UKD 664 841.8.001.4:664.9338.0014

WYROBY PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	NORMA BRANŻOWA **Konserwy warzywno-mięsne i mięsno-warzywne sterylizowane** Wymagania mikrobiologiczne	**BN-73** **8135-03** Zamiast BN-64/8135-03 Grupa katalogowa 1259

BIBLIOTEKA
WB-9883

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy są wymagania mikrobiologiczne dotyczące konserw warzywno-mięsnych i mięsno-warzywnych sterylizowanych.

1.2. Zakres stosowania normy. Normę należy stosować przy ocenie jakości i trwałości konserw warzywno-mięsnych i mięsno-warzywnych w produkcji i w obrocie.

1.3. Normy związane

N-75/A-04024 Produkty żywnościowe. Wykrywanie gronkowców chorobotwórczych (koagulazododatnich)

PN-80/A-75052 Przetwory owocowe, warzywne i warzywno-mięsne. Badania mikrobiologiczne

PN-72/A-82052 Przetwory mięsne. Konserwy. Pobieranie próbek

PN-83/A-82054 Mięso i przetwory mięsne. Badania bakteriologiczne

2. WYMAGANIA

2.1. Wymagania mikrobiologiczne

Lp.	Cechy	Wymagania
1	Szczelność opakowań	szczelne
2	Trwałość oznaczona metodą próby termostatowej	bez zmian opakowań i cech organoleptycznych produktu
3	Liczba bakterii mezofilnych w 1 g próbki, nie więcej niż	50
4	Liczba bakterii kwaszących typu mlekowego	niedopuszczalna
5	Liczba bakterii termofilnych w 1 g próbki, nie więcej niż	10
6	Obecność bakterii beztlenowych i ich przetrwalników	niedopuszczalna

cd. tablicy

Lp.	Cechy	Wymagania
7	Obecność gronkowców chorobotwórczych	niedopuszczalna
8	Obecność pałeczek Gramujemnych fermentujących laktozę	niedopuszczalna

2.2. Wymagania organoleptyczne — zgodnie z odpowiednimi normami przedmiotowymi.

3. BADANIA

3.1. Program badań

3.1.1. Badania pełne

a) sprawdzanie szczelności opakowań,

b) oznaczanie trwałości konserw,

c) oznaczanie ogólnej liczby bakterii mezofilnych,

d) oznaczanie liczby bakterii kwaszących typu mlekowego,

e) oznaczanie liczby bakterii termofilnych,

f) oznaczanie obecności bakterii beztlenowych i ich przetrwalników,

g) oznaczanie obecności gronkowców chorobotwórczych,

h) oznaczanie obecności pałeczek Gramujemnych fermentujących laktozę,

i) oznaczanie cech organoleptycznych: barwy, smaku, zapachu i konsystencji.

Badania pełne należy wykonywać w przypadkach:

— produkcji nowego asortymentu,

— zmiany technologii produkcji,

— zakłóceń procesu technologicznego,

— na żądanie odbiorców i organów kontroli.

Oznaczanie wymienione w poz. e) wykonywać należy tylko w przypadku eksportu do krajów tropikalnych.

Badania mikrobiologiczne należy przeprowadzać w próbkach trwałych niezmienionych po próbie termostatowej.

Centrala Zjednoczenia Przemysłu Owocowo-Warzywnego
Ustanowiona przez Naczelnego Dyrektora Zjednoczenia Przemysłu Owocowo-Warzywnego dnia 30 czerwca 1973 r.
jako norma obowiązująca w zakresie produkcji i obrotu od dnia 1 stycznia 1974 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 46/1973 poz. 134)

Wydanie 3
WYDAWNICTWA NORMALIZACYJNE „ALFA" 1986. Druk. Wyd. Norm. W-wa, Ark. wyd. 1,05 Nakł. 200 + 23 Zam. 2672/85 Cena zł 36,00

3.1.2. Badania niepełne

a) sprawdzanie szczelności opakowań,

b) oznaczanie trwałości konserw,

c) oznaczanie cech organoleptycznych.

Badania niepełne należy wykonać dla każdej partii w produkcji.

3.2. Pobieranie próbek — wg PN-72/A-82052.

3.3. Opis badań

3.3.1. Sprawdzanie szczelności opakowań należy wykonywać wg PN-83/A-82054 załącznik 5.

Szczelność słoi z zamknięciem typu Feniks stwierdza się na podstawie zassania wieczka po zdjęciu obrączki zaciskającej.

