

ZDROJOWNICTWO I PRODUKCJA UZDROWISKOWA	N O R M A   B R A N Ż O W A	<b>BN-90</b>
	<b>Pasty borowinowe lecznicze</b> Wspólne wymagania i badania	<b>9567-01</b>
		Zamiast BN-72/9567-01
		Grupa katalogowa 1485

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy są wymagania ogólne, fizycznochemiczne, chemiczne, mikrobiologiczne i eksploatacyjne dotyczące leczniczych past borowinowych.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Postanowienia normy obowiązują w produkcji, obrocie oraz przy wykorzystaniu past borowinowych do zabiegów leczniczych.

## 2. NAZWY I OKREŚLENIA

**2.1. pasta borowinowa lecznicza** — produkt otrzymywany przez zmieszanie mechaniczne rozdrobnionego naturalnie wilgotnego surowca (borowiny) wodą zdatną do picia i na potrzeby gospodarcze.

Ilość dodanej wody uzależniona jest od naturalnej zdolności chłonięcia wody przez daną borowinę.

**2.2. borowina** — surowiec naturalny wg BN-74/9560-04.

**2.3. chłonność wodna borowiny** — ilość ml wody jaką pochłania borowina w przeliczeniu na 1 g suchej masy.

**2.4. borowina naturalnie wilgotna** — surowiec o zawartości wody charakterystycznej dla naturalnych warunków złożowych nie poddawany odwodnieniu lub suszeniu.

## 3. WYMAGANIA

**3.1. Wymagania ogólne.** Pasta borowinowa powinna stanowić jednolitą masę barwy brunatnoczarnej lub czarnej z połyskiem, bez ziarnistości, o konsystencji gęstej papki. Na powierzchni masy nie może się oddzielać warstwa wody, a preparat powinien umożliwiać jego rozprowadzenie na powierzchni skóry gładką cienką warstwę.

**3.2. Wymagania fizyczne, chemiczne i mikrobiologiczne.** Szczegółowe wymagania fizyczne i chemiczne są uzależnione od typu złoża torfowego, z którego pochodzi surowiec przeznaczony do produkcji. Norma przedmiotowa dla każdego produktu powinna określać następujące wymagania:

a) wartość odczynu (pH) wyciągu wodnego z pasty,

b) zawartość wody,  $\%(m/m)$ ,

c) zawartość substancji nieorganicznych w przeliczeniu na suchą masę,  $\%(m/m)$ ,

d) zawartość substancji organicznych w przeliczeniu na suchą masę,  $\%(m/m)$ ,

e) objętość sedymentacyjna w ml na 1 g suchej masy borowinowej.

Wspólne wymagania dotyczące past borowinowych z różnych typów złóż — wg tabl. 1.

Tablica 1

Rodzaj normalizowanego parametru	Wymagania
Zawartość ziaren stanowiących masę stałą pasty o średnicy powyżej 0,5 mm, nie więcej niż, %	1
Miano coli	$\geq 1$
Miano <i>Clostridium perfringens</i>	$\geq 0,1$

**3.3. Trwałość.** Okres przydatności pasty borowinowej do zabiegów leczniczych, pakowanej i przechowywanej wg rozdz. 4 wynosi 12 miesięcy.

## 4. PAKOWANIE, PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT

### 4.1. Pakowanie

**4.1.1. Opakowanie jednostkowe.** Pastę borowinową należy pakować do naczyń ze szkła lub tworzyw sztucznych po 1 kg, szczelnie zamkniętych, zapewniających zachowanie wymaganej wilgotności.

Dopuszcza się inny rodzaj oraz inną pojemność opakowania pod warunkiem, że zabezpieczona zostanie wymagana jakość produktu.

Na każdym opakowaniu należy umieścić etykietę zawierającą co najmniej następujące dane:

a) nazwę lub znak producenta,

b) oznaczenie według normy przedmiotowej,

c) nazwę złoża torfu leczniczego (borowiny), z którego pochodzi surowiec do produkcji pasty i ogólną charakterystykę właściwości fizycznych i chemicznych,

d) datę produkcji,

e) masę netto,

f) okres przydatności do użycia,

g) warunki przechowywania, m.in. temperaturę,

Zgłoszona przez Instytut Medycyny Uzdrawiskowej  
Ustanowiona przez Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej dnia 7 maja 1990 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 4 kwietnia 1991 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 2/1991 poz. 5)

- h) sposób użycia,  
i) wskazania lecznicze.

