

PRZECHOWYWANIE W CHŁODNIACH	NORMA BRANŻOWA	BN-66
	Pomieszczenia chłodnicze Ocena skuteczności dezynfekcji	8160-02
		Grupa katalogowa XII 09

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy jest mikrobiologiczna ocena skuteczności dezynfekcji pomieszczeń chłodniczych.

1.2. Zakres stosowania normy. Postanowienia normy należy stosować przy mikrobiologicznej ocenie skuteczności dezynfekcji zamrażalni, komór składowych, przedsionków oraz chłodnic powietrza i innych pomieszczeń w chłodniach składowych.

2. MIKROBIOLOGICZNA OCENA CZYSTOŚCI POWIETRZA W POMIESZCZENIACH CHŁODNICZYCH

2.1. Przygotowanie pomieszczeń chłodniczych do przeprowadzenia oznaczania. Przed przystąpieniem do wykonania oznaczania wymieszać powietrze w pomieszczeniu przy pomocy wentylatora chłodnicy lub wentylatora przenośnego. Czas mieszania powietrza - około 30 min. Do wykonania oznaczania przystąpić po upływie 10 min od momentu włączenia wentylatora.

2.2. Wykonanie oznaczania

2.2.1. Przygotowanie płytek Petriego. Do szeregu płytek Petriego średnicy 10 cm rozlać około 20 cm³ agaru bulionowego przygotowanego wg załącznika 5 p. 1.3. Płytki te służą do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów.

Do drugiego szeregu płytek rozlać po około 20 cm³ agaru brzeczkowego, przygotowanego wg załącznika 5 p. 1.4. Płytki te służą do oznaczania ogólnej liczby drożdży i pleśni. Po zastygnięciu podłoża płytki wstawić na około 1 h do cieplarki o temperaturze 30°C, w celu podsuszenia.

2.2.2. Wykonanie pomiaru. W pomieszczeniu o powierzchni 40 m² lub powyżej rozstawić 10 płytek z agarem odżywczym i 10 płytek z agarem brzeczkowym. W pomieszczeniach o powierzchni mniejszej niż 40 m² rozstawić 5 płytek z agarem bulionowym i 5 płytek z agarem brzeczkowym. Płytki rozstawić na powierzchniach poziomych w różnych

punktach pomieszczenia, zdjąć przykrywkę, kładąc je w takiej pozycji, w jakiej zamyka się płytkę.

Otwarte płytki pozostawić na około 10 min, następnie je zamknąć, przenieść do cieplarki o temperaturze 22°C na 72 h i ustawić w pozycji odwróconej.

2.2.3. Obliczanie wyników. Po okresie inkubacji wyjąć płytki z cieplarki i policzyć kolonie wyrosłe na płytkach. Na płytkach z agarem bulionowym liczyć tylko kolonie bakterii. Na płytkach z agarem brzeczkowym liczyć oddzielnie kolonie drożdży i oddzielnie kolonie pleśni. W razie wątpliwości należy wykonać preparaty mikroskopowe przygotowane wg załącznika 4.

Za wynik (X) przyjąć średnią arytmetyczną liczby kolonii bakterii, drożdży i pleśni z 10 lub 5 płytek, po przeliczeniu na 100 cm² powierzchni płytki wg wzoru

$$X = \frac{n}{r^2} \cdot 100$$

w którym:

n - średnia arytmetyczna liczby drobnoustrojów z 10 lub 5 płytek,
r² - powierzchnia płytki.

2.2.4. Interpretacja wyników - wg tabl. 1.

Tablica 1

Ogólna liczba na 100 cm ² powierzchni płytki			Wynik dezynfekcji
bakterii	drożdży	pleśni	
0 ÷ 10	0 ÷ 10	0 ÷ 5	dobry
11 ÷ 25	11 ÷ 25	6 ÷ 12	dostateczny
powyżej 25	powyżej 25	powyżej 12	niedostateczny

Wynik dobry lub dostateczny kwalifikuje pomieszczenie do eksploatacji. Wynik niedostateczny kwalifikuje pomieszczenie do powtórnego przeprowadzenia dezynfekcji. Występowanie jednego rodzaju zakażenia - pleśni, bakterii lub drożdży - w granicach wyniku niedostatecznego decyduje o konieczności przeprowadzenia powtórnej dezynfekcji.

