

WYROBY PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-86
	Margaryna Badania mikrobiologiczne	8050-04
		Zamiast BN-76/8050-04
		Grupa katalogowa 1269

1. WSTĘP

Przedmiotem normy są metody badań mikrobiologicznych margaryny oraz interpretacja wyników.

2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO BADAŃ

2.1. Przygotowanie próbek do analizy. Próbki tłuszczu powinny być po pobraniu bezzwłocznie skierowane do analizy mikrobiologicznej lub przechowywane nie dłużej niż 24 h w temperaturze 1—2°C.

2.2. Przygotowanie próbek do posiewu. Z próbki margaryny przeznaczonej do analizy mikrobiologicznej pobrać z zachowaniem jałowości około 50 g do jałowej kolby stożkowej pojemności 250 cm³ zamykanej korkiem. Kolbę z próbką wstawić do cieplarki lub łaźni wodnej o temperaturze 45°C. Kolbę wyjąć natychmiast po całkowitym roztopieniu próbki. Zawartość kolby dokładnie wymieszać, a następnie bezzwłocznie przystąpić do sporządzania szeregu rozcieńczeń.

2.3. Przygotowanie rozcieńczeń. Przygotować próbki zawierające po 9 cm³ płynu do rozcieńczeń wg załącznika 3 w liczbie odpowiadającej ilości rozcieńczeń.

Do sporządzania rozcieńczeń używać pipet oraz płynów ogrzanych do temperatury 45°C w cieplarce z zachowaniem warunków jałowości. W przypadku braku cieplarki, dopuszcza się lekkie ogrzewanie pipet nad płomieniem palnika. Do pierwszej próbki wprowadzić pipetą 1 cm³ roztopionej margaryny. Zawartość próbki wymieszać inną pipetą, używaną następnie do przenoszenia 1 cm³ tak otrzymanej mieszaniny do kolejnej próbki o wyższym rozcieńczeniu. Do mieszania płynu w próbce dopuszcza się użycie mikro-wstrząsarki.

Pipetę wprowadzić do próbki nie zanurzając w płynie. Pierwsze rozcieńczenie będzie wynosić 10⁻¹, następne 10⁻² itd. Bezpośrednio po sporządzeniu rozcieńczeń przystąpić do wykonywania oznaczeń.

3. METODY BADAŃ

3.1. Rodzaje i warunki badań — wg tablicy.

Rodzaj badania	Metodyka	Podłoże	Rozcień- czenie	Temperatura inkubacji, °C	Okres inku- bacji, h
Ogólna liczba drobnoustrojów tleno- wych, mezofilnych	posiew powierzch- niowy	agar odżywczy	10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	30	48 ÷ 72
Liczba drobnoustrojów kwaszących	posiew metodą za- lewową	podłoże Blickfeldta	10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	30 20	48 24
Miano <i>coli</i>	posiew do probówek	pożywka z żółcią i zielenią brylan- tową	brak rozcień- czenia 10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³	30	48
Liczba drożdży i pleśni	posiew powierzch- niowy	podłoże z chloramfe- nikolem	brak rozcień- czenia 10 ⁻¹ 10 ⁻²	25	24, 48, 72

Zgłoszona przez Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego
Ustanowiona przez Dyrektora Instytutu Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego dnia 16 kwietnia 1986 r.
jako norma obowiązująca od dnia 1 października 1986 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 12/1986 poz. 23)

cd. tablicy

Rodzaj badania	Metodyka	Podłoże	Rozcień- czenie	Temperatura inkubacji, °C	Okres inku- bacji, h
Oznaczenie obecności i liczby gron- kowców koagulazo-dodatnich	posiew powierzch- niowy	podłoże Baird- -Parkera	10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	37	24 ÷ 48
Liczba drobnoustrojów proteolitycz- nych	posiew metodą zale- wową	agar mleczny	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}	30	48
Liczba drobnoustrojów lipolitycznych	posiew powierzch- niowy	agar z tłuszczem margaryny	10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	30 pokojowa	72 72

3.2. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tleno- wych, mezofilnych

3.2.1. Wykonanie posiewu. Z odpowiednich rozcień-
czeń próbki — wg tablicy, przygotowanych wg 2.3
wysiać powierzchniowo po 0,1 cm³ mieszaniny na 2
płytki z agarem odżywczym uprzednio wysuszonym
(suszenie odwróconych dnem do góry płytek w tempe-
raturze 37°C). Posiany materiał rozprowadzić równo-
miernie na całej powierzchni płytek za pomocą jałowe-
go pręcika szklanego. Płytki pozostawić do wsiąknięcia
posianego materiału w podłoże. Inkubować w tempera-
turze 30°C w ciągu 48 ÷ 72 h — wg tablicy.

