

Wycof. Z.T. 98 (N. 4198)

Lat. PN-A-88033:98

UKD 663.918:543.9-078

WYROBY PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	N O R M A B R A N Ż O W A	BN-90
	Wyroby cukiernicze trwałe Badania mikrobiologiczne	8094-16
		Grupa katalogowa 1242

1. WSTĘP

Przedmiotem normy są mikrobiologiczne metody badań:

- kakao,
- wyrobów czekoladowanych, wyrobów w masie czekoladopodobnej i w polewie kakaowej o korpusie: z mas tłustych, z pomady mlecznej i żelowym,
- czekolady pełnej i nadziewanej,
- wyrobów czekoladopodobnych nienadziewanych i nadziewanych.

2. POBIERANIE PRÓBEK

Pobieranie próbek — wg BN-90/8094-17.

Próbki wyrobów i półproduktów cukierniczych należy pobierać losowo, metodą na ślepo, w ilości około 200 g, do sterylnych słoików z pokrywkami, posługując się wyjałowionym sprzętem (załącznik 2 p. 1).

Każdą próbkę należy pobierać oddzielnym wyjałowionym sprzętem, albo pomiędzy pobraniem poszczególnych próbek, narzędzia należy dokładnie umyć, a następnie wyjałowić przez zanurzenie w alkoholu i opalenie.

Na słoikach należy umieścić wszystkie dane potrzebne do identyfikacji próbki. W laboratorium próbki należy przechowywać do czasu rozpoczęcia badań w temperaturze do +5°C nie dłużej niż 48 h.

3. METODY BADAŃ

3.1. Przygotowanie próbki do badań (wszystkie czynności związane z przygotowaniem próbki do posiewów należy wykonywać w sposób zabezpieczający przed wtórnym zanieczyszczeniem drobnoustrojami)

3.1.1. Rozdrobnienie próbki. Próbkę w warunkach jałowości rozdrobnić. Z rozdrobnionej próbki pobranej wg rozdz. 2 w warunkach jałowości odważyć nie mniej niż 10 g i przenieść do wyjałowionego naczynia homogenizatora.

3.1.2. Homogenizacja próbek. Do odważki dodać 9-krotną ilość tj. 90 ml płynu ogrzanego do 40°C do rozcieńczeń (załącznik 4 p. 1) i homogenizować za pomocą homogenizatora przez 1,5 ÷ 2 min. przy około 2000 obrotach/min. Otrzymany w ten sposób homogenizat stanowi podstawowe 10-krotne rozcieńczenie produktu, z którego w zależności od potrzeb sporządza się dalsze 10-krotne rozcieńczenie lub wysiewa się bezpośrednio na odpowiednie podłoże. Przed przystąpieniem do sporządzania dalszych rozcieńczeń lub posiewów należy odczekać 10 min, aby nastąpiła sedymentacja części stałej (oddzielenie warstwy płynnej od stałej).

Do dalszych rozcieńczeń lub posiewów pobierać płyn znad osadu.

3.1.3. Przygotowanie rozcieńczeń. Z przygotowanego wg 3.1.2 homogenizatu pobrać materiał jałową pipetą pojemności 1 ml i przenieść do próbki zawierającej 9 ml płynu do rozcieńczeń (załącznik 4 p. 1) uważając, aby nie zanurzyć pipety. Po jej samoczynnym opróżnieniu, pipetę należy odłożyć.

Zawartość próbki dokładnie wymieszać za pomocą 10-krotnego wyciągania i wydmuchiwanie posługując się nową pipetą albo mechanicznym wytrząsaczem (załącznik 1), a następnie przenieść 1 ml otrzymanego roztworu do kolejnej próbki zawierającej 9 ml płynu do rozcieńczeń i postępować dalej analogicznie jak poprzednio. Jednocześnie z przygotowaniem następnego rozcieńczenia badanej próbki należy wykonać posiewy danego rozcieńczenia, posługując się tą samą pipetą (przenieść 1 ml badanego rozcieńczenia do kolejnej próbki z rozcieńczalnikiem, a następnie po 1 ml do płytek lub próbek). W ten sposób można dowolnie zwiększyć rozcieńczenie produktu, uzyskując w każdej następnej próbce rozcieńczenie 10-krotnie większe od poprzedniego.

