 5, zaokrąglić do najbliższej wielokrotności 20:

np. 115 — 120,

145 — 140,

— jeżeli otrzymana liczba jest większa niż 100 i nie kończy się na 5, zaokrąglić do najbliższej wielokrotności 10:

np. 113 — 110,

117 — 120.

Mnożąc liczbę obliczoną w powyższy sposób przez odwrotność rozcieńczenia otrzymuje się liczbę drobnoustrojów w 1 g produktu. Wynik podawać w postaci potęgi dla liczb zawartych między 1,0 a 9,9 pomnożonych przez 10^x, gdzie x stanowi wykładnik potęgi. Np. w posiewach z rozcieńczenia 1:1000 stwierdzono 240 kolonii co się równa 240000; wynik zaleca się podawać jako 2,4 · 10⁵.

b) Jeżeli na płytkach z dwóch kolejnych rozcieńczeń liczba kolonii mieści się w granicach 30÷300, obliczyć liczbę z każdego rozcieńczenia wg poz. a). Wynik podać jako średnią arytmetyczną kolonii z dwóch uzyskanych liczb z każdego rozcieńczenia. W przypadku gdy stosunek wzajemny liczb z każdego rozcieńczenia jest większy niż 2, należy uwzględnić wartość niższą. Np. średnia arytmetyczna liczby kolonii z rozcieńczenia

1:10=260, średnia arytmetyczna liczby kolonii z rozcieńczenia 1:100=780, 780:260=3, należy więc uwzględnić średnią arytmetyczną liczby kolonii z rozcieńczenia 1:10, czyli wynik podać jako 2,6 · 10³.

c) Jeżeli stwierdza się mniej niż 30 kolonii na płytkach z najmniejszego rozcieńczenia dziesiętnego — wynik podać jako:

— mniej niż 30 drobnoustrojów × n/g, gdzie n stanowi wskaźnik rozcieńczenia.

d) Jeżeli nie stwierdza się wzrostu kolonii na płytkach z najmniejszego rozcieńczenia dziesiętnego wynik podać jako:

— mniej niż 1 drobnoustrój × n/g, gdzie n stanowi wskaźnik rozcieńczenia.

e) Jeżeli stwierdza się więcej niż 300 kolonii na płytkach z najwyższego rozcieńczenia dziesiętnego wynik podać jako więcej niż 300 drobnoustrojów × n/g, gdzie n stanowi wskaźnik rozcieńczenia.

3.4. Oznaczanie miana coli

3.4.1. Wykonanie posiewu. Z 3 kolejnych rozcieńczeń 1:10, 1:100, 1:1000 przygotowanych zgodnie z 3.1.2 i 3.1.3 przenieść po 1 cm³ badanego materiału do probówek z podłożem z żółcią i zielenią brylantową (załącznik 4 p.3.4).

Probówki z posiewami umieścić w ciepłarni o temperaturze 37°C na 48 h.

3.4.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Wzrost na pożywce oraz występowanie gazu w rurce Durhama wskazuje na obecność bakterii z grupy coli.

Dla potwierdzenia wyniku z 2 ostatnich probówek, w których stwierdzono gaz, pobrać eżąc nieco materiału i przenieść na powierzchnię dobrze obsuszonego podłoża Endo (załącznik 4 p. 3.5).

Wykonać posiew redukcacyjny, aby otrzymać pojedyncze kolonie.

Pałeczki z grupy coli rosną na podłożu Endo w postaci kolonii różowych lub czerwonych z metalicznym połyskiem.

Z charakterystycznych kolonii należy sporządzić preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (załącznik 3). Pałeczki z grupy coli należą do drobnoustrojów Gram-ujemnych. Jako miano coli podać ostatnie rozcieńczenie, w którym przy posiewie na pożywkę z żółcią i zielenią brylantową, stwierdzono obecność pałeczek z grupy coli, potwierdzoną przez wzrost na podłożu Endo i barwienie metodą Grama (załącznik 3).

Przy braku wzrostu w rozcieńczeniu 1:10 należy podać, że bakterii z grupy coli nie stwierdzono w 0,1 g. W przypadku dalszych badań w celu określenia miana *Escherichia coli*, należy ze wszystkich posiewów dodatkowych, na podłożu z żółcią i zielenią brylantową, przesiać hodowlę do probówek z nowym podłożem z żółcią i zielenią brylantową oraz do probówek z wodą peptonową (załącznik 4. p. 3.6). Posiewy inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 44 ± 0,5°C w ciągu 48 h. Po okresie inkubacji do probówek z wodą peptonową dodać ostrożnie, nawarstwiając po ściance, parę kropli odczynnika Kovácsa (załącznik 4 p. 2.7). Powstanie różowego pierścienia świadczy o obecności indolu (wynik dodatni). Wytwarzanie gazu na podłożu z żółcią

i zielenią brylantową w temperaturze 44°C oraz dodatnia próba na indol świadczą o obecności *Escherichia coli*. Jako miano *Escherichia coli* podać ostatnie rozcieńczenie, w którym stwierdzono obecność tych pałeczek przy posiewie na podłożu z żółcią i zielenią brylantową potwierdzoną próbą na indol.

3.5. Oznaczanie liczby przetrwalników *Bacillus cereus*

3.5.1. Metoda posiewu na podłoże agarowe z czerwieni fenolową żółtkiem jaja i polimyksyną wg Mossela

3.5.1.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczenia 1:10 przygotowanego zgodnie z 3.1.2 przelać jałowo około 100 cm³ homogenizatu do słoika pojemności 200 cm³ z doszlifowanym korkiem i dokładnie wymieszać. Słoik umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 80°C i stale mieszając ogrzewać przez 20 min. Po ogrzaniu mieszaninę ostudzić, wykonać dodatkowe rozcieńczenie (1:100) zgodnie z 3.1.3 i przenieść po 0,1 cm³ z rozcieńczenia 1:10 i 1:100 na powierzchnię dobrze obsuszonego podłoża przygotowanego zgodnie z załącznikiem 4 p. 2.7. Dodatkowo z rozcieńczenia 1:10 posiać po 0,5 cm³ na dwie płytki, aby obliczyć liczbę kolonii w przypadku małego zakażenia produktu przez *Bacillus cereus*. Natychmiast rozprowadzić materiał na całej powierzchni płytki za pomocą gładzeczki wysterylizowanej przez zanurzenie w alkoholu i opalenie. Inkubację prowadzić w temperaturze 30°C i oglądać po 24 i 48 h.

3.5.1.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Na podanym podłożu bakterie *Bacillus cereus* rosną w postaci płaskich, lekko różowych kolonii, wokół których powstaje żółta strefa wytrąconych kwasów tłuszczowych i takie kolonie należy policzyć, a wynik przedstawić zgodnie z p. 3.3.3 (uwzględniając mniejszą ilość materiału wysiewanego na płytkę w tym oznaczeniu).