Zjednoczenie Chłodni Składowych
Ustanowiona przez Dyrektora Zjednoczenia Chłodni Składowych dnia 20 października 1966 r.
jako norma obowiązująca w zakresie metod badań od dnia 1 lipca 1967 r.
(Mon. Pol. nr 36/1967 poz. 175)

3. MIKROBIOLOGICZNA OCENA STOPNIA CZYSTOŚCI POWIERZCHNI METODĄ TAMPONOWĄ DZIESIECIOELEMENTOWĄ

3.1. Miejsce pobierania próbek. Próbki należy pobierać po 24 h po zakończeniu dezynfekcji, losowo, z dziesięciu różnych miejsc powierzchni podłogi, ścian, parowników w chłodniach i z powierzchni wewnętrznej kanału ssawnego.

3.2. Sposób pobierania próbek. Tampon przygotowany wg załącznika 2 p. 2.5 wyjąć jałową pincetą ze zlewki, zanurzyć w jałowym roztworze fizjologicznym z peptonem przygotowanym wg załącznika 3 p. 2 i nadmiar płynu usunąć przez przyciskanie do ścian kolby.

Do wybranej powierzchni przyłożyć uchwyłcony pincetą szablon wykonany z blachy nierdzewnej o wymiarach 5x5 cm, uprzednio wytarty watą nasyoną spirytusem i opalony nad płomieniem palnika. Następnie zetrzeć dokładnie tamponem powierzchnię ograniczoną ramką szablonu, pocierając najpierw równolegle do jednego z boków ramki, a następnie w kierunku prostopadłym do poprzedniego. Czyżność tę wykonać szybko w celu uniknięcia przymarzania tamponu i przenieść go szybko do wyjąłowanej kolby Erlenmayera.

3.3. Wykonanie posiewu. Do każdej kolby Erlenmayera z obraną próbą dolać 10 cm³ roztworu soli fizjologicznej z peptonem. Tampon wypłukać przez energiczne wytrząsanie kolbą Erlenmayera w ciągu 1 min. Do dwóch jałowych płytek Petriego przenieść po 1 cm³ popłuczyn.

Jedną płytkę zalać roztopionym i ostudzonym do 45°C agarzem bulionowym przygotowanym wg załącznika 5 p. 1.3, drugą agarzem brzeczkowym przygotowanym wg załącznika 5 p. 1.4. Dokładnie wymieszać przez poruszanie płytek ruchem kołowym po powierzchni stołu i pozostawić je do zastygnięcia podłoża, a następnie inkubować w temperaturze 22°C przez 72 h w pozycji odwróconej.

3.4. Odczytanie wyników. Po okresie inkubacji płytki wyjąć i policzyć wyroste kolonie. Jako wynik podać średnią arytmetyczną liczby kolonii z 10 płytek, przeliczoną na 1 cm² badanej powierzchni wg wzoru

$$a = \frac{\sum x}{n} \cdot 10$$

w którym:

$\frac{\sum x}{n}$ - średnia arytmetyczna liczby kolonii z 10 płytek,

gdzie

x - liczba kolonii drobnoustrojów wyrosłych na płytce,

n - liczba płytek (10),

25 - powierzchnia ograniczona ramką szablonu,

10 - ilość płynu, w którym wypłukiwano tampon.

3.5. Obliczanie współczynnika zmienności. Współczynnik zmienności (V) obliczyć wg wzoru

$$V = \frac{s}{\bar{x}}$$

w którym $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$ - standardowe odchylenie,

gdzie $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ - średnie arytmetyczne liczby kolonii z 10 płytek;

$(x_i - \bar{x})$ oblicza się następująco

$$(x_1 - \bar{x}) + (x_2 - \bar{x}) + (x_3 - \bar{x}) + \dots + (x_m - \bar{x})$$

gdzie:

x_1 - liczba kolonii na płytce 1,

x_2 - liczba kolonii na płytce 2,

x_3 - liczba kolonii na płytce 3,

x_m - liczba kolonii na płytce m .