3.2. Rodzaje oznaczeń i warunki posiewów — wg tablicy.

Zgłoszona przez Krajową Spółkę Przedsiębiorstw Przemysłu Cukierniczego CUKRY Sp. z o.o.
Ustanowiona przez Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej dnia 7 lutego 1990 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1990 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 7/1990, poz. 13)

Lp.	Rodzaj oznaczania	Rodzaj podłoża	Warunki inkubacji	
			temperatura °C	czas, h
1	2	3	4	5
1	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych tlenowych	agar z ekstraktem drożdżowym i glukozą, lub agar wzbogacony z glukozą	30 ± 1	48 ÷ 72
2	Liczba przetrwalników bakterii mezofilnych tlenowych		30 ± 1	48 ÷ 72
3	Pleśnie i drożdże	podłoże z ekstraktem drożdżowym, glukozą i antybiotykiem wg ISO lub agar z brzeczka	22 ÷ 25	3 ÷ 5 dni
4	Miano coli	podłoże z żółcią i zielenią brylantową	30 ± 1	48
5	Enterokoki	podłoże z azydkiem sodu i fioletem krystalicznym	37 ± 1	do 48
6	Wykrywanie bakterii przetrwalnikujących beztlenowych	podłoże Wrzoska	37 ± 1	24 ÷ 48
7	Wykrywanie obecności gronkowców chorobotwórczych koagulazododatnich	wg PN-75/A-04024		
8	Wykrywanie obecności bakterii rodzaju Salmonella w 25 g produktu	wg BN-84/8070-06		

3.3. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych metodą płytkową

3.3.1. Wykonanie posiewu. Przed przystąpieniem do posiewów należy dokładnie oznakować płytki (nr i rodzaj próbki, rozcieńczenie, data badania itp.).

Z trzech kolejnych rozcieńczeń, np. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , przygotowanych zgodnie z p. 3.1.3, przenieść pipetą pojemności po 1 ml każdego rozcieńczenia na dwie równoległe płytki Petriego. Badany materiał zalać (najpóźniej po 20 min) rozpuszczonym i ostudzonym do temperatury $45 \div 50^{\circ}\text{C}$ agarem z ekstraktem drożdżowym i glukozą (załącznik 4 p. 7) lub agarem wzbogaconym z glukozą (załącznik 4 p. 8) w ilości do 15 ml. Posiewy wymieszać dokładnie poruszając ostrożnie zamkniętą płytkę ruchem okrężnym w celu dokładnego wymieszania.

Po zestaleniu agaru płytki odwrócone dnem do góry wstawić do cieplarki o temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ na 48 h.

W celu uniknięcia przerostu kolonii po zastygnięciu, powierzchnię płytek można zalać cienką warstwą agaru wodnego.

3.3.2. Odczytanie wyniku. Po okresie inkubacji płytki należy obejrzeć, a do liczenia przeznaczyć te, na których liczba kolonii waha się w granicach od 30 do 300. Przy liczeniu kolonii należy zaznaczyć 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. Przy obliczeniach i przedstawieniu wyniku końcowego za podstawę należy przyjąć średnią arytmetyczną liczby kolonii, które wyrosły na dwóch równoległych płytkach Petriego z jednakowego rozcieńczenia. Otrzymana liczba pomnożona przez odwrotność rozcieńczenia stanowi o ilości drobnoustrojów w 1 g badanego produktu.

Odczyt kolonii zaokrąglić następująco:

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

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

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

Wyniki podawać w postaci iloczynu liczby zawartej między 1,0 a 9,9 i odpowiedniej potęgi liczby 10.

3.4. Oznaczanie liczby przetrwalników bakterii tlenowych mezofilnych

3.4.1. Wykonanie posiewu. Rozcieńczone próbki przygotowane zgodnie z 3.1.3 przenieść do łaźni wodnej i ogrzewać przez 10 min w temperaturze $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ w celu zabicia form wegetatywnych bakterii przetrwalnikujących i natychmiast schłodzić do temperatury około 20°C . Dalej postępować zgodnie z 3.3, wysiewając każde rozcieńczenie na dwie równoległe płytki i zalewając podłożem wymienionym w załączniku 4 p. 7 lub 8.

3.4.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Po okresie inkubacji odczytać wynik wg 3.3.2.

Końcowy wynik przeliczyć na 1 g badanego materiału wg 3.3.3.