Dla potwierdzenia wyników dodatnich z typowych kolonii, wokół których powstała wyraźna strefa zmętnienia, wykonać eż posiew redukcyjny na powierzchni agaru bulionowego z krwią przygotowanego wg załącznika 4 p. 3.8 oraz igłą bakteriologiczną wkluć do słupka z żelatyną przygotowanego wg załącznika 4 p. 3.9. Posiewy inkubować przez 24 ÷ 48 h w temperaturze 30 ± 1°C, słupki z żelatyną przed odczytaniem wyniku umieścić na 1 ÷ 2 h w lodówce w temperaturze około 4°C. Kolonie *Bacillus cereus* powodują wyraźną hemolizę krwi i rozplynnają żelatynę.

3.5.2. Metoda posiewu na podłoże zastępcze (podłoże agarowe z żółtkiem jaja)

3.5.2.1. Wykonanie posiewu. Posiewy na podłoże agarowe z żółtkiem jaja, przygotowane wg załącznika 4 p. 3.10, wykonać jak w 3.5.1. Posiewy inkubować w temperaturze 30 ± 1°C i oglądać po 24 i 48 h.

3.5.2.2. Odczytanie wyniku. Na podanym podłożu bakterie *Bacillus cereus* rosną w postaci płaskich, białych kolonii, wokół których powstaje strefa zmętnienia. Wyrosłe kolonie liczyć i sprawdzać jak w 3.5.1.2.

3.6. Oznaczanie liczby przetrwalników bakterii tlenowych amylopolitycznych

3.6.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczenia 1:10 pasteryzowanego i ostudzonego zgodnie z 3.5.1.1 wykonać dodatkowe rozcieńczenie (1:100) zgodnie z 3.1.3, przenieść po 1 cm³ z rozcieńczeń 1:10, 1:100 na 2 rów-

noległe płytki Petriego i zalać agarem ze skrobią wg Waksmana (załącznik 4 p. 3.11).

Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 h.

3.6.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Na podanym podłożu bakterie amylopolityczne rozkładają skrobię i po zalaniu płynem Lugola (załącznik 4 p. 2.5) wokół ich kolonii pozostaje niezabarwiona, jasna strefa. Takie kolonie należy policzyć, a wynik przedstawić zgodnie z 3.3.3.

3.7. Wykrywanie obecności gronkowców koagulazododatnich w 0,1 g produktu — wg PN-75/A-04024.

3.8. Wykrywanie obecności pałeczek z grupy *Salmonella* w 25 g produktu

3.8.1. Przednamnażanie stosować tylko przy badaniu wyrobów o niskiej wilgotności. Z próbki rozdrobnionej zgodnie z 3.1.1 odważyć, posługując się jałowym skalpelem, 25 g produktu do jałowego naczynia homogenizatora lub woreczka Stomachera, dodać około 250 cm³ zbuforowanej wody peptonowej (załącznik 4 p. 3.12) i homogenizować zgodnie z 3.1.2. Następnie zhomogenizowaną zawiesinę przenieść z zachowaniem warunków jałowości do jałowej kolby pojemności 500 cm³. Posiewy inkubować w temperaturze 37 ± 1°C nie krócej niż 16 h i nie dłużej niż 20 h.

3.8.2. Namnażanie selektywne

a) W przypadku stosowania przednamnażania po okresie inkubacji pobrać w sposób jałowy dwukrotnie po około 10 cm³ hodowli i przenieść do 2 kolb, z których jedna zawiera 100 cm³ podłoża z czterotianem sodowym (załącznik 4 p. 3.13), a druga 100 cm³ podłoża SF (załącznik 4 p. 3.14). Posiane podłoża inkubować w temperaturze 37°C przez 24 h do 48 h.

b) W przypadku pominięcia przednamnażania z próbki rozdrobnionej zgodnie z 3.1.1 odważyć, posługując się jałowym skalpelem, dwukrotnie po 25 g produktu do jałowego naczynia homogenizatora lub woreczka Stomachera i dodać do jednej próbki 100 cm³ podłoża z czterotianem sodowym (załącznik 4 p. 3.13), a do drugiej — 100 cm³ podłoża SF (załącznik 4 p. 3.14) i homogenizować zgodnie z 3.1.2. Następnie zhomogenizowaną zawiesinę przenieść z zachowaniem warunków jałowości do jałowej kolby pojemności 200 cm³. Posiane podłoża inkubować w temperaturze 37°C przez 24 h do 48 h.

3.8.3. Przesiew na podłoża stałe, odczytanie wyników.

Po 24 h, a następnie po 48 h inkubacji z obu podłoży płynnych wykonać eż posiew redukcyjny na powierzchni dwóch płytek Petriego: jednej z podłożem agarowym z zielenią brylantową i czerwieni fenolową (załącznik 4 p. 3.15), drugiej z podłożem SS (załącznik 4 p. 3.16), lub Mac Conkey'a (załącznik 4 p. 3.17).

Posiewy na podłożach stałych inkubować w temperaturze 37 ± 1°C przez 20 ÷ 24 h.

Jeżeli wzrost wysianych drobnoustrojów jest słaby i nie stwierdza się obecności typowych dla pałeczek *Salmonella* kolonii, posiane płytki należy reinkubować przez dalsze 20 ÷ 24 h w temperaturze 37 ± 1°C.

Na podłożu z zielenią brylantową i czerwieni fenolową pałeczki *Salmonella* tworzą kolonie drobne,

wypukłe, nieprzezroczyste, różowobiałe, otoczone czerwono połyskującym podłożem.

Na podłożu SS pałeczki *Salmonella* tworzą kolonie drobne, wypukłe, przejrzyste, bezbarwne lub lekko różowe. Szczepy wytwarzające siarkowodór tworzą kolonie z czarnym środkiem.

Na podłożu Mac Conkey'a pałeczki *Salmonella* rosną w postaci przejrzystych kolonii.

3.8.4. Potwierdzenie wyniku. Podejrzane o przynależność do grupy *Salmonella* kolonie należy identyfikować zgodnie z PN-64/A-04023.

W przypadku niestwierdzenia obecności bakterii z grupy *Salmonella* w posiewach na podłożach stałych należy podać, że bakterii z grupy *Salmonella* nie stwierdzono w 25 g produktu.

W przypadku stwierdzenia obecności bakterii w posiewach na jednym lub na obu podłożach należy podać, że bakterie z grupy *Salmonella* stwierdzono w 25 g produktu.

3.9. Oznaczanie miana beztlenowych laseczek przetrwalnikujących

3.9.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczeń 1:10 i 1:100 przygotowanych zgodnie z 3.1.2 i z 3.1.3 przenieść po 1 cm³ badanego materiału do 2 probówek z podłożem Wrzoska (załącznik 4 p. 3.18). Przed wysiewem podłoże regenerować w temperaturze 100°C przez 10 min i natychmiast schłodzić w zimnej wodzie. Posiew wykonać zanurzając pipetę pod warstwę parafiny w taki sposób, aby nie wprowadzić powietrza do podłoża. Po posiewie jedną z probówek z każdego rozcieńczenia ogrzewać w temperaturze 80°C przez 10 min w celu zabicia wegetatywnych form bakterii beztlenowych.

Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 ÷ 72 h.

3.9.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. W przypadku wykrycia gazu pod parafiną wykonać preparat barwiony metodą Grama (załącznik 3). W przypadku stwier-

dzenia laseczek Gram-dodatnich wykonać dalsze badania. Pipetą pasterowską pobrać z dna probówki nieco materiału i przenieść na płytkę Petriego, którą zalewa się ostudzonym do temperatury 45°C podłożem Wilson-Blaira (załącznik 4 p. 3.18).

Po zastygnięciu podłoża Wilson-Blaira płytkę zalać grubą (około 2 cm) warstwą agaru wodnego (załącznik 4 p. 3.20) lub hodować w anaerostacie w celu stworzenia warunków beztlenowych. Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 h. Zaczernienie całego podłoża lub wokół kolonii świadczy o obecności beztlenowców redukujących siarczyny.

Jako miano laseczek beztlenowych przetrwalnikujących podać ostatnie rozcieńczenie, w którym stwierdzono gaz na podłożu Wrzoska i zmętnienie (potwierdzone przez dalsze badania) w szeregu probówek ogrzanych po posiewie.

3.10. Oznaczania liczby pleśni i drożdży

3.10.1. Wykonanie posiewu. Z 3 kolejnych rozcieńczeń: 1:10, 1:100, 1:1000, przygotowanych zgodnie z 3.1.2 i 3.1.3, przenieść po 1 cm³ badanego materiału równolegle na 3 płytki Petriego i zalać rozpuszczonym podłożem agarowym z ekstraktem drożdżowym, glukozą i chloramphenicolem (załącznik 4 p. 3.21). W przypadku kłopotów z uzyskaniem antybiotyku dopuszcza się stosowanie podłoża Sabouraud (załącznik 4 p. 3.22).

Posiewy inkubować w temperaturze 30°C przez 72 h, a w przypadku braku wzrostu do 5 dni.

3.10.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Obserwacje wzrostu kolonii przeprowadzić po raz pierwszy po 48 h, a następnie w odstępach 24 h w celu uchwycenia właściwego momentu ich rozwoju, umożliwiającego dokładne policzenie; oddzielnie liczyć kolonie drożdży i pleśni. Jeżeli pleśnie wyrosły tylko na jednej z posianych płytek należy ją pominąć, wynik przedstawić zgodnie z 3.3.3.

K O N I E C

Załączniki 4
Informacje dodatkowe

ZAŁĄCZNIK 1

APARATURA, SPRZĘT I MATERIAŁY POMOCNICZE

1. Pobieranie próbek

Noże, łopatkę, łyżki, szczytce.

Śloiki zamykane na szlif lub inne szczelnie zamykane pojemności 500 ÷ 1000 cm³

Pojemniki plastikowe z pokrywą o wymiarach około 30×20×15 cm.

Papier pergaminowy lub folia aluminiowa.

2. Przygotowanie próbki do badań

Młynek huraganowy (rozdrabniacz GM-2).

Homogenizator Unipan typ 302 lub inny np. Stomacher.

Moździerz porcelanowy o średnicy 20 cm z tłuczkiem.

3. Wykonywanie posiewów mikrobiologicznych i badań mikroskopowych.

Mikrowytrząsarka np. Miero-shaker typ 302 m produkcji „Premed“.

Cieplarka z termoregulacją o temperaturze 30 ±1°C.

Cieplarka z termoregulacją o temperaturze 37 ±1°C.

Anaerostat.

Łaźnia wodna o temperaturze 80°C.

Lupa o 8-krotnym powiększeniu.

Mikroskop biologiczny z obiektywem imersyjnym.

Probówki bakteriologiczne o wymiarach 1,6×18 cm.

Pipety 10 cm³.

Pipety serologiczne 1 cm³.

Płytki Petriego o średnicy 10 cm.

Słoiki z doszlifowanym korkiem 200 cm³.

Rurki Durhama.

Szkiełka przedmiotowe.

Szkiełka przykrywkowe.

Skalpel.

Pipety pasterowskie wykonane z rurek szklanych ze szkła naturalnego, długości 15 cm i średnicy 0,6 cm, zamkniętych z obu stron koreczkami z waty. Z każdej rurki uzyskuje się 2 pipety pasterowskie przez silne ogrzanie rurki palnikiem w środku jej długości i wyciągnięcia w kapilarę.

Głaszczki szklane wykonane z pręcików szklanych o średnicy 0,35 cm i długości 20 cm poprzez zgięcie pod kątem prostym 3 cm odcinka końcowego. Końce pręcików szklanych powinny być zaokrąglone.

Eza (oczko platynowe) wykonane z drucika platynowego (lub częściej tantalowego) umieszczonego w ob-

sadce. Wolny koniec zawija się w kształcie kółka o średnicy 2 ÷ 5 mm.

4. Przygotowywanie podłoży

Wirówka 3000 obr/min.

Pehametr.

Lodówka.

Waga techniczna.

Waga analityczna.

5. Sterylizacja podłoży i szkła

Autoklaw.

Aparat Kocha.

Suszarka z termoregulacją o temperaturze 160 ÷ 180°C.

Filtr bakteriologiczny: aparat z sączkami EK lub aparat do sączków membranowych z sączkami coli 5 lub świeca Berkefelda lub świeca Chamberlanda.

ZAŁĄCZNIK 2

PRZYGOTOWANIE APARATURY, SPRZĘTU I SZKŁA LABORATORYJNEGO DO BADAŃ MIKROBIOLOGICZNYCH

1. PRZYGOTOWANIE SPRZĘTU I MATERIAŁÓW DO POBIERANIA I OPAKOWANIA PRÓBEK

Drobny sprzęt do pobierania próbek (łyżki, noże, szczytce itp.) należy wyjałować, po uprzednim szczelnym zapakowaniu w papier, w suszarce (w ciągu 1 h w temperaturze 170°C) lub autoklawie (w ciągu 20 min w temperaturze 121°C). Można również jałować przez zanurzenie w skażonym alkoholu i ostrożne opalenie bezpośrednio przed użyciem.

Słoiki jałować zgodnie z warunkami mycia i wyjałowienia szkła laboratoryjnego wg p. 3. Papier lub folię należy jałować po złożeniu w niewielkie pakiety w suszarce w ciągu 2 h w temperaturze 130°C. Pojemniki plastikowe jako opakowania pośrednie powinny być dokładnie wymyte i osuszone.

2. PRZYGOTOWANIE ROZDRABNIACZA I HOMOGENIZATORA DO BADAŃ

Przed użyciem ww. aparatów ich części stykające się bezpośrednio z badaną próbą należy dokładnie wymyć i osuszyć. Części aparatów nie osadzone na stałe, jak pojemniki, nożyki tnące, należy wyjałować w suszarce (w ciągu 1 h w temperaturze 170°C) lub autoklawie (w ciągu 20 min w temperaturze 121°C).