3.3.2. Oznaczanie trwałości konserw metodą próby termostatowej wykonać wg PN-80/A-75052.

3.3.3. Otwieranie opakowań. Do badań mikrobiologicznych przeznacza się opakowania szczelne nie wykazujące żadnych zmian po próbie termostatowej wykonanej wg 3.3.2. Opakowania zawierające konserwy półpłynne w celu dokładnego wymieszania treści należy odwrócić 10-krotnie wieczkiem i denkiem do góry. Powierzchnię, która ma być otwierana, wyjałowić wycierając watą zwilżoną 70-procentowym alkoholem etylowym i opalić w płomieniu.

a) **Otwieranie puszek.** Na wyjałowione wieczko puszki położyć tampon z waty nasycony 70-procentowym alkoholem etylowym, zapalić i przez płomień wbić wyjałowiony metalowy bolec. Następnie wyjałowionymi w płomieniu nożyczkami do cięcia blachy powiększyć otwór i zakryć go jałową płytką Petriego.

b) **Otwieranie słoi z zamknięciem typu Feniks.** Zdjąć obrączkę zaciskającą, wytrzeć wieczko tamponem z waty nasyconym 70-procentowym alkoholem etylowym, opalić płomieniem, po czym podważyć wyjałowionym w płomieniu skalpelem. Po zdjęciu wieczka treść konserwy zabezpieczyć przed zakażeniem jałową płytką Petriego.

c) **Otwieranie słoi z zamknięciem typu Twist off.** Wieczko wytrzeć 70-procentowym alkoholem etylowym, odkręcić je, a treść zabezpieczyć jałową płytką Petriego.

3.3.4. Pobieranie średniej próbki do badań. Wyjałowioną metalową łyżką aptecznąpobrać z różnych miejsc opakowania reprezentatywną próbkę w stosunku do produktu i przenieść do wyjałowionego i wytarowanego pojemnika homogenizatora (np. Universal laboratory Aid typ 309 produkcji Mechaniki Precyzyjnej na licencji Unipan). Następnie pojemnik ponownie zważyć, obliczyć masę próbki i rozcieńczyć 4-krotną ilością płynu do rozcieńczeń (załącznik p. 1.1).

3.3.5. Przygotowanie rozcieńczeń próbki. Homogenizator wyjałowić wg PN-75/A-04024 p. 2.1.

Próbkę homogenizować w ciągu 3 min przy 5000 ÷ 10 000 obrotów na 1 min (osiągając w sumie 15 000 ÷ 20 000 obrotów mieszadła). W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1:5.

Jeżeli konieczne jest przygotowanie większych rozcieńczeń, należy najpierw przygotować rozcieńczenie 1:10.

Pobrać pipetą 5 cm^3 próbki z rozcieńczenia podstawowego 1:5 i przenieść do probówki zawierającej 5 cm^3 płynu do rozcieńczania.

Dalsze 10-krotne rozcieńczenia wykonać wg PN-80/A-75052.

3.3.6. Oznaczanie liczby drobnoustrojów metodą płytkową

3.3.6.1. Oznaczanie ogólnej liczby bakterii mezofilnych

3.3.6.1.1. Wykonanie oznaczania. Z podstawowego rozcieńczenia przygotowanego wg 3.3.5 wysiać po 1 cm^3 na 2 równoległe płytki Petriego. Wysiewy zalać około 10 cm^3 rozpuszczonego i ostudzonego do 45°C agaru odżywczego z 0,1% glukozy przygotowanego wg załącznika p. 2.2 lub suchym podłożem agarowym z glukozą (załącznik p. 2.3). W celu równomiernego wymieszania badanego materiału z podłożem płytki poruszać ruchem kolistym. Po zastygnięciu agaru płytki odwrócić dnem do góry i wstawić do termostatu o temperaturze 30°C na 48 h.

3.3.6.1.2. Odczytanie i interpretacja wyników badania. Po 48 h inkubacji odczytać wyniki badania:

a) w przypadku gdy na obu płytkach nie stwierdza się obecności kolonii, podaje się wynik próby jako ujemny, tzn. 0 bakterii mezofilnych w 1 g próbki;

b) w przypadku gdy na obu płytkach wyrosła policzalna liczba kolonii, za liczbę bakterii mezofilnych obecnych w 1 g produktu należy przyjąć liczbę kolonii z obu płytek pomnożoną przez rozcieńczenie i podzieloną przez 2; kolonie rosnące w postaci smug, w których nie można wyróżnić poszczególnych kolonii, należy liczyć jako pojedyncze;

c) w przypadku gdy kolonie rozlane pokrywają część lub całą powierzchnię obu płytek, badania należy powtórzyć biorąc do analizy inną próbkę konserwy.