**4.1.2. Opakowania zbiorcze.** Opakowania jednostkowe należy pakować w kartony lub pudła wg PN-73/O-79402 stanowiące opakowania transportowe.

**4.2. Przechowywanie.** Pastę borowinową leczniczą należy przechowywać w opakowaniach wg 4.1, w temperaturze  $4 \div 20^{\circ}\text{C}$ .

**4.3. Transport.** Transport powinien się odbywać w warunkach zabezpieczających produkt przed zamrażaniem i nadmiernym ogrzaniem.

## 5. BADANIA

### 5.1. Rodzaje badań

- a) badania cech zewnętrznych (3.1),  
b) oznaczenie uziarnienia masy (3.2 tabl. 1),  
c) badania właściwości fizycznych i chemicznych (3.2a) ÷ e)),  
d) badania mikrobiologiczne pasty (3.2 tabl. 1).

**5.2. Wielkość partii produktu.** Za jedną partię produktu należy przyjąć najwyżej 1000 opakowań jednostkowych.

**5.3. Pobieranie próbek do badań.** Z każdej partii pasty, w zależności od liczby wyprodukowanych opakowań, należy pobrać w sposób losowy liczbę opakowań wg tabl. 2.

Tablica 2

Liczba opakowań w partii	Liczba opakowań, które należy wybrać do badań
do 250	5
251 ÷ 1000	10

Próbkę do badań stanowi całe, nie otwarte uprzednio, oryginalne opakowanie pasty. Zawartość każdego losowo wybranego opakowania należy dobrze wymieszać i pobrać z niego średnią próbkę laboratoryjną o masie co najmniej 300 g. Dopuszcza się pobieranie próbek u producenta w trakcie pakowania. W tym przypadku należy w równomiernych odstępach czasu pobrać 5 próbek, każdą o masie co najmniej 200 g. Pobrane próbki należy wymieszać i z tak otrzymanej próbki ogólnej pobrać średnią próbkę laboratoryjną o masie co najmniej 400 g.

Średnią próbkę laboratoryjną należy podzielić na dwie równe części, z których jedną należy przeznaczyć do badań, a drugą umieścić w szczelnym naczyniu i przechowywać do analizy rozjemczej przez 12 miesięcy od daty wysyłki.

### 5.4. Opis badań

**5.4.1. Badanie cech zewnętrznych.** Badania te należy przeprowadzić sprawdzając postać, barwę i konsystencję pasty przy normalnym oświetleniu dziennym. Zapach pasty należy określić natychmiast po otwarciu opakowania i wymieszaniu jego zawartości.

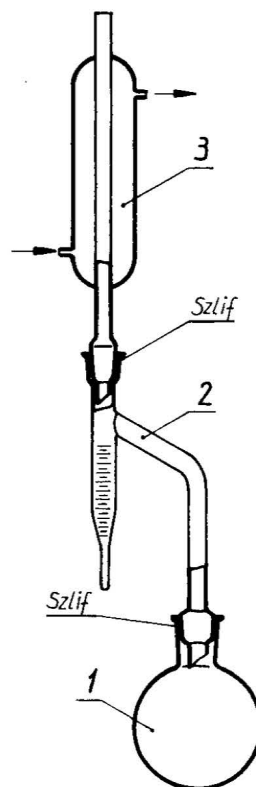
**5.4.2. Badanie uziarnienia.** 10 g pasty borowinowej wymieszać mieszadłem mechanicznym z 200 ml wody w zlewce pojemności 300 ml. Po mieszaniu 10 ÷ 15 min zawartość zlewki przelać przez sito o boku oczek kwa-

dratowych 0,5 mm, a pozostałość na sicie przemyć około 800 ml wody. Pozostałość na sicie zebrać do uprzednio zważonego szkiełka wagowego, wysuszyć i zważyć. Zważona masa pomnożona przez 10 stanowi procentową zawartość ziaren o średnicy powyżej 0,5 mm w analizowanej pastce borowinowej.