3.2.2. Odczytanie i interpretacja wyników. Kolonie,
które wyrosły na powierzchni podłoża należy policzyć
na dwóch równoległych płytkach posianych z tego sa-
mego rozcieńczenia dobierając do liczenia te płytki,
na których wyrosło od 30 do 300 kolonii.

Jeśli na połowie lub więcej niż połowie powierzchni
stwierdza się wzrost zalewowy — wynik oznaczania jest
nieważny. Jeśli wzrost zalewowy zajmuje mniej niż
połowę powierzchni płytki — liczy się kolonie na po-
zostałej części i przelicza na całkowitą powierzchnię.
Oblicza się średnią arytmetyczną obu płytek. Otrzyma-
ny wynik mnoży się przez stopień rozcieńczenia i przez
10. Wynik podaje się w postaci potęgowej (np. 15 000
— podać 1,5 · 10⁴). Wyraża on liczbę drobnoustro-
jów w 1 g próbki.

3.3. Oznaczanie liczby drobnoustrojów kwaszających

3.3.1. Wykonanie posiewu. Z odpowiednich rozcień-
czeń próbki wg tablicy wysiać po 1 cm³ na dwie równo-
ległe płytki. Wysiewy zalać rozpuszczonym i ostudzo-
nym do temperatury 45°C podłożem Blickfeldta,
uprzednio intensywnie mieszanym do uzyskania jedno-
rodnej zawiesiny. Płytki pozostawić do zestalenia. Inku-
bować w 30°C przez 48 h, a następnie w 20°C przez
24 h — wg tablicy.

3.3.2. Odczytanie liczby drobnoustrojów kwaszających.
Po upływie czasu inkubacji, obliczyć na dwóch równo-
ległych płytkach liczbę kolonii rozjaśniających podłoże.

Do liczenia wybierać płytki, w których liczba kolonii
zawiera się między 15 a 150. Liczbę drobnoustrojów
kwaszających w 1 g produktu oblicza się mnożąc średnią
arytmetyczną liczby kolonii dwóch płytek rozjaśniają-
cych podłoże, z tego samego rozcieńczenia, przez sto-
pień rozcieńczenia. Wynik podaje się w postaci potę-
gowej, jak w 3.2.2.

3.4. Oznaczanie miana pałeczek z grupy *coli*

3.4.1. Wykonanie posiewu. Z każdego rozcieńczenia
— wg tablicy przenieść po 1 cm³ do dwóch probówek
z pożywką z żółcią i zielenią brylantową. Posiew można
wykonać jedną pipetą zaczynając od najwyższego roz-
cieńczenia. Podłoża z posiewami inkubować w tempe-
raturze 30°C przez 48 h (wg tablicy).

3.4.2. Odczytanie wyników. Zmętnienie pożywki z żół-
cią i zielenią brylantową oraz obecność gazu w co naj-
mniej około 1/3 rurki Durhama traktuje się jako stwier-
dzenie wzrostu pałeczek z grupy *coli*. Wynik należy wy-
razić mianem *coli*. Jeśli, przykładowo, stwierdza się
wzrost pałeczek z grupy *coli* w rozcieńczeniu 10⁻² w co
najmniej jednej probówce, wynik należy podać w nastę-
pujący sposób: stwierdzono wzrost w 0,01 g.

3.5. Oznaczanie liczby drożdży i pleśni

3.5.1. Wykonanie posiewu. Należy wykonać posiew
powierzchniowy na podłoże z chloramfenikolem — po
0,1 cm³ z odpowiednich rozcieńczeń na dwie płytki
wg tablicy. Posiany materiał rozprowadzić jałowym
pręcikiem szklanym na powierzchni podłoża, po jego
wsiąknięciu płytki inkubować w temperaturze 25°C
przez 24, 48 i 72 h — wg tablicy. Płytki do posiewów
próbki nie rozcieńczonej powinny być ogrzane w ciep-
larce do temperatury 45°C.