3.3.6.2. Oznaczanie liczby bakterii kwaszących typu mlekowego

3.3.6.2.1. Wykonanie oznaczania. Z podstawowego rozcieńczenia przygotowanego wg 3.3.5 wysiać po 1 cm^3 na 2 równoległe płytki Petriego. Wysiewy zalać około 10 cm^3 podłoża Blickfeldta

(przygotowanego wg załącznika p. 2.4) rozpuszczonego i ostudzonego do 45°C. Posiewy inkubować **w temperaturze 30°C w ciągu 48 h, a później** w temperaturze pokojowej około 20°C przez **24 h.**

3.3.6.2.2. Odczytanie i interpretacja wyników badania. Po inkubacji obliczyć na płytkach kolonie otoczone jasną strefą, powstałą na skutek rozłożenia węglanu wapniowego.

W celu określenia liczby bakterii kwaszących typu mlekowego, z obliczonych kolonii należy wykonać test stwierdzający brak zdolności wytwarzania katalazy. Na szkiełko przedmiotowe dać kroplę świeżo przygotowanego 3-procentowego roztworu perhydrolu i rozprowadzić w niej pobraną ezą kolonię. Niewytwarzanie pęcherzyków gazu wskazuje, że badane bakterie nie wytwarzają katalazy i należą do grupy bakterii kwaszących typu mlekowego. Bakterie wytwarzające pęcherzyki gazu należą najczęściej do rodzaju Micrococcus. W podany sposób należy sprawdzić wszystkie wyrosłe kolonie bakterii kwaszących. Jako liczbę bakterii kwaszących typu mlekowego należy przyjąć średnią arytmetyczną z liczby kolonii nie wytwarzających katalazy wyrosłych na obu płytkach, pomnożonej przez rozcieńczenie i podzielonej przez 2.

3.3.6.3. Oznaczanie liczby bakterii termofilnych

3.3.6.3.1. Wykonanie oznaczania. Oznaczanie należy wykonać tylko w przypadku wysyłki konserw do krajów tropikalnych.

Z podstawowego rozcieńczenia przygotowanego wg 3.3.5 wysiać po 1 cm^3 na 2 równoległe płytki Petriego. Wysiewy zalać podłożem Smith-Lorenza (załącznik p. 2.5) i inkubować w temperaturze **55°C przez 48 h. W celu zabezpieczenia** właściwej wilgotności należy wstawić do termostatu zlewkę z wodą.

3.3.6.3.2. Odczytanie i interpretacja wyników. Po inkubacji odczytuje się wyniki badania; liczbę bakterii termofilnych obecnych w 1 g produktu należy obliczyć wg 3.3.6.1.2 a), b) lub c).

3.3.7. Badania stwierdzające obecność bakterii metodą namnażania

3.3.7.1. Oznaczanie obecności bakterii beztlenowych i ich przetrwalników. Po 1 cm^3 podstawowego rozcieńczenia średniej próbki wysiać do dwóch równoległych probówek ze zregenerowaną w 100°C pożywką Wrzoska (przygotowaną jak w załączniku p. 2.7). Posiewy należy wykonać tak, żeby nie wprowadzić powietrza do podłoża.

W celu zabicia form wegetatywnych bakterii beztlenowych jedną z probówek ogrzać na łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 10 min, po czym szybko schłodzić w wodzie. Posiewy wstawić do termostatu o temperaturze 37°C.

Odczytanie i interpretacja wyników badania. Po 24 godz sprawdzić po raz pierwszy posiewy. Jeżeli po tym czasie nie stwierdza się zmian w pożywce, hodowlę należy prowadzić dalej do **72 h. Zmętnienie i powstanie gazu w pożywce** lub na powierzchni oleju parafinowego dowodzi wzrostu bakterii względnie lub bezwzględnie beztlenowych. W przypadku tych zmian należy wykonać preparat mikroskopowy następująco: z dna probówki z podłożem Wrzoska pobrać pipetą pasterowską trochę materiału i rozprowadzić na powierzchni szkiełka przedmiotowego uważając, żeby nie przenieść kropli oleju parafinowego wraz z hodowlą. Preparat po utrwaleniu należy zabarwić metodą Grama.

Jeżeli w preparacie stwierdza się obecność pałeczek lub laseczek Gramdodatnich z przetrwalnikami umieszczonymi centralnie, subterminalnie lub terminalnie, to w celu potwierdzenia przynależności do grupy ścisłych beztlenowców, przesiewa się na następujące podłoża:

a) podłoże Wilson-Blaira (załącznik p. 2.8),

b) agar odżywczy z glukozą w wysokim słupku (załącznik p. 2.2),

c) podłoża McClunga i McCoya (załącznik p. 2.9).