Przedmioty te należy sterylizować dokładnie opakowane w papier. Części urządzeń osadzone na stałe, a stykające się również z badaną próbą, po wymyciu i osuszeniu, bezpośrednio przed użyciem należy przemyć skażonym alkoholem i ostrożnie opalić.

3. PRZYGOTOWANIE SZKŁA LABORATORYJNEGO DO BADAŃ

3.1. Mycie szkła nowego. Nowe szkło nieużywane, w celu usunięcia niepożądanych substancji alkalicznych,

należy umieścić na kilka godzin w 1-procentowym roztworze kwasu solnego lub wygotować w nim w ciągu 15 ÷ 20 min. Następnie należy szkło wypłukać w wodzie wodociągowej, a później kilkakrotnie w destylowanej.

3.2. Mycie szkła używanego. Po usunięciu zawartości szkła należy wymyć za pomocą szczotki w ciepłej wodzie z dodatkiem detergentu syntetycznego (Ludwik, Kokosal, FF itp.), następnie dokładnie wypłukać w ciepłej wodzie bieżącej i kilkakrotnie w wodzie destylowanej.

Pipety silnie zanieczyszczone substancjami organicznymi lub inne rodzaje szkła z zanieczyszczeniami nie dającymi się usunąć w powyższy sposób należy po usunięciu zawartości i wymyciu zanurzyć co najmniej na 24 h w mieszaninie chromowej, po czym należy dokładnie wypłukać w wodzie bieżącej, a następnie kilkakrotnie w wodzie destylowanej.

Szkiełka przedmiotowe i przykrywkowe używane należy gotować w wodzie z dodatkiem detergentów przez 30 min, a następnie umyć w wodzie bieżącej, osuszyć i przechowywać w naczyniu z mieszaniną alkoholu etylowego i eteru etylowego w stosunku 1:1.

Szkło zawierające hodowle drobnoustrojów należy przed przystąpieniem do mycia odkażać przez:

- gotowanie przez 30 min w aparacie Kocha,
- umieszczenie w płynie odkażającym (2-procentowym lizolu lub 5-procentowym sterinolu) na 12 h.

Szczególnie ostrożnie należy obchodzić się ze szkłem (np. płytkami, probówkami), które bezpośrednio kontaktowało się z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Szkło zawierające drobnoustroje chorobotwórcze umieszcza się w pojemniku z pokrywą specjalnie do tego celu przeznaczonym i wyjaławia w autoklawie w temperaturze 121°C nie krócej niż 30 min.

3.3. Odtłuszczenie szkła. Szkiełka podstawowe służące do sporządzania preparatów mikroskopowych należy dokładnie odtłuścić w alkoholu, a jeżeli to nie daje zadowalającego efektu, to poprzez parokrotne przepłukanie mieszaniną odtłuszczającą (załącznik 4 p. 2.3), a następnie wytrzeć do sucha.

3.4. Wyjaławianie szkła. Szkło przeznaczone do wyjaławiania powinno być dokładnie wymyte i wysuszone.

Szkło do wyjaławiania należy przygotować w sposób następujący: płytki Petriego zawija się w papier (pojedynczo lub po kilka) albo umieszcza w metalowych tubusach. Probówki korkuje się korkami z waty i zawija dokładnie papierem w paczki zawierające po $10 \div 20$ sztuk. Kolby płaskodenne i kolby stożkowe korkuje się podobnie jak probówki i nakłada na korek kapturek z papieru. Pipety po umieszczeniu w ich górnym otworze wacika pakuje się w papier pojedynczo lub po kilka, obwiązując sznurkiem, lub umieszcza w specjalnych tubusach. Rurki szklane na pipety pasterskie pocięte na odcinki o długości około 15 cm i zatkane z obydwu końców watą pakuje się w papier po $20 \div 30$ sztuk. Naczynia z korkiem doszlifowanym wyjaławia się następująco: otwór zawija się papierem i obwiązuje sznurkiem, oddzielnie zawija się w papier korek i przywiązuje do szyjki naczynia. Szkło wyjaławia się suchym powietrzem w suszarce w ciągu 1 h w tem-

peraturze 170°C (licząc od czasu osiągnięcia tej temperatury). Stosowanie wyższych temperatur może spowodować zwęglenie korków i opakowań papierowych. Po ukończeniu sterylizacji szkło wyjąć z suszarki po spadku temperatury poniżej 50°C .

3.5. Przechowywanie jałowego szkła. Szkło wyjaławione przechowywać w czystych i szczelnie zamkniętych szafach laboratoryjnych.

4. PRZYGOTOWANIE FILTRÓW BAKTERIOLOGICZNYCH DO STERYLIZACJI ROZTWORÓW

Sączki Seitza należy zakładać do aparatu, nie dokręcając całkowicie nasadki i wyjaławiać wraz z aparatem w autoklawie po owinięciu górnej części aparatu w papier. Przed użyciem filtru nasadkę należy dokręcić. Sączki Coli 5 wyjałowić przez gotowanie w ciągu 30 min w wodzie destylowanej i nakładać z zachowaniem warunków jałowości do aparatu uprzednio wyjałowionego. Świece Chamberlanda po wymyciu i wysuszeniu wyżarzyć w piecu muflowym w temperaturze 500°C , przemyć wodą destylowaną i wyjaławiać wraz z korkiem gumowym dopasowanym do kolby ssawkowej po owinięciu całości w papier. Kolbę ssawkową owiniętą w papier wyjałowić oddzielnie w suszarce.

ZAŁĄCZNIK 3

BARWIENIE PREPARATÓW METODĄ GRAMA

1. Przygotowanie preparatu do barwienia. Na dokładnie odtłuszczone (załącznik 2 p. 3.3) szkiełko podstawowe nanieść kroplę wody i materiał pobrany za pomocą ezy. Wykonać równomierny cienki rozmaz o powierzchni około 2 cm^2 . Preparat wysuszyć w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu preparat utrwalić przeprowadzając szkiełko trzykrotnie przez płomień na granicy świecącej i nieświecącej części płomienia.

2. Wykonanie barwienia. Szkiełko z utrwalonym rozmazem umieścić na podstawce do barwienia i zalać fioletem krystalicznym (załącznik 4 p. 2.4), tak aby

pokryć cały preparat. Po upływie $2 \div 3$ min preparat opłukać wodą i zalać płynem Lugola (załącznik 4 p. 2.5) na $1 \div 2$ min. Płyn Lugola zlać, a preparat przemywać 96-procentowym alkoholem etylowym tak długo, aż spływający ze szkiełka (trzymanego skośnie) alkohol przestanie się zabarwiać. Następnie przemyć wodą i nanieść roztwór fuksyny (załącznik 4 p. 2.6). Po upływie $15 \div 20$ s preparat wypłukać wodą, wysuszyć i oglądać pod immersją.

3. Interpretacja wyniku. Bakterie zachowujące fioletowe zabarwienie są Gram-dodatnie, natomiast bakterie zabarwione na czerwono są Gram-ujemne.