3.5.2. Odczytanie wyników. Należy oddzielnie poli-
czyć kolonie drożdży i pleśni. Do obliczeń wybierać
płytki posiane z dwóch kolejnych rozcieńczeń, w któ-
rych liczba wyrosłych kolonii zawarta jest między 10
a 150. W przypadkach trudności odróżnienia kolonii
drożdży od pleśni należy posłużyć się mikroskopem
binokularnym o powiększeniu około 10×. Kolonie na-
leży oglądać w świetle padającym, zwracając uwagę na
występowanie strzępek bądź pojedynczych komórek.

Liczbę drożdży i pleśni w 1 g obliczyć wg wzoru

$$X = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot f}$$

w którym:

- c — suma odczytów z płytek z dwóch kolejnych
rozcieńczeń,
- n_1 — liczba płytek wybranych do liczenia z niższego
rozcieńczenia,
- n_2 — liczba płytek wybranych do liczenia z wyższego
rozcieńczenia,
- f — współczynnik niższego rozcieńczenia.

Przykład

Rozcieńczenie 10^{-2} 128 i 130 kolonii
 Rozcieńczenie 10^{-3} 20 i 18 kolonii
 Liczba drobnoustrojów w 1 g = $\frac{128 + 130 + 20 + 18}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} =$
 $= \frac{296}{0,022} = 13\,455 \approx 1,3 \cdot 10^4$
 Wynik podać wg 3.2.2.

3.6. Oznaczanie liczby gronkowców koagulazo-dodatnich

3.6.1. Wykonanie posiewów. Z próbki nie rozcieńczonej przenieść po $0,1\text{ cm}^3$ na środek trzech płytek z podłożem Baird-Parkera oraz po $0,1\text{ cm}^3$ na dwie płytki z rozcieńczeń 10^{-1} ; 10^{-2} i 10^{-3} . Płytki do posiewów próbki nie rozcieńczonej powinny być ogrzane w cieplarni do temperatury 45°C . Materiał rozprowadzić jałowym pręcikiem szklanym (wg 3.2.1) równomiernie na całej płytce. Posiewy inkubować w temperaturze 37°C w ciągu $24 \div 48\text{ h}$ — wg tablicy.

3.6.2. Wybór płytek i identyfikacja podejrzanych kolonii. Do liczenia należy wybierać płytki, na których wyrosło od 15 do 150 kolonii. Dla stwierdzenia obecności gronkowców koagulazo-dodatnich można wybierać płytki posiane z nie rozcieńczonej próbki, na których liczba kolonii jest niższa niż 15, jednak wynik będzie statystycznie niepewny, toteż należy go traktować jedynie jako stwierdzenie obecności gronkowców w $0,1\text{ g}$. Policzyć typowe kolonie, tzn. czarne, połyskliwe, wypukłe i otoczone jasną strefą, która może być mętna. Kolonie atypowe, tzn. czarne, połyskliwe, wypukłe, ale bez strefy przejaśnienia należy policzyć oddzielnie.

Jeżeli po 24 h inkubacji identyfikacja nastręcza trudności, płytki należy oglądać po 40 h, nie później jednak niż po 48 h.

Z płytek, na których liczba typowych i atypowych kolonii zawiera się między 15 a 150 wyizolować po 5 typowych i 5 atypowych kolonii. Materiał z powyższych kolonii przesiać na bulion odżywczy i inkubować w 37°C w ciągu $20 \div 24\text{ h}$.

Do małych probówek dodać po $0,3\text{ cm}^3$ rozcieńczonej plazmy króliczej w stosunku 1:5 (wg załącznika 4). Następnie dodać po $0,1\text{ cm}^3$ hodowli bulionowej gronkowców. Inkubować w 37°C przez 6 h, sprawdzając co godzinę, czy plazma uległa ścięciu. Jako kontroli użyć probówki z bulionem odżywczym i plazmą, lecz bez zaszczepu.

Za wynik dodatni przyjmuje się uzyskanie takiego skrzepu, który nie wypada z probówki po odwróceniu jej dnem do góry.

3.6.3. Interpretacja wyników. Za bakterie należące do gatunku *Staphylococcus aureus* uważa się mikroorganizmy, które tworzą charakterystyczne kolonie na powierzchni selektywnego podłoża i wykazują dodatnią reakcję na koagulazę dającą twardy skrzep, to znaczy taki, który nie wypada z probówki po odwróceniu jej otworem w dół.

Jeśli na płytce zawierającej typowe i atypowe kolonie żadna z atypowych kolonii nie dała koagulazo-dodatniej reakcji, bierze się pod uwagę tylko typowe kolonie jako *Staphylococcus aureus*. Jeśli co najmniej 80% wyizolowanych kolonii dało reakcję koagulazo-dodatnią, liczba *Staphylococcus aureus* powinna być podawana na podstawie ilości wszystkich izolowanych kolonii.