Badania stwierdzające obecność bezwzględnych beztlenowców. Na podłoże Wilson-Blaira posiewa się następująco: 1 — 2 krople hodowli pobranej pipetą pasterowską przenieść jałowo do płytki Petriego i zalać podłożem Wilson-Blaira. Po zastygnięciu podłoża dla stworzenia warunków beztlenowych zalewa się je ponownie 2-procentowym agarem na wodzie destylowanej. Inkubację prowadzi się w temperaturze 37°C przez 18 ÷ 24 **h. Czarne kolonie lub zczernienie całego podłoża** świadczy o obecności bakterii beztlenowych proteolitycznych.

Agar odżywczy z glukozą w wysokim słupku przed posiewem regeneruje się ogrzewając w 100°C przez 10 min, po czym schładza się do 45°C. Do dna ostudzonego podłoża wprowadza się pipetą pasterowską kilka kropel hodowli (około 0,5 cm^3), pobranej z dna pożywki Wrzoska. Po zaszczepieniu agar oziębia się w zimnej wodzie w celu szybkiego zestalenia. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C w ciągu 24 ÷ 48 h. Rozerwanie słupka z wytworzeniem gazu dowodzi obecności bakterii beztlenowych sacharolitycznych.

Posiew na podłoże McClunga i McCoya wykonuje się: 1 cm^3 hodowli pobranej z dna pożywki Wrzoska wprowadza się do dna probówki z podłożem. Hodowlę prowadzi się w temperaturze 28 ÷ 30°C przez 72 ÷ 168 h. Przejaśnienie po-

żywki z gazowaniem lub bez, lecz bez wytworzenia kożuszka, dowodzi obecności bakterii beztlenowych sacharolitycznych, fermentacji acetono-butanolowej lub masłowej.

Bakterie te wytwarzają granulozę, której obecność sprawdza się w preparacie mikroskopowym przeżyciowym, zmieszanym z kroplą płynu Lugola. Przy wykonywaniu preparatu należy spuścić z pipety pasterowskiej kilka pierwszych kropli w celu usunięcia ewentualnej skrobi z pożywki. Granatowe zabarwienie ziarnistości w komórkach bakteryjnych potwierdza obecność bakterii z grupy kwasu masłowego lub fermentacji acetono-butanolowej.

Wynik dodatni na którymkolwiek podłożu świadczy o obecności ścisłych beztlenowców.

Dalszą identyfikację bakterii beztlenowych prowadzą Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne wg PN-83/A-82054.

3.3.7.2. Oznaczanie obecności gronkowców chorobotwórczych wg PN-75/A-04024. Z podstawowego rozcieńczenia próbki należy przygotować rozcieńczenie 1:10 zgodnie z 3.3.5. Posiać po 1 cm^3 do 3 równoległych probówek z podłożem Giolitti-Cantoni (czałącznik p. 2.10).

Po posiewie zalać ostrożnie po ściance warstwą wodnego agaru — na wysokość 1,5-2 cm.

Posiane probówki inkubować w temperaturze 37° przez 24 ÷ 48 h. W przypadku zczernienia podłoża lub powstania czarnego osadu pobrać materiał pipetą pasterowską i rozsiać na powierzchni zestalonego podłoża Baird-Parkera (załącznik p. 2.11) tak, aby otrzymać pojedyncze kolonie. W przypadku wzrostu czarnych okrągłych kolonii, najczęściej z wąskim jaśniejszym obrzeżeniem, sprawdzić przynależność wyrosłych bakterii do grupy gronkowców chorobotwórczych wg PN-75/A-04024 p. 2.3.3.

3.3.7.3. Oznaczanie obecności pałeczek Gramujemnych fermentujących laktozę. Z podstawowego rozcieńczenia próbki przygotowanego jak w 3.3.5 wysiać 1 cm^3 do probówki z podłożem, z żółcią i zielenią brylantową. Inkubację prowadzić w temperaturze 37°C przez 24 ÷ 48 h. Zmętnienie podłoża i powstanie w rurce Durhama gazu świadczy o obecności pałeczek fermentujących laktozę.

W przypadkach wątpliwych, np. przy powstawaniu gazu w ilości mniejszej niż 1/10 wysokości rurki Durhama, należy przesiać na podłoże Endo wg PN-80/A-75052.