**5.4.3. Oznaczanie odczynu wyciągu wodnego z pasty.** Odważyć 20,0 g pasty borowinowej do zlewki pojemności 200 ml, dodać 40 ml wody destylowanej, wymieszać przez 10 min za pomocą mieszadła magnetycznego, a następnie odsączyć przez lejek Büchnera, stosując sącdek z bibuły do sączenia. Zmierzyć na pehametrze pH przesączu.

### 5.4.4. Oznaczanie zawartości wody

#### 5.4.4.1. Aparatura — wg rysunku.



PN-90/9567-01

**5.4.4.2. Odczynniki.** Ksyloł lub toluen cz., wyklócanie z wodą w celu nasycenia.

**5.4.4.3. Wykonanie oznaczania.** Odważyć 10,0 g pasty borowinowej na wadze technicznej, umieszczając próbkę na szkiełku zegarkowym wyłożonym sączkiem z bibuły do sączenia. Po odważeniu zwinąć sącdek i wrzucić próbkę do kolby zestawu do oznaczania zawartości wody. Wilgotne szkiełko osuszyć dodatkowym sączkiem i dołączyć do próbki w kolbie.

Następnie wlać do kolby 100 ml ksylołu lub toluenu wg 5.4.4.2, połączyć kolbę z odbieralnikiem mierniczym, na który nałożona jest chłodnica zwrotna. Włączyć obieg wody w chłodnicy, ogrzać zawartość kolby do wrzenia cieczy i następnie utrzymywać ciecz w stanie łagodnego wrzenia przez 30 min. Następnie zwiększyć płomień palnika i nadal ogrzewać zawartość kolby przez 15 min. Krótko, przed zakończeniem ogrzewania

zamknąć dopływ wody do chłodnicy tak, aby para ksyleny obmyła dobrze resztki wody skroplonej w przewodach, następnie odstawić palnik i po ochłodzeniu aparatu do temperatury pokojowej odczytać poziom wody w milimetrach na podziałce biurety.

Zawartość wody w badanej próbce odpowiada na skali biurety zawartości wody w preparacie borowinowym w procentach wagowych.

**5.4.4.4. Wyniki.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch oznaczeń różniących się między sobą najwyżej o 1%.

**5.4.5. Oznaczanie zawartości substancji nieorganicznych**

**5.4.5.1. Wykonanie oznaczania.** Odważyć na wadze analitycznej około 10 g pasty borowinowej w parownicy platynowej uprzednio wyprażonej do stałej masy i suszyć w suszarce przez około 1,5 h w temperaturze 105°C. Następnie parownicę przenieść do pieca elektrycznego i ostrożnie prażyć jej zawartość. Po zwęgleniu próbki ostudzić parownicę, dodać kilka ml wody i szklaną pałeczką dokładnie rozgnieść wszystkie grudki. Oplukać pałeczkę niewielką ilością wody do parownicy, parownicę należy umieścić na łaźni wodnej i odparować zawartość do sucha.

Następnie przenieść parownicę ponownie do pieca elektrycznego i prażyć przez 2 h w temperaturze około 800°C. Parownicę ostudzić w ekzykatorze i zważyć na wadze analitycznej. Operację prażenia powtórzyć do uzyskania stałej masy.

Zawartość substancji nieorganicznych ( $x_1$ ) w przeliczeniu na suchą substancję obliczyć w procentach wg wzoru

$$x_1 = \frac{10000 \cdot m_1}{m(100 - w)} \quad (1)$$

w którym:

- $m_1$  — masa próbki po prażeniu, g,
- $m$  — masa próbki naturalnie wilgotnej, g,
- $w$  — zawartość wody w próbce wg 5.4.4.3, %.

**5.4.5.2. Wyniki.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch oznaczeń różniących się najwyżej o 0,5%.

**5.4.6. Oznaczanie zawartości substancji organicznych.** Zawartość substancji organicznych w paście borowinowej ( $x_2$ ) oblicza się w procentach wg wzoru

$$x_2 = 100 - x_1 \quad (2)$$

w którym  $x_1$  — zawartość substancji nieorganicznych obliczona wg 5.4.5.1, %.