ZAŁĄCZNIK 4

ROZTWORY I PODŁOŻA

1. POSTANOWIENIA OGÓLNE

Do regulowania pH roztworów i podłoży używać 10-procentowego wodorotlenku sodowego i 10-procentowego kwasu solnego.

Do przygotowania roztworów i podłoży mikrobiologicznych stosować odczynniki odpowiadające czystości cz.d.a.

2. ROZTWORY PODSTAWOWE I BARWNIKI

2.1. Płyn Ringera

Woda destylowana $1000,0\text{ cm}^3$.

Chlorek sodowy 9,0 g.

Chlorek potasowy 0,42 g.

Chlorek wapniowy bezwodny 0,24 g
lub

Chlorek wapniowy sześciowodny 0,48 g.

Węglan sodowy jednozasadowy 0,20 g.

Składniki rozpuścić w wodzie przez ogrzewanie w parze bieżącej przez 15 min. Następnie rozcieńczyć czterokrotnie: 1 część uzyskanego roztworu zmieszać z 3 częściami wody destylowanej i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min.

2.2. Płyn do rozcieńczeń

Chlorek sodowy 8,5 g.

Pepton 1,0 g.

Woda destylowana do 1000,0 cm³.

Składniki rozpuścić w wodzie, pH doprowadzić do 7,3 ± 0,1, zagotować, przesączyć. Rozlać do kolb i sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min.

2.3. Mieszanka odtłuszczająca. Zmieszać równe objętości chloroformu i eteru. Przechowywać w butelce z ciemnego szkła.

2.4. Fiolet krystaliczny

R o z t w ó r A

Fiolet krystaliczny 0,4 g.

Alkohol etylowy 96-procentowy 10,0 cm³.

R o z t w ó r B

Fenol, roztwór wodny 1-procentowy 100,0 cm³.

Zmieszać roztwory A i B.

2.5. Płyn Lugola

Woda destylowana 300,0 cm³.

Jod 10 g.

Jodek potasowy 20 g.

Jodek potasowy rozpuścić w kilku cm³ wody, dodać jod i po jego całkowitym rozpuszczeniu uzupełnić pozostałą wodą. Do identyfikacji drobnoustrojów rozkładających skrobię stosować płyn Lugola rozcieńczony w stosunku 1:1.

2.6. Fuksyna fenolowa

R o z t w ó r A

Fuksyna zasadowa 0,3 g.

Alkohol etylowy 96-procentowy 10,0 cm³.

R o z t w ó r B

Fenol, roztwór wodny 5-procentowy 100,0 cm³.

Zmieszać roztwory A i B. Do barwienia używać roztwór fuksyny rozcieńczony wodą destylowaną 10 ÷ 20-krotnie.

2.7. Odczynnik Kovácsa (do wykrywania indolu)

p-Dwumetyloaminobenzaldehyd 5,0 g.

Alkohol amyłowy 96-procentowy 75,0 cm³.

Kwas solny stężony 25,0 cm³.

Aldehyd rozpuścić w alkoholu, ogrzewając w temperaturze 55°C. Oziębic i dodać kwas. Przechowywać w ciemnej butelce w temperaturze około 4°C.

2.8. Emulsja żółtka jaja. Jajko starannie wymyć, opłukać kilkakrotnie pod bieżącą wodą, wytrzeć do sucha czystą ściereczką lub kawałkiem ligniny, następnie powierzchnię jaja, pod którą znajduje się komora powietrza, przetrzeć kawałkiem waty lub ligniny zwilżonej skażonym alkoholem i opalić. Przy użyciu jałowego skalpela nadłuc skorupkę znajdującą się nad komorą powietrza i jałową pipetą pojemności 10 cm³ usunąć z jajka białko. Powiększyć otwór w skorupce, odłamu-

jąc część skorupki jałową pincetą i wpuścić żółtko do jałowego cylindra pomiarowego pojemności 100 cm³. Dodać ilość płynu fizjologicznego, w przybliżeniu równą objętości żółtka. Za pomocą jałowego pręcika szklanego rozbić starannie żółtko i dobrze wymieszać z fizjologicznym roztworem soli, a następnie przelać do jałowej kolbki. Wszystkie czynności wykonywać z zachowaniem warunków jałowości. Uzyskaną emulsję żółtka jaja sprawdzić na jałowość, posiewając 1 cm³ na agar bulionowy przygotowany wg p. 3.2. Wysiew inkubować w temperaturze 20°C przez 72 h. Do każdego oznaczenia należy przygotować świeżą emulsję żółtka jaja.

2.9. Roztwór siarczanu polimyksyny B.

Do fiołki z polimyksyną (fiolka zawiera 500000 j. polimyksyny co odpowiada 50 mg) wlać 5 cm³ jałowej destylowanej wody i dobrze wymieszać. Wszystkie czynności wykonywać z zachowaniem warunków jałowości.

2.10. Roztwór zieleni brylantowej 0,1, 0,5 i 0,05-procentowy. 0,1 0,5 lub 0,05 g zieleni brylantowej wsypać do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³. Rozpuścić w około 50 cm³ wody destylowanej, dobrze wymieszać i dopełnić wodą destylowaną do kreski. Przesączyć przez sączek z bibuły do butelki z ciemnego szkła.

2.11. Fuksyna zasadowa, roztwór alkoholowy 3-procentowy.

3 g fuksyny krystalicznej zasadowej wsypać do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³, rozpuścić w około 50 cm³ alkoholu etylowego 96-procentowego i dopełnić alkoholem etylowym do kreski. Otrzymany 3-procentowy roztwór alkoholowy fuksyny zasadowej przetrzymać przez 24 h w cieplarni w temperaturze 30°C, następnie przesączyć przez sączek z bibuły do butelki z ciemnego szkła.

2.12. Siarczyn sodowy, roztwór 10- i 20-procentowy.

10 lub 20 g siarczynu sodowego bezwodnego wsypać do jałowej kolby lub butelki i wlać 80 cm³ jałowej wody destylowanej, dobrze wymieszać, następnie gotować 10 ÷ 15 min na łaźni wodnej. Przechowywać w temperaturze 4 ÷ 8°C nie dłużej niż tydzień.

3. PODŁOŻA BAKTERIOLOGICZNE

3.1. Bulion zwykły. Przygotować z „Suchego bulionu mięsnego“ produkowanego przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem zamieszczonym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

Wyciąg mięsny 1000,0 cm³.

Pepton 10,0 g.

Chlorek sodowy 5,0 g.

Przygotowanie wyciągu mięsnego: mięso wołowe w ilości 1000 g bez kości, oczyszczone z tłuszczu i ścięgien, zemleć w maszynce i zalać 2000 cm³ wody wodociągowej.

Odstawić na noc do chłodni (około +4°C). Następnego dnia gotować przez 30 min, przesączyć przez płótno, dopełnić wodą destylowaną do 2000 cm³ i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min.

Przed użyciem przesączyć zimny wyciąg przez bibułę.