3.6. Interpretacja wyników. Jeżeli współczynnik zmienności będzie większy niż 0,35, wynik dezynfekcji ocenia się jako niedostateczny i dezynfekcję należy powtórzyć.

Jeżeli współczynnik zmienności będzie mniejszy niż 0,35, ocenę wyniku dezynfekcji należy przeprowadzić zgodnie z tabl. 2.

Tablica 2

Liczba drobnoustrojów na 1 cm ² powierzchni	Wynik dezynfekcji
1	dobry
1 ÷ 5	dostateczny
ponad 5	niedostateczny

Wynik dobry lub dostateczny kwalifikuje pomieszczenie do eksploatacji, natomiast w przypadku wyniku niedostatecznego należy w pomieszczeniu ponownie przeprowadzić dezynfekcję.

K O N I E C

ZAŁĄCZNIK 1SPRZĘT I MATERIAŁY POMOCNICZE

- a) Ciepłarka z termoregulacją.
- b) Suszarka z termoregulacją.
- c) Autoklaw laboratoryjny.
- d) Aparat Kocha.
- e) Mikroskop.
- f) Palniki spirytusowe.
- g) Szablony metalowe z uchwytem (otwór 5 x 5 cm).
- h) Oczko platynowe (reza).
- i) Pincety.
- j) Kolby pomiarowe pojemności 100 i 1000 cm³.
- k) Kolby Erlenmayera pojemności 100 cm³ z szerokimi szyjkami lub duże szerokie próbówki.
- l) Kolba z dnem płaskim pojemności 500, 1000 i 2000 cm³.
- ł) Płytki Petriego średnicy 10 cm.
- m) Pipety bakteriologiczne pojemności 1 i 10 cm³.
- n) Zlewki pojemności 150 i 250 cm³.
- o) Szkiełka przedmiotowe.
- p) Wata.
- r) Gaza.
- s) Nici.
- t) Papier pakowy.
- u) Papier pergaminowy.
- w) Waga półtechniczna.
- x) Waga analityczna.
- y) Cukromierz Blg.
- z) Bibuła do sączenia.

ZAŁĄCZNIK 2SZKŁO LABORATORYJNE1. PRZYGOTOWANIE SZKŁA

1.1. Szkło nieużywane. W celu zubożenia substancji alkalicznych pozostałych na ściankach szkła – próbówki, kolby, płytki Petriego przed ich użyciem należy gotować przez 30 min w 1-procentowym roztworze kwasu solnego. Następnie spłukać w bieżącej wodzie i przenieść do naczynia z 1-procentowym roztworem węglanu sodowego i gotować również przez 30 min, po czym wymyć szkło szczotką w bieżącej wodzie, spłukać wodą destylowaną i wysuszyć.

1.2. Szkło używane. Po usunięciu zawartości wymyć szczotką w 2-procentowym roztworze mydła o temperaturze około 50°C, płukać w bieżącej wodzie wodociągowej w temperaturze około 50°C, a następnie w zimnej wodzie destylowanej. Pipety myć jak wyżej, jednak w przypadkach większego zabrudzenia zaleca się moczenie przez kilka godzin w około 2-procentowym roztworze fosforanu sodowego trójjasadowego, ogrzanego do temperatury 60 ÷ 80°C. Następnie płukać w ciepłej wodzie, a potem w zimnej destylowanej.

Szkiewka przedmiotowa umyć w gorącym roztworze mydła, wypłukać w wodzie bieżącej i destylowanej oraz zanurzyć w mieszaninie równych objętości alkoholu i eteru.

1.3. Przedmioty metalowe. Pincety, szablony oczyścić watą zwilżoną w alkoholu.

2. PRZYGOTOWANIE SPRZĘTU DO WYJAŁOWIENIA

2.1. Zasada ogólna. Sprzęt do wyjąłowania powinien być suchy.

2.2. Pipety. Górne otwory, które bierze się do ust, zatkać watą, zawinąć po jednej lub po kilka sztuk w papier pakowy albo włożyć do specjalnych puszek metalowych przeznaczonych do wyjąłowania pipet. Na dno puszek włożyć watę, aby nie połamać końca pipet.