**5.4.7. Oznaczanie objętości sedymentacyjnej**

**5.4.7.1. Wykonanie oznaczania.** Odważyć na wadze technicznej 10,0 g pasty, przenieść do zlewki pojemności 200 cm<sup>3</sup>, dodać 50 ÷ 60 ml wody podgrzanej do temperatury 40°C i mieszać mieszadłem mechanicznym przez 20 min. Następnie przenieść ilościowo zawartość zlewki do cylindra pomiarowego pojemności 100 ml z doszlifowanym korkiem i po podłączeniu go do pompy próżniowej odpowietrzyć mieszaniną do czasu, gdy przestaną wydzielać się z niej pęcherzyki po-

wietrza (1 ÷ 1,5 h). Następnie zamknąć cylinder doszlifowanym korkiem i odstawić na 14 dni. Po tym czasie odczytać na podziałce cylindra objętość w ml jaką zajmują osady pod wodą.

W przypadku niewystępowania po 14 dniach wyraźnie widocznej granicy faz (osady — woda), odczyt należy wykonać po kilku następnych dniach.

Objętość sedymentacyjną ( $X_3$ ) w ml w przeliczeniu na 1 g suchej substancji należy obliczyć wg wzoru

$$X_3 = \frac{10 \cdot a}{100 - w} \quad (3)$$

w którym:

- $a$  — objętość osadu odczytana na podziałce cylindra, ml,
- $w$  — zawartość wody w próbce wg 5.4.4.3, %.

**5.4.7.2. Wyniki.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch oznaczeń różniących się najwyżej o 1 ml.

**5.4.8. Oznaczanie miana *Clostridium perfringens***

**5.4.8.1. Zasada oznaczania.** Oznaczanie miana przeprowadza się na podłożu żelazowosiarczynowym (podłoże Wilson-Blaira). Wykorzystuje się zdolność *Clostridium perfringens* do redukcji siarczynu sodu do siarczku w obecności glukozy. Siarczek sodowy reaguje z jonami żelaza (II), tworząc wokół kolonii bakteryjnej czarne zabarwienie siarczku żelazowego.

Badania potwierdzające przeprowadza się na podłożu Wrzoska i mleku z lakmusem, a identyfikację — za pomocą testów biochemicznych.

**5.4.8.2. Odczynniki**

- a) Glukoza cz.,
- b) Chlorek żelazowy FeCl<sub>3</sub>, cz.d.a., roztwór 8%(m/m),
- c) Wodorotlenek sodowy, cz.d.a., roztwór 10%(m/m),
- d) Siarczyn sodowy, cz.d.a., roztwór 20%(m/m),
- e) Agar cz.
- f) Perton cz.
- g) Alkohol etylowy 96%(v/v),
- h) Fenol cz., roztwór wodny 1%(m/m).
- i) Alkoholowy roztwór lakmusa: 80 g lakmusa rozetrzeć w moździerzu, przenieść do zlewki pojemności 500 ml, dodać 150 ml alkoholu etylowego 40%(v/v) i ogrzewać 10 min. Zlać roztwór z nad osadu do cylindra pomiarowego pojemności 500 ml, a do pozostałego lakmusa dodać ponownie 150 ml alkoholu etylowego 40%(v/v) i gotować 1 min. Ponownie zlać płyn z nad osadu do cylindra. Roztwór w cylindrze uzupełnić alkoholem 40%(v/v) do objętości 300 ml i dodając kroplami kwas solny c(HCl) = 1 mol doprowadzić do purpurowego zabarwienia się roztworu w cylindrze.

j) Fenolowy roztwór fioleto krystalicznego: zmieszać 10 ml nasyconego alkoholowego roztworu fioleto krystalicznego i 100 ml roztworu fenolu 1%(m/m).

k) Płyn Lugola: odważyć w szkiełku wagowym 1,0 g jodu sublimowanego cz.d.a., dodać 2,0 g jodku potasowego cz.d.a. i 5 ml wody destylowanej. Po całkowitym rozpuszczeniu jodu przenieść ilościowo roztwór

do cylindra pomiarowego, popłukując zawartość szkiełka wodą destylowaną. Uzupełnić roztwór wodą destylowaną do objętości 300 ml.