Przygotowanie podłoża: rozpuścić w wyciągu mięsnym pepton i chlorek sodowy. Doprowadzić pH do $7,8 \pm 0,1$, gotować kilkanaście minut, przesączyć przez bibułę i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Końcowe pH powinno wynosić $7,5 \pm 0,1$.

3.2. Agar bulionowy zwykły

Bulion zwykły (p. 3.1) $1000,0 \text{ cm}^3$.

Agar 15,0 g.

Do 1000 cm^3 bulionu zwykłego dodać agar i ogrzewać w parze bieżącej aż do rozpuszczenia agaru. Następnie przesączyć na gorąco przez sączek z waty, rozlać miarowo do kolb i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min. Końcowe pH podłoża powinno wynosić $7,6 \pm 0,1$.

3.3. Agar z ekstraktem drożdżowym

Woda destylowana $1000,0 \text{ cm}^3$.

Ekstrakt drożdżowy 2,5 g.

Pepton 5,0 g.

Agar 15,0 g.

Składniki rozpuścić w wodzie na gorąco, doprowadzić pH do $7,5 \pm 0,1$ i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Końcowe pH powinno wynosić $7,1 \pm 0,1$.

3.4. Podłoże z żółcią i zielenią brylantową

Woda destylowana do $1000,0 \text{ cm}^3$.

Ekstrakt żółci wołowej w proszku 20,0 g.

Zieleń brylantowa, roztwór wodny 0,1-procentowy (p. 2.10) $13,3 \text{ cm}^3$.

Pepton i laktozę rozpuścić w około 750 cm^3 wody destylowanej, dodać ekstrakt żółci. Ustalić pH pożywki do wartości $7,3 \pm 0,1$, zagotować, przesączyć przez bibułę.

Dodać roztwór zieleni brylantowej, uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm^3 . Rozlać po 10 cm^3 do jałowych probówek z rurkami fermentacyjnymi Durhama i wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Końcowe pH pożywki powinno wynosić $7,2 \pm 0,1$.

3.5. Podłoże Endo (modyfikacja PZH)

Wyciąg mięsny (p. 3.1) $1000,0 \text{ cm}^3$.

Pepton 10,0 g.

Chlorek sodowy 5,0 g.

Agar 20,0 g.

Laktoza 10,0 g.

Fuksyna zasadowa, roztwór alkoholowy 3-procentowy (p. 2.11) $10,0 \text{ cm}^3$.

Siarczyny sodowy bezwodny, roztwór 10-procentowy (2.12) około $20,0 \text{ cm}^3$.

Do 1000 cm^3 wody destylowanej dodać pepton i chlorek sodowy, a następnie 500 cm^3 bulionu zwykłego (p. 3.1). Pepton i chlorek sodowy rozpuścić uprzednio na gorąco w niewielkiej ilości wody. Dodać agar i ogrzewać do roztopienia agaru w parze bieżącej.

Do uzyskanego w ten sposób agaru bulionowego dodać laktozę rozpuszczoną w niewielkiej ilości wody destylowanej, dobrze wymieszać i rozlać miarowo do butelek lub kolb. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Końcowe pH podłoża powinno wynosić $7,4 \pm 0,1$. Przed rozlaniem na płytki do agaru buliono-

wego z laktozą na każde 100 cm^3 podłoża dodać, zachowując warunki jałowości, 1 cm^3 alkoholowego roztworu fuksyny zasadowej. Podłoże dobrze wymieszać i następnie dodać ostrożnie, ciągle mieszając, po 1 cm^3 roztworu siarczyny sodowego, aż do odbarwienia fuksyny do koloru blad różowego.

Do odbarwienia fuksyny dodanej do 100 cm^3 podłoża powinno wystarczyć około $2 \div 4 \text{ cm}^3$ 10-procentowego roztworu siarczyny sodowego. Podłoże rozlać, zachowując warunki jałowości do jałowych płytek. Płytki z podłożem przechowywać w lodówce nie dłużej niż 2 dni.

3.6. Woda peptonowa (do próby na indol)

Woda destylowana $1000,0 \text{ cm}^3$.

Pepton 10,0 g.

Rozpuścić w wodzie pepton przez gotowanie. Doprowadzić pH do 7,2, zagotować, przesączyć przez bibułę, rozlać do małych probówek i sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Po przygotowaniu sprawdza się za pomocą odczynnika Kovácsa, czy samo podłoże nie daje reakcji na indol.

3.7. Podłoże agarowe z czerwienią fenolową, żółtkiem jaja i polimyksyną wg Mossela

Ekstrakt mięsny 1,0 g.

Pepton 10,0 g.

D-mannitol 10,0 g.

Chlorek sodowy 10,0 g.

Czerwień fenolowa 0,025 g.

Agar 15,0 g.

Woda destylowana $900,0 \text{ cm}^3$.

50-procentowa emulsja żółtka jaja (p. 2.8).

Polimyksyna B (polimyxin B-sulphat) (p. 2.9).

Rozpuścić wszystkie składniki w 900 cm^3 wody destylowanej. Rozlać miarowo do butelek po 500 cm^3 i wyjaławiać w 121°C przez 15 min. Końcowe pH podłoża powinno wynosić $7,2 \pm 0,1$. Przed użyciem do 500 cm^3 roztopionego podłoża i ochłodzonego do temperatury 45°C dodać 55 cm^3 50-procentowej emulsji żółtka w płynie fizjologicznym ogrzanej do 50°C i $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu siarczynu polimyksyny B.

Dobrze wymieszać i rozlać do jałowych płytek po około $12 \div 15 \text{ cm}^3$ do każdej. Po skrzepnięciu podłoża, płytki wstawić na 1 h do cieplarki o temperaturze $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dla podsuszenia podłoża.

3.8. Agar z krwią

Bulion zwykły (p. 3.1) $1000,0 \text{ cm}^3$.

Agar 15,0 g.

Krew barania jałowa, odwłókniona $100,0 \text{ cm}^3$.

W bulionie rozpuścić agar, doprowadzić pH do $7,6 \pm 0,1$.

Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Rozpuszczony i ostudzony do temperatury 50°C agar zmieszać z krwią baranią i rozlać na płytki. Przechowywać w lodówce.

3.9. Bulion z żelatyną — słupki

Bulion zwykły $500,0 \text{ cm}^3$.

Żelatyna (do celów bakteriologicznych) 75,0 g.

Do bulionu dodać żelatynę. Roztopić na łaźni wodnej często mieszając. Doprowadzić pH do $7,5 \pm 0,1$. Rozlać po około 10 cm^3 probówki. Wyjaławiać w temperaturze

117°C w ciągu 20 min. Po wyjęciu z autoklawu pozostawić probówki w pozycji pionowej do czasu skrzepnięcia żelatyny. Przechowywać w lodówce.

3.10. Agar bulionowy z żółtkiem jaja (podłoże zastępcze)

Bulion zwykły (p 3.1) 90,0 cm³.

Agar 1,5 g.