3.5. Oznaczanie miano coli

3.5.1. Wykonanie posiewu. Z trzech kolejnych rozcieńczeń (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) przygotowanych zgodnie z p. 3.1.3 przenieść po 1 ml do probówek z podłożem z żółcią i zielenią brylantową (załącznik 4 p. 9).

Probówki z posiewami umieścić w cieplarni w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ na 48 h.

3.5.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Zmętnienie i zmiana barwy podłoża oraz występowanie gazu w rurce Dürhama przynajmniej w dwóch na trzy posiane

próbówki wskazuje na obecność pałeczek z grupy coli. Wynik wyrazić mianem coli.

Miano coli jest to liczba określająca najmniejszą ilość badanego materiału (w g lub ml), w którym jeszcze stwierdzono bakterie grupy coli.

Dla potwierdzenia wyniku, z dwóch ostatnich rozcieńczeń, w których stwierdzono gaz, pobrać materiał i posiać metodą rozmazu na płytkę Petriego z wysuszonym podłożem Endo (załącznik 4, p. 10) tak, aby otrzymać wzrost pojedynczych kolonii.

Inkubację prowadzić w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 24 h.

Pałeczki z grupy coli rosną na podłożu Endo w postaci różowych lub czerwonych kolonii z metalicznym połyskiem. Z charakterystycznych kolonii należy sporządzić preparat mikroskopowy, barwiony metodą Grama. Pałeczki z grupy coli są gram-ujemne.

Jako miano coli podać ostatnie rozcieńczenie, w którym przy posiewie na podłożu z żółcią i zielenią brylantową, stwierdzono obecność pałeczek z grupy coli, potwierdzoną przez wzrost na podłożu Endo (załącznik 4, p. 10) i barwienie metodą Grama (załącznik 3).

3.6. Oznaczanie obecności enterokoków

3.6.1. Wykonanie posiewu. Z trzech kolejnych rozcieńczeń (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) przenieść po 1 ml do próbek zawierających pożywkę z azydkiem sodowym i fioletem krystalicznym przygotowaną wg załącznika 4 p. 11.

Posiewy inkubować w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ w ciągu 48 h.

3.6.2. Odczytanie wyniku. W razie obecności enterokoków w pożywce obserwuje się wzrost bakterii w ogólnej objętości — zmętnienie, któremu towarzyszy zmiana barwy na wyraźnie żółtą (barwy czerwonożółtej nie należy brać po uwagę).

Wynik podać jako obecność lub nieobecność enterokoków.

3.7. Oznaczanie liczby drożdży i pleśni

3.7.1. Wykonanie posiewu. Z trzech kolejnych rozcieńczeń (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), przygotowanych zgodnie z 3.1.3 przenieść po 1 ml badanego materiału na dwie równoległe płytki Petriego i zalać rozpuszczonym agarom z brzeczką o $\text{pH} = 3,5$ (załącznik 4, p. 12) lub podłożem z ekstraktem drożdżowym, glukozą i antybiotykiem wg ISO (załącznik 4, p. 13).

Posiewy inkubować w temperaturze $22 \div 25^{\circ}\text{C}$ przez $3 \div 5$ dni.

3.7.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Obserwację wzrostu kolonii prowadzić codziennie w celu uchwycenia właściwego momentu ich rozwoju, umożliwiającego dokładne obliczenie kolonii.

Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną z dwóch równoległych płytek. Oddzielnie liczyć kolonie drożdży i kolonie pleśni. Końcowy wynik przeliczyć na 1 g badanego materiału wg 3.3.3.

3.8. Oznaczanie bakterii beztlenowych przetrwalnikujących

3.8.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczenia 10^{-1} , przygotowanego zgodnie z 3.1.3 posiać po 1 ml do 2 próbek ze zregenerowanym (ogrzany w temperaturze 100°C przez 10 min, a następnie schłodzony strumieniem zimnej wody) podłożem Wrzoska (załącznik 4, p. 14), wprowadzając płyn pod warstwą parafiny.

Jedną próbkę po posiewie ogrzewać przez 10 min w temperaturze 80°C w celu zabicia form wegetatywnych. Posiewy inkubować w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez $24 \div 48$ h.

3.8.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Probówki oglądać już po 24 h inkubacji. Wystąpienie pęcherzyków gazu i zmętnienie podłoża wskazuje na obecność bakterii beztlenowych przetrwalnikujących.