3.3.8. Oznaczanie barwy, smaku, zapachu i konsystencji — wykonać organoleptycznie.

3.4. Ocena partii konserw. Partię konserw należy ocenić na podstawie wyników badania próbek trwałych nie wykazujących zmian po próbie termostatowej.

Partię konserw należy uznać za zgodną z wymaganiami normy wówczas, gdy uzyskane wyniki odpowiadają wymaganiom zawartym w rozdz. 2.

KONIEC

Załącznik
do BN-73/8135-03

ROZTWORY PODSTAWOWE I PODŁOŻA

1. Roztwory podstawowe

1.1. Płyn do rozcieńczeń

Woda destylowana — 1000 cm^3,
NaCL — 8,5 g,
Pepton — 1,0 g.

Po rozpuszczeniu w wodzie składników przez gotowanie doprowadzić pH do 7,2, przesączyć przez sączek z bibuły i rozlać do probówek lub kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min. Po sterylizacji pH powinno wynosić 7,0.

1.2. Roztwór 3-procentowego nadtlenku wodoru (wody utlenionej). Do kolby pomiarowej o pojemności 100 cm^3 wlać 10 cm^3 perhydrolu (około 30-procentowy roztwór nadtlenku wodoru) i dopełnić wodą destylowaną do kreski.

1.3. Fizjologiczny roztwór chlorku sodowego (zbuforowany)

Woda destylowana — 1000 cm^3,
NaCL — 8,5 g,
Na_2HPO_4 1/15 M roztwór (7,33 g/l) — 6 cm^3,
NaH_2PO_4 1/15 M roztwór (5,86 g/l) — 4 cm^3.

Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min.

Końcowe pH powinno wynosić 7,0 ±0,1.

2. Podłoża

2.1. Wyciąg mięsny

Mięso wołowe lub końskie — 1000 g,
Woda wodociągowa — 2200 cm^3.

Mięso oczyszczone z kości, tłuszczu i ścięgien, zemleć w maszynce do mięsa i zalać wodą destylowaną. Odstawić na noc do chłodni.

Następnego dnia gotować je na wolnym ogniu przez 30 min, przesączyć przez płótno i dopełnić wodą destylowaną do poprzedniej objętości, a następnie rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 30 min.

Przed użyciem wyciągu jako składnika podłoża przesączyć go na zimno przez watę lub bibułę. Powyższy wyciąg mięsny można zastąpić preparatami handlowymi.

2.2. Agar odżywczy z glukozą

Wyciąg mięsny — 1000 cm³,
Ekstrakt drożdżowy — 2,5 g,
Pepton — 5,0 g,
Chlorek sodowy — 5,0 g,
Glukoza — 1,0 g,
Agar — 15 g.

W wyciągu mięsnym rozpuścić pepton, ekstrakt drożdżowy, chlorek sodowy, doprowadzić pH do 7,8 ÷ 8,0 (stosując 10-procentowy NaOH), zagotować, przesączyć przez bibułę, a następnie dodać agar i glukozę. Wstawić do aparatu Kocha na 30 min aż do rozpuszczenia agaru, rozlać do mniejszych kolb i sterylizować w autoklawie przez 20 min w temperaturze 117°C.

Podłoże to stosuje się także do potwierdzenia obecności bakterii beztlenowych. W tym przypadku rozlewa się je do $^2/_3$ wysokości probówek.

2.3. Suche podłoże agarowe [1]) z glukozą.

Wyciąg z serc wołowych,
Hydrolizat drożdżowy,
Enzymatyczny hydrolizat kazeinowy,
Pepton,
Chlorek sodowy,
Agar.

Odważyć 55 g suchego podłoża agarowego i zalać 1000 cm³ wody desylowanej, odstawić na 1 ÷ 1,5 godz, a następnie dodać 1,0 g glukozy. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min.

2.4. Zmodyfikowane podłoże Blickfeldta

Woda drożdżowa — 200 cm³,
Pepton Bacto (Difco) — 10 g,
Laktoza — 10 g,
Glukoza — 10 g,
Agar — 20 g,
Węglan wapnia ($CaCO_3$) — 5 g,
Woda destylowana — 800 cm³.

Zmieszać wodę drożdżową z wodą destylowaną, rozpuścić pepton, nastawić pH na 6,6 ÷ 6,8, dodać agar i wstawić do aparatu Kocha do rozpuszczenia się agaru. Dodać glukozę, laktozę oraz węglan wapniowy i po dokładnym zmieszaniu rozlać do mniejszych kolbek.

Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min. Zamiast wody drożdżowej można użyć 3 g ekstraktu drożdżowego na 1000 cm³ wody destylowanej.