2.3. Płytki Petriego. Do płytek Petriego dopasować wieczka i zawinąć w papier pojedynczo lub po kilka, albo umieścić w pudełku metalowym przeznaczonym do wyjąłowania płytek.

2.4. Kolby. Otwór kolby zamknąć korkiem z waty.

2.5. Przygotowanie tamponów. Odważyć wacik o masie około 150 mg, zawinąć w gazę i owinać nitką. Tak przygotowane tampony w liczbie około 30 umieścić w zlewce. Otwór zlewki przykryć papierem do pakowania i owinać cienkim sznurkiem.

3. WYJAŁAWIANIE SPRZĘTU

Szkło laboratoryjne przygotowane wg rozdz. 2 owinać w papier pakowy, wyjąłować w suszarce w temperaturze 160°C przez 2 godz lub w autoklawie, owinięte w papier pergaminowy, w temperaturze 121°C przez 30 min.

Pincety i szablony przetrzeć watą zwilżoną w alkoholu etylowym skażonym i opalić nad płomieniem palnika.

4. PRZECHOWYWANIE SPRZĘTU WYJAŁOWIONEGO

Szkło i sprzęt czysty, suchy i wyjąłowany należy przechowywać w miejscu suchym i zabezpieczającym przed kurzem.

ZAŁĄCZNIK 3ODCZYNNIKI I BARWNIKI

1. Roztwór węglanu sodowego około 1-procentowy. Do 1000 cm³ wody wodociągowej dodać 10 g węglanu sodowego.

2. Roztwór soli fizjologicznej z peptonem. Do 1000 cm³ wody destylowanej dodać 2 g chlorku sodowego i 3 g peptonu uprzednio rozpuszczonego na ciepło w niewielkiej ilości wody. Rozlać do kolb i wyjałowić w temperaturze 120°C przez 20 min.

3. Roztwór wodorotlenku sodowego. Do kolby pomiarowej pojemności 100 cm³ wsypać 10 g wodorotlenku sodowego, rozpuścić w około 70 cm³ wody destylowanej, dobrze wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.

4. Roztwór wodorotlenku potasowego. Do kolby pomiarowej pojemności 1000 cm³ wsypać 100 mg wodorotlenku potasowego, rozpuścić i uzupełnić wodą destylowaną do kreski.

5. Błękit metylenowy według Loefflera. Odważyć 0,3 g błękitu metylenowego o zawartości 90% barwnika i rozpuścić w 30 cm³ 95° alkoholu etylowego. Po całkowitym rozpuszczeniu barwnika w alkoholu do roztworu dodać 100 cm³ 0,01-procentowego roztworu wodorotlenku potasowego i całość dokładnie wymieszać.

ZAŁĄCZNIK 4BARWIENIE PREPARATÓW SZKIELKOWYCH METODĄ LOEFFLERA

1. Przygotowanie preparatów do badań mikroskopowych. Na szkiełkach przedmiotowych umieścić kroplę sterylnej wody wodociągowej i rozetrzeć nieco materiału pobranego oczkiem z hodowli agarowej. Preparat wysuszyć w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu utrwalić za pomocą 3-krotnego przeprowadzania szkiełka przez płomień palnika i następnie barwić.

2. Barwienie. Na utrwalony nad płomieniem preparat nałożyć błękitu metylenowego Loefflera, przygotowanego wg załącznika 3 p. 5 i pozostawić na preparacie przez 1 ÷ 2 min.

Następnie zlać barwnik, spłukać wodą destylowaną lub zwykłą i osuszyć bibułą. Na osuszony preparat położyć kroplę olejku cedrowego i oglądać pod obiektywem immersyjnym.