l) Rozcieńczony fenolowy roztwór fuksyny zasadowej: 10 ml nasyconego alkoholowego roztworu fuksyny zasadowej zmieszać ze 100 ml roztworu fenolu 5%(m/m). Do barwienia stosować roztwór rozcieńczony fenolem 5%(m/m).

m) Płyn Ringera do rozcieńczenia: 9,00 g chlorku sodowego cz.d.a. + 0,42 g chlorku potasowego cz.d.a. + 0,48 g chlorku wapniowego cz.d.a. + 0,20 g wodorowęglanu sodowego cz.d.a. — rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min. Do badań używać płynu Ringera czterokrotnie rozcieńczonego.

#### 5.4.8.3. Podłoża i roztwory

a) Agar zwykły: w 100 ml wyciągu mięsnego rozpuścić 10 g peptonu, 20 g agaru i 5 g chlorku sodowego, a następnie doprowadzić pH do wartości 7,8 ÷ 8,0. Roztwór gotować kilkanaście minut, przesączyć przez watę i rozlać do butelek lub próbek. Sterylizować w 121°C przez 20 min.

b) Podłoże Wilson-Blaira: agar zwykły (1000 ml) z dodatkiem 10 g glukozy wysterylizowanej w temperaturze 117°C w ciągu 20 min. Oddzielnie wysterylizować w tych samych warunkach roztwory: roztwór chlorku żelazowego 8%(m/m), roztwór wodorotlenku sodowego 10%(m/m), roztwór siarczynu sodowego 20%(m/m). Po ostudzeniu zmieszać 1000 ml agaru cukrowego z 10 ml roztworu FeCl<sub>3</sub>, 6 ml roztworu NaOH i 100 ml roztworu Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Podłoże przygotować bezpośrednio przed wykonaniem posiewu.

c) Podłoże Wrzoska: część wątroby wołowej pokroić w kostki o bokach 6 × 10 cm, zalać wodą wodociągową i gotować w ciągu 30 min, następnie przesączyć przez płótno i rozlać do butelek. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 30 min (I). Pozostałą część wątroby pokroić w kostki o bokach 0,5 cm, zalać roztworem NaCl 0,9%(m/m) i wysterylizować w tych samych warunkach (II). Wyciąg wątroby jak i wątrobę w kostkach można przechowywać w chłodni w ciągu kilku tygodni.

Bezpośrednio przed sporządzeniem podłoża Wrzoska kostki wątroby (II) opłukać na sicie pod bieżącą wodą, umieścić w próbkach i wysterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min. W 1000 ml wyciągu wątrobowego (I) rozpuścić 10 g peptonu 15 g chlorku sodowego, doprowadzić pH do wartości 8,2 i zagotować. Następnie przesączyć przez bibułę, dodać 10 g glukozy i rozlewać do butelek z uprzednio wysterylizowanymi kostkami wątroby (II). Ponownie sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 20 min. Przed użyciem podłoże gotować na łaźni wodnej lub w bieżącej parze w ciągu 10 min, a następnie pokryć jałową parafiną.

d) Mleko z lakmusem: 1000 ml mleka krowiego odtłuszczonego zmieszać z 5 ml roztworu lakmusu wg 5.4.8.2 i rozlać do próbek, napelniając je do około ¾ wysokości. Sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 10 min. Po sterylizacji zalać jałową parafiną.

e) Podłoże do badania fermentacji cukrów i alkoholi przez beztlenowce: 100 ml 10% wody peptonowej zmie-

ścić z 900 ml wody destylowanej i doprowadzić pH do wartości 7,5. Następnie dodać 10 g cukru (glukoza, sacharoza lub mannitol) i 5 ml roztworu lakmusu. Rozlać do próbek po około 10 ml i sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min. Po sterylizacji pokryć powierzchnię pożywek jałową parafiną.