Przy braku zmian przedłużyć inkubację do 48 h. W przypadku stwierdzenia w preparacie laseczek gram-dodatnich wykonać dalszą identyfikację potwierdzającą ich przynależność do bakterii beztlenowych sacharolitycznych, gazotwórczych lub bakterii beztlenowych mających zdolność redukcji siarczynu sodu, w tym celu pipetą pasterowską pobrać z dna próbówki nieco materiału, przenieść na płytkę Petriego i zalać ostudzonym do temperatury $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ podłożem Wilson-Blaira (załącznik 4 p. 15 i 16). Po ostygnięciu podłoża Wilson-Blaira, w celu stworzenia warunków beztlenowych płytkę zalać grubą warstwą agaru wodnego 1,5%.

Płytki z posiewem inkubować nieodwrócone w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 48 h. Zaczernienie całego podłoża lub wzrost czarnych kolonii świadczy o obecności bakterii przetrwalnikujących beztlenowych redukujących siarczyny. Równocześnie, w celu potwierdzenia obecności pałeczek gram-dodatnich należy ponownie pobrać z próbówki materiał pipetą pasterowską i przeszczepić na agar bulionowy z glukozą w wysokim słupku (załącznik 4 p. 20).

Do pożywki rozpuszczonej i ochłodzonej w temperaturze $45^{\circ}\text{C} \div 50^{\circ}\text{C}$ wprowadzić na dno próbówki $2 \div 3$ krople hodowli. Pożywkę schłodzić i wstawić na 48 h do cieplarki o temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Rozerwanie słupka agaru na skutek wytworzenia gazu wskazuje na obecność bakterii przetrwalnikujących beztlenowych sacharolitycznych. Wynik podać jako obecność lub nieobecność bakterii przetrwalnikujących beztlenowych.

3.9. Wykrywanie obecności bakterii rodzaju Salmonella w 25 g produktu — wg BN-84/8070-06.

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

K O N I E C

APARATURA, SPRZĘT, SZKŁO, MATERIAŁY POMOCNICZE

1. Aparatura

- a) Szafy chłodnicze lub lodówki z automatyczną regulacją o zakresie temperatur od 0 do +4°C.
- b) Homogenizator Unipan typ 302 z dostateczną liczbą wyjąłowanych pojemników i noży, lub aparat Stomacher z jałowymi woreczkami plastikowymi.
- c) Waga techniczna z kompletem odważników, ważąca z dokładnością do 0,1 g.
- d) Waga analityczna z kompletem odważników.
- e) Mikrowytrząsarka np. Micro-shaker typ 302 produkcji „Premed”.
- f) Pehametr.
- g) Autoklaw.
- h) Aparat Kocha.
- i) Młynek huraganowy (rozdrabniacz GM-2).
- j) Ciepłarka z termoregulacją o temperaturze 30°C ±1°C.
- k) Ciepłarka z termoregulacją o temperaturze 37°C ±1°C.
- l) Suszarka z termoregulacją o temperaturze 160 ÷ 180°C.
- m) Wirówka 3000 obr/min.
- n) Anareostat.
- o) Łażnia wodna z termoregulacją.
- p) Promienniki lub lampy UV.
- r) Mikroskop biologiczny z obiektywem immersyjnym.

2. Drobny sprzęt laboratoryjny

- a) Lupa o 8-krotnym powiększeniu.
- b) Ezy (oczko platynowe) wykonane z drucika platynowego (lub częścię tantalowego) umieszczonego w obsadce, wolny koniec zawija się w kształcie kółka o średnicy 2 ÷ 5 mm.
- c) Igły bakteriologiczne.
- d) Statyw do pipet.

e) Futerały metalowe do sterylizacji pipet i płytek Petriego.

- f) Noże.
- g) Pincety.
- h) Skalpele.
- i) Palniki gazowe.

3. Szkło laboratoryjne

a) 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 wyciągnięcie w kapilarę).

b) 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 powinny być zaokrąglone.

c) Płytki Petriego o średnicy wieczka 10 cm.

d) Probówki różnej wielkości, np.: 16 × 160 mm i 20 × 200 mm.

e) Pipety bakteriologiczne z wypływem pojemności: 1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml.

f) Cylindry pojemności: 100 ml, 200 ml, 1000 ml.

g) Rurki Dürhama.

h) Zlewki różnej pojemności.

i) Kolby: stożkowe z szeroką szyjką, płaskodenne różnej pojemności.

j) Szkiełka: przedmiotowe, nakrywkowe.