Chlorek sodowy 0,5 g.

50-procentowa emulsja żółtka jaja (p. 2.8) 10,0 cm³.

Do 90 cm³ bulionu dodać chlorek sodowy i agar. Ogrzewać w parze bieżącej, aż do roztopienia agaru. Wartość pH podłoża powinna wynosić 7,2 ± 0. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Po ostudzeniu do temperatury około 50°C, dodać, zachowując warunki jałowości, 10 cm³ emulsji żółtka jaja. Dobrze wymieszać i rozlać do jałowych płytek po około 12 ÷ 15 cm³ do każdej. Po skrzepnięciu podłoża płytki wstawić na 1 h do ciepłarki o temperaturze 37 ± 1°C w celu podsuszenia podłoża.

3.11. Agar ze skrobią wg Waksmana

Woda destylowana 500,0 cm³.

Fosforan dwupotasowy (K₂HPO₄) 1,0 g.

Chlorek sodowy 1,0 g.

Siaraczan amonu (NH₄)₂SO₄ 2,0 g.

Węglan wapniowy 5,0 g.

Agar 20,0 g.

Skrobia ziemniaczana, roztwór wodny 2-procentowy 500,0 cm³.

10 g skrobi ziemniaczanej zawiesić w 800 cm³ wody destylowanej i ogrzewać na łaźni wodnej przy ciągłym mieszaniu. Odparować wodę do objętości 500 cm³. W wodzie destylowanej rozpuścić sole, z wyjątkiem węglanu wapniowego, doprowadzić pH do 6,2, po czym dodać węglan wapniowy zawieszony w 10 cm³ wody i roztwór skrobi. Podłoże dobrze wymieszać i rozlać do mniejszych naczyń. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 30 min.

3.12. Zbuforowana woda peptonowa

Woda destylowana 1000,0 cm³.

Pepton 10,0 g.

Chlorek sodowy 5,0 g.

Fosforan sodu dwuzasadowy 9,0 g.

Fosforan sodu jednozasadowy 1,5 g.

Rozpuścić składniki w wodzie przez gotowanie. Doprowadzić pH do 7,2. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min.

3.13. Podłoże z czterotianem sodowym

Bulion zwykły (p. 3.1) 900,0 cm³.

Węglan wapniowy 45,0 g.

Jod w roztworze wodnym jodku potasowego 20,0 cm³.

Tiosiarczan sodowy (Na₂S₂O₃·5H₂O), roztwór wodny 50-procentowy 100,0 cm³.

Ekstrakt żółci wołowej (roztwór) 50,0 cm³.

Zieleń brylantowa, roztwór wodny 0,1-procentowy (p. 2.10). 10,0 cm³.

Przygotowanie składników:

a) węglan wapniowy wyjaławiać, w kolbie pojemności 2 l, w suszarce o temperaturze 160°C przez 60 min.

b) jod w jodku potasowym — 25 g jodku potasowego rozpuścić w 20 cm³ wody destylowanej i dodać 20 g jodu: po rozpuszczeniu jodu dopełnić wodą destylowaną do 100 cm³,

c) tiosiarczan sodowy — 50 g tiosiarczanu sodowego rozpuścić w 100 cm³ wody destylowanej i wyjałować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min,

d) żółć wołowa — 10 g ekstraktu żółci wołowej rozpuścić w 100 cm³ wody destylowanej i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min.

Przygotowanie podłoża: do kolby z węglanem wapniowym dodać w sposób jałowy bulion, roztwór jodu, tiosiarczan sodowy, żółć i zieleń brylantową, dokładnie wymieszać i rozlać do kolb po około 50 cm³. Wyjałować dwukrotnie w parze bieżącej przez 20 min.

3.14. Podłoże SF

Woda destylowana 1000,0 cm³.

Kwaśny selenin sodowy 4,0 g.

Pepton 5,0 g.

Fosforan jednosodowy (NaH₂PO₄) 3,0 g.

Fosforan dwusodowy (Na₂HPO₄·12 H₂O) 16,0 g.

Laktoza 4,0 g.

Składniki rozpuścić na gorąco, doprowadzić pH 7,0 ÷ 7,1, zagotować, przesączyć przez bibułę i rozlać do jałowych kolb po około 50 cm³. Gotować w parze bieżącej przez 20 min. Nie wyjaławiać pod ciśnieniem i nie gotować dłużej, gdyż powstaje czerwony osad, który wpływa ujemnie na jakość podłoża.

3.15. Podłoże agarowe z zielenią brylantową i czerwieni fenolową (Edel i Kampelmacher)

Podłoże podstawowe 900,0 cm³.

Roztwór cukrowy czerwieni fenolowej 100,0 cm³.

Zieleń brylantowa, roztwór 0,5-procentowy (p. 2.10) 1,0 cm³.

Przygotowanie składników:

a) Podłoże podstawowe

Woda destylowana 900,0 cm³.

Ekstrakt mięsny 4,0 g.

Pepton 10,0 g.

Chlorek sodowy 3,0 g.

Ortofosforan dwusodowy (Na₂HPO₄) 0,8 g.

Ortofosforan jednosodowy (NaH₂PO₄) 0,6 g.

Agar 12,0 g.

Składniki rozpuścić przez ogrzewanie, doprowadzić pH do 7,0 i sterylizować w temperaturze 121°C przez 15 min.

b) Roztwór cukrowy czerwieni fenolowej

Laktoza 10,0 g.

Sacharoza 10,0 g.

Czerwień fenolowa 0,09 g.

Woda destylowana do 100,0 cm³.

Składniki rozpuścić w wodzie w łaźni o temperaturze 70°C przez 20 min. Ochłodzić do temperatury 55°C i natychmiast używać.

Przygotowanie podłoża:

Dodać w sposób jałowy roztwór zieleni brylantowej 0,5-procentowy w ilości 1 cm³ do 100 cm³ roztworu cukrowego czerwieni fenolowej, schłodzonego do temperatury 55°C, zmieszać i całość dodać do 900 cm³ podłoża podstawowego o temperaturze 55°C. Wymieszać

dokładnie i rozlać do jałowych płytek. Przed użyciem płytek z podłożem do posiewów należy podłoże osuszyć, wstawiając płytki, otwarte dnem do góry, do cieplarki o temperaturze $50 \div 55^{\circ}\text{C}$ na 30 min. Przygotowane płytki niepodsuszone nie mogą być przechowywane dłużej niż 4 h w temperaturze pokojowej lub jeden dzień w temperaturze 4°C .

3.16. Podłoże SS. Podłoże przygotować z „Suchego podłoża agarowego SS“ produkowanego przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem podanym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

Bulion zwykły (p. 3.1) $1000,0 \text{ cm}^3$.

Tiosiarczan sodowy ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 8,5 g.

Cytrynian sodowy ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8,5 g.

Dezoksyholan sodowy 8,5 g.

Agar 20,0 g.

Cytrynian żelazowy ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 1,0 g.

Laktoza 10,0 g.