5.4.8.4. Wykonanie oznaczania. Próbki pasty o masie 10,0 g odważone w jałowym szkiełku wagowym przemieścić za pomocą 100 ml rozcieńczonego roztworu Ringera 5.4.8.2 do jałowej kolby stożkowej, zawierającej kilkanaście perełek szklanych. Wytrząsać przez 15 min. Następnie przygotować 10-krotne rozcieńczenie próby (w zależności od przewidywanego stopnia skażenia) na ogół do 10<sup>-4</sup>, używając tego samego płynu Ringera. Przygotowane w ten sposób rozcieńczone roztwory (10; 10<sup>-1</sup>; 10<sup>-3</sup>; 10<sup>-4</sup>) ogrzewać w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 10 min, w celu zniszczenia form wegetatywnych mikroorganizmów glebowych.

a) Badania podstawowe na podłożu Wilson-Blaira. Wsiać po 1 ml z każdego rozcieńczenia ogrzanej zawiesiny na przygotowane uprzednio płytki Petriego. Wykonać dwie równoległe próby z każdego rozcieńczenia. Następnie zalać je podłożem Wilson-Blaira wg 5.4.8.3b) ostudzonym do 50°C i dokładnie wymieszać. Po skrzepnięciu podłoża zalać całą powierzchnię płytek 3 mm warstwą agaru zwykłego, w celu stworzenia warunków beztlenowych. Posiewy inkubować w temperaturze 37°C w ciągu 24 h.

Za wynik dodatni badania podstawowego przyjąć obecność czarnych kolonii o średnicy nie mniejszej niż 3 ÷ 5 mm.

b) Badania potwierdzające na podłożu Wrzoska i mleku z lakmusem. Z głębi agaru wybrać czarne kolonie, dzielić każdą z nich na połowę, wysiać połówki na podłoże Wrzoska i na mleko z lakmusem. Posiewy na podłożu Wrzoska inkubować w temperaturze 37°C przez 24 h. Za wynik dodatni przyjąć zmętnienie pożywki. W celu ostatecznego potwierdzenia próby na podłożu Wrzoska należy zrobić preparaty mikroskopowe z hodowli i zabarwić je metodą Grama. Obecność krótkich laseczek Gram-dodatnich w kształcie „serdelka“ o ściętych brzegach świadczy o obecności *Clostridium perfringens*.

Posiewy na mleku z lakmusem inkubować w temperaturze 37°C odczytując wyniki po 24, 48 i 72 h.

Za wynik dodatni przyjąć ścięcie mleka i wytworzenie kwasu związane ze zmianą barwy pożywki.

c) Badania uzupełniające. Z podłoża Wrzoska można przeszczepić kolonie na podłoże cukrowe z glukozą, sacharozą i mannitolem. Za wynik dodatni (obecność *Clostridium perfringens*) przyjąć rozkład glukozy i sacharozy (zmiana barwy pożywki) oraz brak rozkładu mannitolu.

5.4.8.5. Obliczenie i podawanie wyników. Wyniki należy podać w postaci miana *Clostridium perfringens*, to jest liczby wyrażającej najmniejszą ilość pasty, w której stwierdzono obecność tych bakterii. Przy podawaniu wyników należy uwzględnić ilość gramów pasty w objętości badanej zawiesiny.

### 5.4.9. Oznaczanie miana *coli*

**5.4.9.1. Zasada oznaczania.** Jednym z podstawowych wskaźników zanieczyszczenia pasty borowinowej są bakterie grupy *coli*. Badania w celu oznaczania bakterii grupy *coli* wykonuje się metodą fermentacyjną, stosując podłoże Kesslera z laktozą zawierające substancje hamujące na tym podłożu wzrost bakterii tworzących spory (żółć, fiolet gencjany).

#### 5.4.9.2. Odczynniki

- a) Azotan potasowy cz.d.a.
- b) Chlorek sodowy cz.d.a.
- c) Węglan sodowy bezwodny cz.d.a.
- d) Siarczyn sodowy cz.d.a.
- e) Alkohol etylowy 96%(v/v).
- f) Kwas solny stężony cz.d.a.
- g) Pepton cz.
- h) Laktoza cz.
- i) Agar cz.
- j) Tryptofan cz.
- k) Para-dwumetyloaminobenzaldehyd cz.
- l) Alkoholowowodny (1:1) roztwór fuksyny zasadowej 3%(m/m) (przechowywać w chłodnym miejscu).
- ł) Zieleń brylantowa — roztwór 0,1%(m/m).
- m) Fiolet gencjany — roztwór 4%(m/m).
- n) Wskaźnik Andrade: 0,2 g fuksyny kwaśnej rozpuścić w 100 ml wody destylowanej i doprowadzić pH do wartości 7,0 ÷ 7,2 przy pomocy roztworu wodorotlenku sodowego o  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ .
- o) Płyn Ringera do rozcieńczeń 5.4.8.2m).