Przygotowanie wody drożdżowej

Drożdże piekarskie — 100 g,
Woda wodociągowa — 1000 cm³.

Drożdże rozetrzeć z niewielką ilością wody wodociągowej, następnie dodać porcjami wodę do objętości 1 l, przelać całość do kolby z dnem płaskim i gotować w ciągu 30 min, następnie pozostawić w chłodni na 24 h. Po tym czasie odwirować lub zlać płyn znad osadu. Doprowadzić do pH 6,8, sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Przed użyciem przesączyć przez watę.

2.5. Podłoże Smith-Lorenza

Woda wodociągowa — 1000 cm³,
Pepton Tryptone lub Tryptose[2]) — 10 g,
Skrobia rozpuszczalna — 5 g,
Agar — 20 g.
Purpura bromokrezolowa, 0,4-procentowy roztwór wodny — 10 cm³,
Glukoza — 5 g.

W wodzie rozpuścić pepton, dodać agar i wstawić do pary bieżącej do rozpuszczania. pH doprowadzić do 7,2 ÷ 7,4. Do gorącego agaru wlać przy ciągłym mieszaniu skrobię zawieszoną w 50 cm³ wody, po czym dodać glukozę i purpurę bromokrezolową. Sterylizować w 117°C przez 20 min.

Roztwór 0,4-procentowy purpury bromokrezolowej. 0,4 g purpury bromokrezolowej wsypać do kolby pomiarowej o pojemności 100 cm³. Rozpuścić w około 50 cm³ wody destylowanej, dobrze wymieszać i dopełnić wodą do kreski.

2.6. Wyciąg wątrobowy

Wątroba wołowa — 1000 g,
Woda wodociągowa — 2000 cm³.

Wątrobę wołową pokroić w kawałki 6×10 cm, zalać wodą wodociągową i gotować w ciągu 30 min. Wyciąg przesączyć przez płótno i rozlać do kolbek. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 30 min.

Z wątroby przygotowuje się kostki do podłoża Wrzoska. Wątrobę pokroić w kostki około 0,5 cm, zalać fizjologicznym roztworem soli kuchennej (0,85-procentowy NaCl). Sterylizować w temperaturze 121 °C w ciągu 20 min. Zarówno wyciąg jak i wątrobę można przechowywać w chłodni

[1]) Suche podłoże agarowe nabyć można w Zjednoczeniu Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed", Warszawa.

[2]) Pepton Tryptone lub Tryptose można zastąpić peptonem krajowym Proteobak.

przez kilka tygodni. Przed sporządzeniem podłoża Wrzoska należy kostki wątroby opłukać na sicie wodą bieżącą i umieścić po 2 kostki w probówkach.

Po czynnościach przygotowawczych przystępuje się do sporządzenia podłoża Wrzoska.

2.7. Podłoże Wrzoska

Wyciąg wątrobowy — 1000 cm^3,
Pepton Bacto (Difco)[1]) — 10 g,
NaCl — 5 g,
Glukoza — 5 g.
Wątroba wołowa pokrojona w kostki.

Rozpuścić w wyciągu wątrobowym pepton i chlorek sodowy, doprowadzić pH do 8,2, zagotować, przesączyć przez bibułę, dodać glukozę i rozlać do $^2/_3$ wysokości probówek z uprzednio dodaną wątrobą. Sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 20 min. Bezpośrednio po wyjęciu z autoklawu do każdej probówki należy nalać po 1 cm^3 oleju parafinowego wysterylizowanego przez 30 min w temperaturze 121°C. Przed użyciem podłoże gotować w łaźni wodnej w ciągu 10 min i schłodzić w zimnej wodzie.

2.8. Podłoże Wilson-Blaira

Agar odżywczy z 1 procentem glukozy — 100 cm^3,
8-procentowy roztwór wodny chlorku żelazowego $FeCl_2$ — 1 cm^3,
10-procentowy roztwór wodny ługu sodowego NaOH — 0,6 cm^3,
20-procentowy roztwór wodny siarczynu sodowego Na_2SO_3 — 10 cm^3.

Agar odżywczy z glukozą przygotować wg 2.2 dając 10 g glukozy na 100 cm^3 i rozlać miarowo po 100 cm^3 do kolbek. Sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 20 min. Oddzielnie przygotować na jałowej wodzie destylowanej roztwory chlorku żelazowego, wodorotlenku sodowego i siarczynu sodowego i wysterylizować j.w.