We wszystkich pozostałych przypadkach liczba *Staphylococcus aureus* powinna być podawana na podstawie procentu koagulazo-dodatnich kolonii w stosunku do ilości wszystkich izolowanych kolonii. Liczbę gronkowców oblicza się mnożąc średnią arytmetyczną ilości kolonii z płytek posianych z tego samego rozcieńczenia przez stopień rozcieńczenia i przez 10. Wynik podać wg 3.2.2.

3.7. Oznaczanie liczby drobnoustrojów proteolitycznych

3.7.1. Wykonanie posiewów. Posiewy należy wykonać dodając na dwie płytki po 1 cm^3 z odpowiednich rozcieńczeń — wg tablicy, przygotowanych wg 2.3. Następnie płytki należy zalać agarem mlecznym — wg załącznika 3, ostudzonym do temperatury około 50°C . Posiewy inkubować w 30°C przez 48 h — wg tablicy.

3.7.2. Odczyt i interpretacja wyników. Po okresie inkubacji płytki należy zalać 1% roztworem taniny przygotowanym wg załącznika 4. Podłoże staje się brązowe, jedynie dookoła kolonii rozkładających kazeinę jest widoczna jasna obwódka, co pozwala je odróżnić od kolonii bakterii alkalizujących.

Liczbę bakterii proteolitycznych w 1 g produktu oblicza się mnożąc średnią arytmetyczną uzyskaną z policzenia ilości kolonii z jasną obwódką na dwóch płytkach posianych z tego samego rozcieńczenia przez stopień rozcieńczenia. Wynik podać wg 3.2.2.

3.8. Oznaczanie liczby drobnoustrojów lipolitycznych

3.8.1. Wykonanie posiewów. Posiewy należy wykonać metodą powierzchniową na podłożu agarowe z tłuszczem margaryny, przygotowane wg załącznika 3.

Z rozcieńczeń wg tablicy należy wysiewać po $0,1\text{ cm}^3$ na dwie płytki, rozprowadzając materiał jałowym pręcikiem szklanym (wg załącznika 1) równomiernie po całej powierzchni podłoża. Posiewy inkubować w 30°C przez 72 h, a następnie w temperaturze pokojowej przez dalsze 72 h.

3.8.2. Odczyt i interpretacja wyników. Po inkubacji (wg 3.8.1) płytki należy zalać nasyconym roztworem siarczanu miedzi i pozostawić przez 10 min. Następnie roztwór siarczanu miedzi należy wylać z płytki, wypłukać pod bieżącą wodą uważając, by nie spowodować oderwania się kolonii od powierzchni podłoża.

Należy określić liczbę kolonii (zabarwionych na kolor niebieski bądź zielony lub ze strefą naokoło kolonii podobnie zabarwioną) na dwóch płytkach posianych z tego samego rozcieńczenia. Do liczenia należy wybierać płytki, na których liczba zabarwionych kolonii zawiera się między 15 a 150. Liczbę bakterii w 1 g produktu oblicza się mnożąc liczbę zabarwionych kolonii przez stopień rozcieńczenia i przez 10. Wynik podać wg 3.2.2.

ZAŁĄCZNIK 1

SPRZĘT I SZKŁO

1. Autoklaw.
2. Ciepłarki z możliwością nastawienia na temperatury: 25, 30, 37 i 45°C.
3. Łaźnia wodna elektryczna.
4. Sterylizatory do suszenia i sterylizacji szkła na suche, gorące powietrze.
5. Mikroskop binokularny.
6. Mikrowstrząsarka.
7. Strzykawki i igły do iniekcji.
8. Pincety.
9. Kolby stożkowe pojemności 250 cm³ do roztapiania próbek, zamykane korkami z waty.

10. Probówki o wymiarach około 180/18 mm do przygotowywania płynu do rozcieńczeń w ilości 9 cm³, zamykane korkami o dowolnej konstrukcji zapewniającymi utrzymanie jałowości.

11. Małe probówki o wymiarach 100/10 mm do sprawdzania koagulacji plazmy króliczej, zamykane korkami z waty.

12. Płytki Petriego o średnicy około 10 cm.

13. Pipety mikrobiologiczne pojemności 1 i 25 cm³.

14. Pręciki szklane o średnicy 3,5 mm, długości 20 cm, zagięte pod kątem prostym w odległości 3 cm od jednego końca i obtopione na końcach.