#### 5.4.9.3. Pożywki i podłoża

a) Podłoże Kesslera-Swenartona — stężenie normalne: 50 ml żółci wołowej i 10 g peptonu rozpuścić w wodzie (około 500 ml), gotować przez 1 h, a następnie uzupełnić do objętości 1 l. Doprowadzić pH roztworu do wartości 7,2, przesączyć przez watę, dodać 2,5 g laktozy oraz 1 ml fioletu (wg 5.4.9.2m) i rozlać do próbek z rurkami Durhama. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 5 min. Nalewać 10 ml podłoża podwójnie stężonego do butelek pojemności 50 ml oraz 10 ml podłoża o stężeniu normalnym do próbek o wymiarach 16 × 160 mm.

b) Agar Endo: 1000 ml wyciągu mięsnego rozcieńczyć 2000 ml wody destylowanej. Do tego roztworu dodać 20 g peptonu, 10 g chlorku sodowego i 60 g agaru. Mieszaninę gotować do rozpuszczenia się agaru i doprowadzić pH roztworu do wartości 7,4. W razie potrzeby roztwór przesączyć. Następnie dodać jeszcze 30 g laktozy, wymieszać i rozlać po 150 ml do butelek pojemności 200 ml. Sterylizować w 115°C przez 20 min.

c) Bulion laktozowy z zielenią brylantową: 10 g peptonu i 10 g laktozy rozpuścić w 500 ml wody. Następnie dodać 200 ml 10% roztworu wodnego świeżej żółci wołowej, dopełnić wodą do około 975 ml. Doprowadzić pH roztworu do wartości 7,4, dodać 13,3 ml 0,1% zieleni brylantowej i uzupełnić objętość roztworu wodą do 1000 ml. Roztwór przesączyć przez watę, rozlać po 5 ml do próbek o wymiarach 9 × 100 mm z rurkami Durhama. Sterylizować w 115°C w ciągu 20 min. Po sterylizacji pH bulionu powinno wynosić 7,1 ÷ 7,4.

d) Podłoże z laktozą i wskaźnikiem Andrade do badań potwierdzających: w 800 ml wody destylowanej rozpuścić 10 g peptonu, 5 g chlorku sodowego, 0,1 g azotanu potasowego, 0,074 g węglanu sodowego bezwodnego oraz 5 g laktozy. Roztwór zagotować, jeżeli jest mętny przesączyć. Po ostudzeniu doprowadzić pH do wartości 7,3. Następnie dodać 10 ml wskaźnika Andrade i rozlać po 2 ml do małych próbek bakteriologicznych z rurkami Durhama. Wyjałowić w 117°C w ciągu 15 min.

**5.4.9.4. Wykonanie oznaczania miana *coli*.** W jałowym szkiełku wagowym odważyć 10 g pasty, następnie przenieść ją do jałowej kolby stożkowej, zawierającej kilkanaście szklanych perełek, za pomocą 100 ml płynu Ringera czterokrotnie rozcieńczonego. Roztwór wytrząsać przez 15 min, a następnie przygotować serię rozcieńczeń dziesięciokrotnych (w zależności od przewidywanego stopnia skażenia) do stężenia  $10^{-6}$ , używając do tego celu rozcieńczonego roztworu Ringera.

**a) Badania wstępne.** 10 ml zawiesiny (1 g próby) posiać do butelek pojemności 50 ml, zawierającej 10 ml podłoża podwójnie stężonego oraz 1 ml zawiesiny (0,1 g próby) posiać do próbki z podłożem o stężeniu normalnym. Równolegle do kolejnych próbek posiać po 1 ml przygotowanych uprzednio rozcieńczeń zawiesiny w granicach stężeń od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$ , zawierających odpowiednio 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001 g próby. Posiewy wykonywać zawsze w dwóch równoległych seriach. Po wykonaniu posiewu zawartość butelek oraz próbek lekko wstrząsnąć i inkubować w temperaturze 37°C. Wyniki odczytywać po 24 i 48 h. Jako wynik dodatni badania wstępnego przyjąć obecność gazu w rurce Durhama na podłożu Kesslera po inkubacji przez 24 h oraz zmętnienie podłoża. W przypadku wyniku ujemnego lub wątpliwego inkubację przedłużyć do 48 h.