Po wyjęciu z autoklawu agar i roztwory ostudzić do 50°C, razem zmieszać i zalać posiewy na płytkach. Roztwór siarczynu sodowego musi być zawsze świeżo przygotowany. W celu stworzenia warunków mikrotlenowych po zestaleniu podłoża pokrywa się jego powierzchnię warstwą agaru 2-procentowego przygotowanego na wodzie destylowanej.

a) Roztwór 10-procentowy wodorotlenku sodowego. 1 g wodorotlenku sodowego rozpuścić w 10 cm^3 jałowej wody destylowanej.

b) Roztwór 20-procentowy siarczynu sodowego. 20 g siarczynu sodowego rozpuścić w 80 cm^3 jałowej wody destylowanej.

c) Roztwór 8-procentowy chlorku żelazowego. 0,8 g chlorku żelazowego rozpuścić w 10 cm^3 jałowej wody destylowanej i dobrze wymieszać.

d) Przygotowanie 2-procentowego agaru na wodzie destylowanej. Do 1000 cm^3 wody destylowanej dodać 20 g agaru i ogrzewać w temperaturze 121°C przez 20 min. Doprowadzić pH do 7,4 i rozlać miarowo do kolbek. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min.

2.9. Podłoże McClunga i McCoya

Wątroba wołowa sproszkowana — 20 g,
Mąka pszenna typ 580 lub luksusowa — 50 g,
Woda wodociągowa — 1000 cm^3.

Świeżą wątrobę zemleć na maszynce i wysuszyć w termostacie w temperaturze 55 ÷ 60°C, a następnie dobrze rozetrzeć w moździerzu. Pozostałą część wątroby należy przechowywać w szczelnie zamkniętym słoiku szklanym.

W celu przygotowania podłoża należy dodać do wody mąkę i wątrobę, całość dobrze wymieszać, żeby nie było grudek i ogrzewać w parze bieżącej w 100°C przez 1 godz często mieszając. Rozlać do probówek i sterylizować w temperaturze 121°C przez 2 h.

Podłoże po ostygnięciu powinno być kleiste.

2.10. Podłoże Giolitti-Cantoni

Woda destylowana — 1000 cm^3,
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny[2]) — 10 g,
Ekstrakt mięsny (Beef Extract Difco lub Lab. Lemco Oxoid) — 5 g,
Ekstrakt drożdżowy (Yeast Extract Difco) — 5 g,
Chlorek litowy — 5 g,
NaCl — 5 g,
Mannitol — 20 g,
Glikokol — glicyna — 1,2 g,
Pirogronian sodowy — 3 g,
Telluryn potasowy, 1-procentowy roztwór wodny — 5,5 cm^3.

Składniki, oprócz tellurynu potasowego rozpuścić w wodzie, nastawić pH na 6.9, przesączyć, rozlać miarowo po 19 cm^3 do dużych probówek o wymiarach 20×200 mm.

Sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 30 min. Bezpośrednio przed posiewem podłoża gotować w łaźni wodnej przez 10 min. Ostudzić do temperatury około 45°C i do każdej probówki dodać 0,1 cm^3 1-procentowego roztworu tellurynu potasowego przygotowanego wg 2.10.1.

Po wykonaniu posiewu podłoże zalać warstwą 2-procentowego agaru wodnego przygotowanego wg 2.8.4. Warstwa agaru powinna mieć wysokość 1,5 ÷ 2 cm.

[1]) Pepton Bacto (Difco) można zastąpić peptonem krajowym Aminobak.

[2]) Preparat jest produkowany przez Biomed, można także stosować preparat Casitone Difco lub Tripticase BBL.

Przygotowanie roztworu tellurynu potasowego. 1 g tellurynu potasowego rozpuścić w kolbie pomiarowej w 100 cm³ wody destylowanej i sterylizować przez przesączenie przez filtr Seitza lub podobny. Przechowywać w temperaturze około 4°C.

2.11. Podłoże Baird-Parkera

Woda destylowana[1]) — 1000 cm³,
Ekstrakt mięsny[1])
(Beef Extract Difco) — 5 g,
Ekstrakt drożdżowy[2])
(Yeast Extract Oxoid lub Difco) — 1 g,
Pepton tryptone (Difco) — 10 g,
Chlorek litowy — 5 g,
Agar — 20 g,
Pirogronian sodowy, 20-procentowy roztwór wodny — 50 cm³,
Glikokol 20-procentowy roztwór wodny — 60 cm³,
Telluryn potasowy, 1-procentowy roztwór wodny — 10 cm³,
Żółtko jaja zawieszone w 100 cm³ roztworu fizjologicznego soli — 100 cm³.