4. Materiały pomocnicze

a) Słoiki zamykane na szlif lub inne szczelnie zamykane pojemności 200 ÷ 1000 ml.

b) Pojemniki plastikowe z pokrywką o wymiarach około 30 × 20 × 15 mm.

c) Papier pergaminowy lub folia aluminiowa.

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 wyjąłować, 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). Dopuszcza się wyjąławianie przez zanurzenie w skażonym 70% (V/V) alkoholu i ostrożne opalenie bezpośrednio przed użyciem.

Słoiki i szkło laboratoryjnie umyć i wyjąławiać wg p. 3.

Papier lub folię wyjąławiać 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 wyjąłować 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 nie używane, w celu usunięcia niepożądanych substancji alkalicznych, należy umieścić na kilka godzin w 1% 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 szkło 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 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 etylowanego w stosunku 1:1.

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

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

Szczególnie ostrożnie należy obchodzić się ze szkłem (np. płytkami, probówkami), które bezpośrednio kontaktowały się z drobnoustrojami. Szkło zawierające ustroje chorobotwórcze umieszcza się w pojemniku z pokrywą specjalnie do tego celu przeznaczonym i wyjaławia w autoklawie w temperaturze 121°C przez 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

zadawalającego efektu, to przez parokrotne przepłukanie mieszaniną odtłuszczającą (załącznik 4 p. 2), 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 10 ÷ 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 pasterowskie pocięte na odcinki o długości około 15 cm i zatkałe z obydwu końców watą pakuje się w papier po 20 ÷ 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 temperaturze 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 wyjałowione przechowywać w czystych i szczelnie zamkniętych szafach laboratoryjnych.

4. PRZYGOTOWANIE FILTRÓW BAKTERIOLOGICZNYCH DO STERYLIZACJI ROZTWORÓW

Sączki Seitz'a należy zakładać do aparatu, nie dokręcając całkowicie nasadki i wyjaławiać wraz z aparatem w autoklawie po owinięciu górnej części aparatu w papier. Przed użyciem filtra 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 mufowym w temperaturze 500°C, przemyć wodą destylowaną i wyjaławiać wraz z korkiem gumowym dopasowanym do kolby ssawkowej po owinięciu w papier. Kolbę ssawkową owiniętą w papier wyjaławiać oddzielnie w suszarce.

ZALĄCZNIK 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 powierzch-

ni około 2 cm². Preparat wysuszyć w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu preparat utrwalić, przeprowadzając szkiełko trzykrotnie przez płomień na granicy świecącej i nieświecącej części płomienia.

2. Wykonywanie barwienia. Szkiełko z utrwalonym rozmazem umieścić na podstawce do barwienia i zalać fioletem krystalicznym (załącznik 4 p. 3), tak aby pokryć cały preparat. Po upływie $2 \div 3$ min preparat opłukać wodą i zalać płynem Lugola (załącznik 4 p. 4) na $1 \div 2$ min. Płyn Lugola zlać, a preparat przemywać 96% (V/V) alkoholem etylowym tak długo, aż spływający ze szkiełka (trzymanego skośnie) alkohol przesta-

nie się zabarwiać. Następnie przemyć wodą i nanieść roztwór fuksyny (załącznik 4, p. 5). Po upływie $15 \div 20$ s preparat wypłukać wodą, wysuszyć i oglądać pod immersją.

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

ZAŁĄCZNIK 4

ROZTWORY I PODŁOŻA

Postanowienia ogólne. Do regulowania pH roztworów i podłoży używać 10%, (m/m) roztworu wodorotlenku sodowego i 10% kwasu solnego.

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

Przygotowanie roztworów i podłoży mikrobiologicznych

Roztwory

1. Płyn do rozcieńczeń

Pepton 1,0 g.
Chlorek sodowy 8,5 g.
Woda destylowana 1000 ml.

Pepton i chlorek sodowy rozpuścić w wodzie przez gotowanie, doprowadzić do $\text{pH} = 7,2 \div 7,4$ i rozlać miarowo do butelek. Sterylizować przez 20 min w temperaturze 121°C . Końcowe pH powinno wynosić 7,0.