**b) Badanie potwierdzające.** Badanie potwierdzające obecność bakterii grupy *coli* polega na przesianiu 24- lub 48-godzinnych dodatnich hodowli na podłoża potwierdzające: agar Endo 5.4.9.3b) lub płynne podłoże z zielenią brylantową (5.4.9.3c). Badania te należy przeprowadzić z dwóch ostatnich rozcieńczeń. Zaszczepione płytki z agarem Endo lub próbki z zielenią brylantową inkubować w temperaturze 37°C w ciągu 24 h, po czym odczytać wyniki. Bakterie grupy *coli* na podłożu Endo rosną w postaci czerwonych kolonii często z ciemniejszym środkiem, zawsze z metalicznym, fuksynowym połyskiem. Obecność na agarze Endo typowych kolonii z grupy *coli* uznać jako wynik dodatni. Wyniki wątpliwę na agarze Endo (tj. kolonie różowe z ciemniejszym środkiem, bez wyraźnego połysku) potwierdzić ostatecznie na obecność bakterii grupy *coli*.

Jako wynik dodatni na podłożu z zielenią brylantową przyjąć obecność gazu w rurce Durhama lub w podłożu po lekkim wstrząśnięciu.

**c) Badania ostateczne stwierdzające.** Badania ostateczne stwierdzające obecność bakterii grupy *coli* przeprowadzić w przypadku, gdy posiew na agarze Endo wykazuje wzrost nietypowych kolonii dla grupy *coli*. Badanie to polega na przeszczepieniu tych kolonii na

agar skośny i podłoże laktozowe ze wskaźnikiem Andrade — 5.4.9.3d). Hodowle na agarze skośnym oraz w probówkach z podłożem laktozowym inkubować w temperaturze 37°C w ciągu 24 h. Po tym okresie przeprowadzić badania mikroskopowe, stosując barwienie metodą Grama. Obecność w preparacie pałeczek Gram-ujemnych, nie zarodnikujących oraz zmiana zabarwienia podłoża Andrade na czerwone i obecność ga-

zu w rurce Durhama świadczy o obecności bakterii grupy *coli*.

**5.4.9.5. Obliczanie i podawanie wyników.** Wyniki badań podać w postaci miana, to jest liczby wyrażającej najmniejszą ilość pasty w gramach, w której stwierdzono obecność bakterii grupy *coli*. Przy podawaniu wyników uwzględnić przeliczenie rozcieńczeń na gramy.

## K O N I E C

### INFORMACJE DODATKOWE

**1. Instytucja opracowująca normę** — Instytut Medycyny Uzdrawiskowej w Poznaniu.

**2. Istotne zmiany w stosunku do BN-72/9567-01**

a) Aktualna wersja jest normą ogólną określającą podstawowe wspólne wymagania dla wszystkich past borowinowych, bez względu na rodzaj surowca wyjściowego. Szczegółowe wymagania dla past produkowanych z borowin różnego typu będą określone w normach przedmiotowych,

b) podano szczegółową metodykę badań obowiązujących w tej normie oraz w przyszłych normach przedmiotowych, w tym również bakteriologicznych.

**3. Normy i dokumenty związane**

PN-73/O-79402 Opakowania transportowe tekturowe. Pudła.

BN-74/9560-04 Borowiny. Podział, nazwy, określenia

BN-74/9562-01 Borowiny. Pobieranie próbek do badań

Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 28.12.1979 w sprawie wymagań jakim powinny odpowiadać złoża torfu (borowiny) przeznaczonego do eksploatacji w celach leczniczych Dz. Urz. Nr 2 z 29.II.1980

**4. Autor projektu normy** — dr Teresa Latour — Zakład Balneochemii Instytutu Medycyny Uzdrawiskowej w Poznaniu.