Rozpuścić w wodzie ekstrakt mięsny, ekstrakt drożdżowy, pepton i chlorek litowy, nastawić pH na 7,2 ÷ 7,4, dodać agar i wstawić do pary bieżącej do rozpuszczenia. Rozlać miarowo do kolb po 100 cm³. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min.

Przed użyciem na każde 100 cm³ podłoża (rozpuszczonego i ostudzonego do około 50°C) dodaje się uprzednio wyjałowione przez przesączenie przez filtr Seitza:

6 cm³ 20-procentowego wodnego roztworu glikokolu,
5 cm³ 20-procentowego wodnego roztworu pirogronianu sodowego,
1 cm³ 1-procentowego wodnego roztworu tellurynu potasowego,
10 cm³ zawiesiny żółtka jaja w fizjologicznym roztworze soli przygotowanym jak w 1.3.

Dla zwiększenia wybiórczości można dodać na 100 cm³ podłoża 2,5 cm³ 0,2-procentowego roztworu wodnego sulfametazyny. Następnie rozlać podłoże do płytek Petriego po około 20 cm³. Podłoże podstawowe może być przechowywane w lodówce w temperaturze około 4°C przez przeciąg 4 tygodni.

Gotowe płytki powinny być użyte w ciągu tygodnia.

Jeśli chce się je przetrzymać dłużej, należy przed rozlaniem płytek dodać do podłoża podstawowego wszystkie składniki prócz pirogronianu sodowego. Bezpośrednio przed użyciem na każdej płytce rozprowadza się jałowym pręcikiem szklanym 0,5 cm³ 20-procentowego roztworu pirogronianu i płytki podsusza się w temperaturze 50°C.

a) Przygotowanie 20-procentowego wodnego roztworu pirogronianu sodowego. 20 g pirogronianu sodowego rozpuścić w kolbie pomiarowej w 100 cm³ wody destylowanej. Sterylizować przez przesączenie przez filtr bakteriologiczny. Przechowywać w temperaturze około 4°C.

b) Przygotowanie 20-procentowego wodnego roztworu glicyny (glikokolu). 20 g glicyny rozpuścić w kolbie pomiarowej w 100 cm³ wody destylowanej. Sterylizować przez przesączenie przez filtr bakteriologiczny.

c) Przygotowanie zawiesiny żółtka jaja. Świeże jajko umyć dokładnie wodą i mydłem. Zanurzyć w alkoholu skażonym i po wyjęciu opalić. Rozbić jałowo skorupkę i oddzielić żółtko od białka, żółtko przenieść do jałowej kolby i dodać 100 cm³ jałowego roztworu fizjologicznego chlorku sodowego przygotowanego wg 1.3. Przechowywać w chłodni do 2 tygodni.

d) Przygotowanie 0,2-procentowego wodnego roztworu sulfametazyny. Ampułkę zawierającą 5 cm³ 20-procentowego roztworu sulfametazyny przelać do kolby pomiarowej pojemności 500 cm³ i dopełnić do kreski jałową wodą destylowaną. Przechowywać w chłodni.

2.12. Podłoże z żółcią i zielenią brylantową

Pepton — 10 g.
Żółć wołowa — 200 cm³.
Laktoza — 10 g.
Zieleń brylantowa, 0,1-procentowy roztwór wodny — 13,3 cm³.
Woda destylowana — do 1000 cm³.

W 500 cm³ wody destylowanej rozpuścić pepton, dodać żółć i uzupełnić wodą do 1000 cm³, doprowadzić pH do 7,4, zagotować, przesączyć przez bibułę, dodać laktozę i zieleń brylantową. Rozlać do probówek z rurkami Durhama. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Końcowe pH powinno wynosić 7,1 ÷ 7,2.

2.13. Agar Endo

Wyciąg mięsny — 1000 cm³.
Pepton — 10 g.
Chlorek sodowy — 5 g.
Laktoza — 10 g.
Agar — 20 g.
Fuksyna zasadowa, 3-procentowy roztwór wodny — ±20 cm³.

W wyciągu wodnym rozpuścić pepton, chlorek i rozlać miarowo po 100 cm³ do butelek. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min. Przed użyciem do rozpuszczonego podłoża dodać fuksynę, a następnie roztwór siarczynu sodowego w takiej ilości, aby podłoże odbarwiło się, rozlać na płytki. Podłoże powinno mieć barwę bladoróżową.

[1]) Można zastąpić wyciągiem mięsnym.

[2]) Ekstrakt drożdżowy można zastąpić autolizatem drożdżowym, 100 cm³ odpowiada — 3 g ekstraktu.

INFORMACJE DODATKOWE

Wydanie 3 — stan aktualny: maj 1985 — uaktualniono normy związane.