2. Mieszanina odtłuszczająca. Zmieszać równe objętości chloroformu i eteru. Przechowywać w butelce z ciemnego szkła.

3. Fiolet krystaliczny

Roztwór A: Fiolet krystaliczny 0,4 g.
Alkohol etylowy 96% (V/V) 10,0 ml.
Roztwór B: Fenol, roztwór 1% 100,0 ml.
Zmieszać roztwory A i B.

4. Płyn Lugola

Jod 10 g.
Jodek potasowy 20 g.
Woda destylowana 300,0 ml.

Jodek potasowy rozpuścić w kilku ml wody, dodać jod i po jego całkowitym rozpuszczeniu uzupełnić pozostałą wodą.

Do identyfikacji drobnoustrojów rozkładających skrobię stosować płyn Lugola rozcieńczony w stosunku 1:1.

5. Fuksyna fenolowa

Roztwór A: Fuksyna zasadowa 0,3 g.
Alkohol etylowy 96% (V/V) 10,0 ml.
Roztwór B: Fenol, roztwór 5% 100,0 ml.

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

6. Roztwór wodny fioletu krystalicznego 0,02%. 0,1 g fioletu krystalicznego wsypać do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, rozpuścić w około 50 ml wody desty-

lowanej, dobrze wymieszać i dopełnić wodą destylowaną do kreski.

Przechowywać w butelce z ciemnego szkła.

Podłoża

7. Agar z ekstraktem drożdżowym i glukozą

Ekstrakt drożdżowy 2,5 g.
Pepton 5,0 g.
Agar 15,0 g.
Glukoza 1,0 g.
Woda destylowana 1000 ml.

Składniki rozpuścić w wodzie na gorąco, doprowadzić do $\text{pH} = 7,4 \div 7,5$ i rozlać do kolb. Sterylizować przez 20 min w temperaturze 121°C . Końcowe pH powinno wynosić $7,0 \div 7,2$.

8. Agar wzbogacony z glukozą

Agar wzbogacony 1000 ml.
Glukoza 1,0 g.

Przygotować z suchego „Podłoża agar wzbogacony” produkowanego przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem zamieszczonym na opakowaniu.

Składniki rozpuścić w wodzie destylowanej, doprowadzić do $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$. Sterylizować przez 20 min w temperaturze 117°C .

9. Podłoże z żółcią i zielenią brylantową

Pepton 10,0 g.
Laktoza 10,0 g.
Ekstrakt żółci wołowej w proszku 20,0 g.
Woda destylowana 1000 ml.
Zieleń brylantowa roztwór 0,1% (m/m).

0,1 g zieleni brylantowej wsypać do kolby pomiarowej pojemności 100 ml. Rozpuścić w około 50 ml wody destylowanej, dobrze wymieszać i dopełnić wodą destylowaną do kreski. Przesączyć przez sączek z bibuły do butelki z ciemnego szkła. 13,3 ml 0,1% (m/m) roztwór zieleni brylantowej, 10,0 g peptonu i 10,0 g laktozy rozpuścić w około 750 ml wody destylowanej, dodać 20,0 g ekstraktu żółci wołowej. Ustalić pH pożywki do wartości $7,3 \pm 0,1$, zagotować, przesączyć przez bibułę. Dodać 13,3 ml 0,1% (m/m) roztworu zieleni brylantowej, uzupełnić wodą destylowaną do 1000 ml. Rozlać po 9 ml do jałowych próbek z rurkami fermentacyjnymi Dürhama i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 15 min. Końcowe pH pożywki powinno wynosić $7,4 \pm 0,1$.

10. Podłoże Endo

Wyciąg mięsny	1000 ml.
Pepton	10,0 g.
Chlorek sodowy	5,0 g.
Agar	20,0 g.
Laktoza	10 g.

Fuksyna zasadowa 3,0% (*m/m*) roztwór alkoholowy 10,0 ml; 3,0 g fuksyny krystalicznej zasadowej wsypać do kolby pomiarowej pojemności 100 ml, dodać około 50 ml 96,0% (*V/V*) alkoholu etylowego, wymieszać i dopełnić alkoholem etylowym do kreski. Otrzymany 3% (*m/m*) roztwór alkoholowy fuksyny zasadowej wstawić na 24 h do cieplarki o temperaturze 30°C, następnie przesączyć przez sączek z bibuły do butelki z ciemnego szkła.