15. Łopatki szklane.

16. Rurki Durhama.

ZAŁĄCZNIK 2

1. MYCIE SZKŁA I DROBNEGO
SPRZĘTU LABORATORYJNEGO

1.1. Szkło laboratoryjne nie używane moczyć 24 h lub gotować 30 min w 1% roztworze kwasu solnego. Po wygotowaniu wypłukać lub wymyć szczotką w 2% roztworze węglanu sodowego w temperaturze około 50°C, po czym starannie opłukać w gorącej wodzie bieżącej o temperaturze około 50°C, a następnie w zimnej wodzie destylowanej.

1.2. Szkło laboratoryjne używane po usunięciu z niego zawartości wymyć szczotką w 2% roztworze mydła o temperaturze około 50°C, po czym wypłukać w bieżącej wodzie wodociągowej o temperaturze około 50°C, a następnie w zimnej wodzie destylowanej.

Pipety myć jak wyżej, w przypadkach większych zabrudzeń zaleca się moczyć je kilka godzin w około 2% roztworze fosforanu sodowego trójzasadowego, ogrzanego do temperatury 60 ÷ 80°C.

Do mycia pipet zatłuszczonych można stosować mieszaninę chromową mocząc w niej pipety od kilku do 24 h. Następnie opłukać w ciepłej, a potem w zimnej wodzie destylowanej.

1.3. Szkło laboratoryjne po materiale zakaźnym należy przed myciem wyjałowić w autoklawie w temperaturze 121°C przez 30 min.

1.4. Przedmioty metalowe — skalpele, pincety oczyścić watą zwilżoną w alkoholu.

2. PRZYGOTOWANIE SZKŁA I DROBNEGO
SPRZĘTU LABORATORYJNEGO
DO STERYLIZACJI

2.1. Zasada ogólna. Szkło przygotowane do sterylizacji powinno być suche. W tym celu probówki, kolby i pipety przeznaczone do sterylizacji wstawiać po wy-

płukaniu do koszyków drucianych i suszyć w suszarkach w temperaturze nie wyższej niż 80°C.

2.2. Zamknięcia. Probówki i kolby zamknąć korkami. Kolby zabezpieczyć dodatkowo papierowymi kapтурkami zawiązanymi sznurkiem.

2.3. Pipety. Górne otwory zatkać watą, następnie zawinąć po jednej lub po kilka sztuk w papier lub włożyć do specjalnych puszek metalowych przeznaczonych do sterylizacji pipet. Na dno puszek włożyć watę, aby nie uszkodzić końców pipet.

2.4. Płytki Petriego. Do płytek Petriego dopasować wieczka i zawinąć w papier pojedynczo lub po kilka albo umieścić w puszkach metalowych przeznaczonych do sterylizacji płytek.

2.5. Pręciki i łopatki szklane zawinąć po kilka sztuk w papier pakowy.

3. STERYLIZOWANIE SZKŁA I DROBNEGO
SPRZĘTU LABORATORYJNEGO

3.1. Szkło laboratoryjne przygotowane wg załącznika 2 p. 2.1 wyjałowić w sterylizatorze w temperaturze 170°C przez 1 h.

3.2. Przyrządy metalowe sterylizować w autoklawie w 121°C przez 30 min.

4. PRZECHOWYWANIE SZKŁA I DROBNEGO
SPRZĘTU LABORATORYJNEGO
WYSTERYLIZOWANEGO

Szkło i przyrządy czyste, suche i wysterylizowane należy przechowywać w miejscu suchym i zabezpieczonym przed kurzem.

ZAŁĄCZNIK 3

PRZYGOTOWANIE PODŁOŻY

1. Płyn do rozcieńczeń

Pepton	1,0 g
Chlorek sodowy	8,5 g
Woda destylowana	1000 cm ³

Rozpuścić składniki w wodzie przez gotowanie. Doprowadzić pH do 7,0. Rozlać płyn miarowo do probówek po 9 cm³, sterylizować w 121°C przez 20 min.

2. Agar odżywczy do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, mezofilnych

Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Pepton	5,0 g
Glukoza	1,0 g
Agar	15,0 g
Woda destylowana	1000 cm ³

Składniki rozpuścić na gorąco i doprowadzić odczyn pH do 7,0. Rozlać do kolb i sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Przed posiewem powierzchniowym agar rozlać na jałowe płytki Petriego. Po zastygnięciu płytki suszyć, ustawiając dnem do góry — wieczka i denka — w temperaturze 37°C przez 1 h.