Czerwień obojętna, roztwór 1-procentowy $2,6 \text{ cm}^3$.

Zieleń brylantowa, roztwór 0,05-procentowy $0,66 \text{ cm}^3$.

W gorącym bulionie rozpuścić tiosiarczan sodowy, cytrynian sodowy, dezoksyholan sodowy i agar. Doprowadzić pH do 7,6, przesączyć, dodać laktozę i cytrynian żelazowy, zagotować, ponownie doprowadzić pH do 7,6. Rozlać miarowo do kolb i sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min. Po wyjęciu z autoklawu dodać barwniki, dokładnie wymieszać i rozlać na płytki. Końcowe pH powinno wynosić 7,2.

3.17. Podłoże Mac Conkey'a. Podłoże przygotować z „Suchego podłoża Mac Conkey'a“ produkowanego przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem podanym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

Woda destylowana $1000,0 \text{ cm}^3$.

Pepton 20,0 g.

Laktoza 10,0 g.

Chlorek sodowy 5,0 g.

Dezoksyholan sodowy 1,5 g.

Agar 17,0 g.

Czerwień obojętna, roztwór 1-procentowy 3 cm^3 .

Fiolet krystaliczny, roztwór 0,1-procentowy 1 cm^3 .

Wszystkie składniki, oprócz czerwieni obojętnej, fioletu krystalicznego i laktozy, rozpuścić w wodzie gorącej doprowadzić pH do 7,3 zagotować, przesączyć przez watę, dodać barwniki i laktozę, wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Rozlać na płytki, pH końcowe powinno wynosić 7,1.

3.18. Podłoże Wrzoska

Wyciąg z wątroby $1000,0 \text{ cm}^3$.

Pepton 10,0 g.

Chlorek sodowy 5,0 g.

Glukoza 5,0 g.

Kostki wątroby około $0,5 \text{ cm}^3$.

Przygotowanie wyciągu z wątroby: wątrobę pokrajaną w duże kawałki gotować przez pół godziny z wodą

destylowaną w stosunku 1 kg wątroby na 2200 cm^3 wody, wyciąg przesączyć przez płótno i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min, wyciąg z wątroby można zastąpić wyciągiem mięsnym.

Przygotowanie wątroby w kostkach: wątrobę ugotowaną w podany sposób pokrajać w kostkę, zalać 0,85-procentowym roztworem chlorku sodowego i wyjałowić w temperaturze 121°C przez 20 min. Przed sporządzeniem podłoża Wrzoska należy kostki wątroby spłukać na sicie wodą bieżącą.

Przygotowanie właściwego podłoża: rozpuścić pepton i chlorek sodowy w wyciągu, doprowadzić pH do 8,2, zagotować, sprawdzić pH i przesączyć przez bibułę. Dodać glukozę, rozlać do probówek, do których uprzednio włożono pokrajaną w kostkę wyjałowioną wątrobę (po 2 kostki na probówkę), pokryć płynną jałową parafiną. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min lub trzykrotnie w aparacie Kocha, pH końcowe powinno wynosić $7,5 \pm 0,1$.

3.19. Podłoże Wilson-Blaira (dla beztlenowców)

Agar cukrowy (agar bulionowy zwykły (3.2)+1-procent glukozy) $1000,0 \text{ cm}^3$.

Chlorek żelazowy, roztwór 8-procentowy $10,0 \text{ cm}^3$.

Wodorotlenek sodowy, roztwór 10-procentowy $6,0 \text{ cm}^3$.

Siarczyn sodowy, roztwór 20-procentowy (p. 2.12) $100,0 \text{ cm}^3$.

Agar na bulionie z glukozą rozlać do kolb po 100 cm^3 i wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min.

Oddzielnie przygotować i wyjałowić w temperaturze 117°C przez 30 min roztwory chlorku żelazowego, wodorotlenku sodowego i siarczynu sodowego.

Przed użyciem agar rozpuścić i ostudzić do temperatury 50°C , dodać przygotowane odczynniki w odpowiednich ilościach i dokładnie wymieszać, rozlać na płytki.

3.20. Agar wodny

Woda destylowana $1000,0 \text{ cm}^3$.

Agar 20,0 g.

Agar rozpuścić w wodzie. Wyjałowić w temperaturze 121°C przez 20 min.

3.21. Podłoże agarowe z ekstraktem drożdżowym, glukozą i chloramphenicolem

Ekstrakt drożdżowy 5,0 g.

Glukoza 20,0 g.

Agar 15,0 g.

Woda destylowana $1000,0 \text{ cm}^3$.

Chloramphenicol 100,0 mg.

Wszystkie składniki rozpuścić w wodzie destylowanej. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 15 min, pH po sterylizacji powinno wynosić $6,6 \pm 0,1$.

3.22. Podłoże Sabourand z glukozą. Przygotować z suchego „Podłoża Sabouraud“ produkowanego przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem zamieszczonym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym przygotować je w następujący sposób:

Woda destylowana 1000,0 cm³.
Pepton 10,0 g.
Glukoza 40,0 g.
Agar 15,0 g.

Rozpuścić składniki w wodzie destylowanej, doprowadzić pH do 5,9 ±0,1. Rozlać do kolb.
Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min.
Końcowe pH podłoża powinno wynosić 5,6.

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — SPOŁEM CZSS Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego, Warszawa.

2. Istotne zmiany w stosunku do BN-76/8070-06

- a) wyeliminowano próbę termostatową w odniesieniu do wyrobów ciastkarskich nietrwałych w opakowaniach jednostkowych,
- b) ujednotcono rodzaj rozcieńczalnika do przygotowywania rozcieńczenia wyjściowego (1:10) i do dalszych rozcieńczeń dziesiętnych,
- c) zmodyfikowano sposób mieszania materiału przy sporządzaniu rozcieńczeń dziesiętnych;
wprowadzono ujednoczony sposób obliczania (zaokrąglania) i podawania wyników;
- d) wprowadzono nowe podłoże dla oznaczania liczby przetrwalników *Bacillus cereus*,
- e) zmieniono wielkość próbki (z 5 na 25 g) i zmodyfikowano me-

todykę oznaczania pałeczek z grupy Salmonella,

- f) wprowadzono nowe podłoże dla oznaczania drożdży i pleśni.

3. Normy związane

PN-64/A-04023 Artykuły żywnościowe. Wykrywanie drobnoustrojów z rodziny Enterobacteriaceae.

PN-75/A-04024 Produkty żywnościowe. Wykrywanie i ilościowe oznaczanie gronkowców chorobotwórczych (koagulazo-dodatnich).

PN-72/A-74001 Przetwory zbożowe. Pobieranie próbek

PN-70/A-74104 Pieczywo. Pobieranie próbek

PN-78/A-74250 Wyroby i półprodukty ciastkarskie. Pobieranie próbek i kontrola jakości.

4. Autorzy projektu normy — mgr Mieczysława Janik, dr inż. Elżbieta Staszewska — SPOŁEM CZSS Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego, Warszawa.