Siarczyn sodowy bezwodny 10% (*m/m*) roztwór około 20,0 ml przygotowany w następujący sposób: 10,0 g siarczynu sodowego bezwodnego wsypać do jałowej kolby i wlać 90 ml jałowej wody destylowanej, dobrze wymieszać, a następnie gotować 10 ÷ 15 min na łaźni wodnej. Przechowywać w temperaturze 4 ÷ 8°C nie dłużej niż tydzień. W wyciągu mięsnym rozpuścić pepton, chlorek sodowy i agar. Doprowadzić pH 7,8 ± 0,1 zagotować, przesączyć przez watę, dodać laktozę i rozlać miarowo do butelek. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min. Do rozpuszczonego podłoża dodać fuksynę, a następnie siarczyn sodowy (10% (*m/m*)) świeżo przygotowany roztwór do odbarwienia i rozlać na płytki. Przechowywać w ciemnym miejscu nie dłużej niż 2 dni.

11. Podłoże z azydkiem sodowym i fioletem krystalicznym

Pepton tryptose (Difco)	20,0 g.
Głukoza	15,0 g.
Chlorek sodowy	5,0 g.
Fosforan potasowy dwuzasadowy (K ₂ HPO ₄)	2,7 g.
Fosforan potasowy jednozasadowy (KH ₂ PO ₄)	2,7 g.
Fiolet krystaliczny 0,1% (<i>m/m</i>) roztwór	1,25 ml.
Purpura bromokrezolowa 1,6% (<i>m/m</i>) roztwór alkoholowy	2,0 ml.
Azydek sodowy 1% (<i>m/m</i>) roztwór	0,4 ml.
Woda destylowana	1000 ml.

Do wody dodać wszystkie składniki z wyjątkiem fioletu krystalicznego (załącznik 4, p. 3) i wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Następnie dodać fiolet krystaliczny i zachowując warunki jałowości rozlać miarowo do probówek po 10 ml do każdej. Wartość pH podłoża powinna wynosić 7,3 ± 0,1. Kolor gotowego podłoża powinien być wiśniowofioletowy.

12. Agar z brzeczka o pH = 3,5

4% agar wodny	100 ml.
Brzeczka słodowa 14 ÷ 18° Błg	100 ml.

Brzeczka słodową rozcieńczyć wodą destylowaną do uzyskania 14 ÷ 18° Błg. Doprowadzić do pH = 3,5, rozlać miarowo po 100 ml. Osobno sterylizować roztwory: roztwór agaru wodnego oraz roztwór brzeczki w temperaturze 117°C przez 20 min. Przed posiewem roztwory oba połączyć w stosunku 1:1.

13. Podłoże z ekstraktem drożdżowym, glukozą i antybiotykiem wg ISO

Ekstrakt drożdżowy	5,0 g.
Głukoza	20,0 g.
Agar	12,0 ÷ 15,0 g.
Chloranfenikol lub chloromycetyna	100,0 mg.
Woda destylowana	1000,0 ml.

Wszystkie składniki rozpuścić w wodzie i nastawić pH na 6,6. Rozlać miarowo do mniejszych naczyń. Wyjaławiać w temperaturze 121°C. W przypadku braku chloranfenikolu można użyć oksytetracyklinę i gentamycynę. Przygotować roztwory:

50 mg oksytetracykliny + 50 ml wody.

50 mg gentamycyny + 50 ml wody.

Do 100 ml jałowego i ostudzonego do 50°C podłoża dodać 10 ml oksytetracykliny i 10 ml gentamycyny, zmieszać i rozlać na płytki. Podczas przechowywania w temperaturze 5°C antybiotyki w roztworach zachowują aktywność do 3 tygodni.

14. Podłoże Wrzoska

Pepton	10,0 g.
Chlorek sodowy	5,0 g.
Głukoza	5,0 g.
Kostki wątroby	0,5 × 0,5 × 0,5 cm.
Wyciąg z wątroby	1000,0 ml.

W wyciągu wątrobowym rozpuścić pepton i chlorek sodowy, doprowadzić pH do 8,2, zagotować, sprawdzić pH i przesączyć przez bibułę. Dodać glukozę, rozlać do probówek z uprzednio wyjałowioną wątrobą (2 ÷ 3 kostki), po czym pokryć powierzchnię 1 ÷ 2 ml jałowej parafiny płynnej. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min lub trzykrotnie w aparacie Kocha, pH końcowe powinno wynosić 7,4 ÷ 7,6.