ZAŁĄCZNIK 5POŻYWKI1. PRZYGOTOWANIE POŻYWEK

1.1. Wyciąg mięsny. Mięso wołowe oczyszczone z kości, ścięgien i tłuszczu przepuścić przez maszynkę do mięsa do naczynia emaliowanego, zalać wodą w stosunku 1 kg mięsa na 2200 cm³ wody i odstawić na noc do chłodni. Następnego dnia gotować przez 30 min (licząc od czasu zagotowania), po przesączeniu przez płótno rozlać do kolb i wyjałowić w temperaturze 121°C przez 20 min.

1.2. Bulion zwykły

Wyciąg mięsny - 1000 cm³.

Pepton - 10 g.

Chlorek sodowy - 5 g.

Składniki zmieszać w naczyniu emaliowanym, podgrzać i rozpuścić na gorąco, doprowadzić odczyn do pH = 7,8 przy użyciu 10-procentowego roztworu wodorotlenku sodowego, gotować przez 30 min, przesączyć na gorąco przez bibułę, rozlać do kolb i wyjałowić w temperaturze 121°C przez 30 min. Wartość pH wyjałowionego bulionu powinna wynosić 7,4 ÷ 7,6.

1.3. Agar bulionowy 1,5-procentowy. Na 1000 cm³ bulionu przygotowanego jak w 1.2 dodać 15 g agaru i ogrzewać w parze bieżącej aż do roztopienia agaru. Przesączyć na gorąco przez sączek z waty, rozlać do kolb i wyjałowić w temperaturze 121°C przez 20 min. Wartość pH podłoża powinna wynosić 7,4 ÷ 7,6.

1.4. Agar brzeczkowy

1.4.1. Przygotowanie brzeczki. Jęczmień zwilżyć zimną wodą wodociągową i rozłożyć na wilgotnym materiale w ciemnym pomieszczeniu w temperaturze 35 ± 1°C, a gdy krętki będą dwa razy dłuższe od ziarna, jęczmień wysuszyć ciepłym powietrzem w temperaturze nie przekraczającej 50°C. 400 g jęczmienia otrzymanego w powyższy sposób zemleć na maszynce, wsypać do garnka i zalać 1600 cm³ wody destylowanej, podgrzanej do 48 ± 1°C. Zaznaczyć poziom otrzymanego zacieru w garnku i utrzymać temperaturę na poziomie 45°C przez 30 min, następnie, podnosząc powoli temperaturę do 70°C, sprawdzić scukrzenie skrobi do maltozy w następujący sposób: kroplę zacieru rozcieńczoną

go pięciokrotnie wodą destylowaną, przenieść na płytkę porcelanową lub szklaną, umieszczoną na białym papierze i dodać kroplę płynu Lugola. Przy całkowitym scukrzeniu skrobi występuje zabarwienie żółte.

Po uzyskaniu dodatniego wyniku próby na scukrzenie zacieru ostudzić do temperatury 30°C, dopełnić wodą destylowaną do poprzedniego poziomu i gdy się ostudzi, przeceścić ostrożnie z nad osadu przezroczystą brzeczkę przez płócienny worek. Można również stosować brzeczkę browarową.

1.4.2. Przygotowanie agaru brzeczkowego. 1000 cm³ brzeczeki słodowej rozcieńczyć wodą destylowaną do uzyskania stężenia $7 \pm 1^\circ \text{B}lg$. Ilość wody, jaką należy użyć do

rozcieńczenia brzeczeki, obliczyć w następujący sposób: po określeniu stężenia brzeczeki wyjściowej w stopniach Blg wykonać obliczenie na podstawie wzoru

$$X = 18,5 \cdot a - 100$$

w którym:

X - ilość wody potrzebnej do dodania do 100 cm³ brzeczeki wyjściowej,

a - stężenie brzeczeki wyjściowej.

Do 1000 cm³ rozcieńczonej brzeczeki słodowej dodać 20 g agaru i ogrzewać w parze bieżącej aż do roztopienia agaru. Następnie przesączyć na gorąco przez sączek z waty, rozlać do jałowych kolb i wyjąławić ogrzewając w temperaturze 117°C przez 20 min.