Przed wysiewem materiału próbki z pożywką należy regenerować ogrzewając w temperaturze 100°C przez 10 min, po czym szybko ochłodzić w wodzie.

15. Agar wodny (do zalewania posiewów na podłożu Wilson-Blaira)

Agar	15 g.
Woda destylowana	1000 ml.

Rozpuścić agar w wodzie destylowanej i rozlać do butelek. Wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min.

16. Podłoże Wilson-Blaira

Agar wzbogacony (agar wzbogacony wg p. 8 + 1% glukozy)	1000 ml.
Chlorek żelazowy FeCl ₃ 8% (<i>m/m</i>) roztwór	10 ml.
Wodorotlenek sodowy NaOH 10% (<i>m/m</i>) roztwór	6 ml.
Siarczyn sodowy Na ₂ SO ₃ 20% (<i>m/m</i>) roztwór	100 ml.

Agar cukrowy rozlać do kolb po 100 ml 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, dokładnie wymieszać i rozlać na płytki.

17. Wyciąg mięsny

Do 1 kg mięsa wołowego oczyszczonego z kości, tłuszczu oraz ścięgien i przepuszczonego przez maszynkę do naczynia emaliowanego dodać 2000 ml wody wodociągowej (w przypadku złej jakości wody wodociągowej używać wodę destylowaną), pozostawić na 24 h w chłodnym miejscu w temperaturze około 10°C. Następnie podgrzać do 50°C i utrzymywać w tej temperaturze przez 1 h, po czym gotować przez 30 min.

Z powierzchni wyciągu mięsnego usunąć ewentualne pozostałe resztki tłuszczu. Gorący wyciąg mięsny przesączyć przez płótno dobrze wyciskając, zmierzyć objętość i dopełnić wodą do 2000 ml. Następnie przesączyć przez sącdek z bibuły. Wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min. Podany wyciąg mięsny można zastąpić preparatami handlowymi:

18. Bulion zwykły

Pepton	10,0 g.
Chlorek sodowy	5,0 g.
Wyciąg mięsny	1000,0 ml.

Do 1000 ml wyciągu mięsnego dodać 10 g peptonu i 5 g chlorku sodowego. Pepton i chlorek sodowy rozpuścić uprzednio w niewielkiej ilości gorącego wyciągu mięsnego. Doprowadzić pH do $7,8 \pm 0,1$ przy użyciu 10%(m/m) wodorotlenku sodowego (około 10 ml), gotować przez około 20 ÷ 30 min. Sprawdzić ponownie

pH bulionu, doprowadzić do pH 7,8, przesączyć przez sącdek z bibuły i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min. pH wyjałowionego bulionu powinno wynosić $7,5 \pm 0,1$.

19. Agar bulionowy zwykły

Bulion zwykły	1000,0 ml.
Agar	15,0 g.

Do 1000 ml bulionu zwykłego przygotowanego wg 18 dodać 15 g agaru i ogrzewać w parze bieżącej aż do roztopienia agaru. Następnie przesączyć na gorąco przez sącdek z waty, rozlać miarowo do kolb i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min. Wartość pH podłoża powinna wynosić $7,6 \pm 0,1$.

20. Agar bulionowy z glukozą i ekstraktem drożdżowym

Agar bulionowy	100,0 ml.
Glukoza	1,0 g.
Ekstrakt drożdżowy	1,0 g.

Rozpuścić agar bulionowy przygotowany wg p. 19 w parze bieżącej i dodać na każde 100 ml podłoża 1 g glukozy i 1 g ekstraktu drożdżowego. Rozlać do probówek do połowy wysokości. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Podłoże przechowywane w probówkach należy bezpośrednio przed posiewem gotować na łaźni wodnej przez 10 min.

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Krajowa Spółka Przedsiębiorstw Przemysłu Cukierniczego CUKRY Sp. z o.o., Warszawa.

2. 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)

BN-84/8070-06 Wyroby piekarskie i ciastkarskie. Mikrobiologiczne metody badań

BN-90/8094-17 Wyroby cukiernicze trwałe. Pobieranie próbek do badań mikrobiologicznych

3. Autorzy projektu normy — mgr inż. Maria Kosmala, mgr inż. Dorota Buchacz — Śląskie Zakłady Przemysłu Cukierniczego, Laboratorium Badawcze w Zabrze.