3. Podłoże Blickfeldta do oznaczania liczby drobnoustrojów kwaszających

Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Laktoza	10,0 g
Glukoza	10,0 g
Pepton	10,0 g
Agar	20,0 g
Węglan wapniowy	5,0 g
Woda destylowana	1000 cm ³

Cukry, pepton i ekstrakt drożdżowy rozpuścić w wodzie destylowanej, ogrzać do wrzenia i przesączyć przez bibułę. Następnie dodać węglan wapniowy, doprowadzić pH do 6,6 ÷ 6,8. Do tak przygotowanego podłoża dodać agar i ogrzewać w parze bieżącej do rozpuszczenia składników. Po rozpuszczeniu pożywkę wymieszać i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min.

4. Podłoże z żółcią i zielenią brylantową do oznaczania miana pałeczek z grupy coli

Pepton	10,0 g
Żółć wołowa	200,0 cm ³ lub ekstrakt w proszku 20 g
Laktoza	10,0 g
Zieleń brylantowa z roztworu 0,1%	13,3 cm ³
Woda destylowana	1000 cm ³

W 500 cm³ wody destylowanej rozpuścić pepton, dodać żółć wołową świeżą lub ekstrakt żółci w proszku i uzupełnić wodą do 1000 cm³, doprowadzić pH do 7,4 ± 0,1, zagotować, przesączyć przez bibułę, dodać laktozę i zielenie brylantową. Rozlać po 9 cm³ do probówek z rurkami Durhama. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min. Końcowe pH powinno wynosić 7,2 ± 0,1.

5. Podłoże z chloramfenikolem do oznaczania drożdży i pleśni

Ekstrakt drożdżowy	5,0 g
Glukoza	20,0 g
Chloramfenikol	0,1 g
Agar	15,0 g
Woda	1000 cm ³

Składniki rozpuścić stosując ogrzewanie, dodać 15 g agaru i zagotować lub ogrzewać w parze bieżącej do roztopienia agaru. Rozlać miarowo do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Po wyjałowieniu pH powinno wynosić 6,6 ± 0,1.

Podłoże rozlać na jałowe płytki Petriego. Płytki z rozlanym podłożem przed posiewem wysuszyć w cieplarni, tak jak w p. 2.

6. Podłoże Baird-Parkera do oznaczania liczby gronkowców

Bacto-tryptone	10,0 g
Ekstrakt mięsny	5,0 g
Ekstrakt drożdżowy	1,0 g
Chlorek litu (LiCl)	5,0 g
Glicyna	12,0 g
Agar	20,0 g
Pirogronian sodu	10,0 g
Woda destylowana	1000 cm ³

Rozpuścić składniki w wodzie destylowanej stosując ogrzewanie. Doprowadzić pH do 7,2. Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 15 min. Przed użyciem do rozpuszczonego i schłodzonego do temperatury 45 ÷ 50°C podłoża dodać przesączonego przez filtr Seitza 10 ml roztworu 1% tellurynu potasowego i 50 cm³ emulsji żółtka jaja kurzego wg załącznika 4. Podłoże rozlać na jałowe płytki Petriego i wysuszyć tak, jak w p. 2.

7. Agar mleczny do oznaczania drobnoustrojów proteolitycznych

Mleko	300 cm ³
Agar	21 g
Woda destylowana	700 cm ³

Świeże mleko należy podgrzać do 60°C, dobrze wymieszać, sterylizować w temperaturze 117°C przez 15 min. Oddzielnie należy przygotować roztwór agaru wodnego rozpuszczając 21 g agaru w 700 cm³ wody destylowanej. Agar wodny sterylizować w 121°C przez 20 min.

Do 300 cm³ mleka schłodzonego do temperatury pokojowej dodać 700 cm³ agaru wodnego schłodzonego do temperatury 56°C. Podłoże należy wylewać na płytki przy posiewie metodą zalewową.

Do odczytania wyników należy przygotować 1% roztwór taniny wg załącznika 4.

8. Agar z tłuszczem margaryny do oznaczania drobnoustrojów lipolitycznych

Ekstrakt drożdżowy	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Tłuszcz margaryny	50 cm ³
Woda destylowana	1000 cm ³

Wszystkie składniki, oprócz tłuszczu margaryny, należy rozpuścić w parze bieżącej, doprowadzić pH do $7,4 \pm 0,1$ i przefiltrować na gorąco przez filtr bibułowy. Doprowadzić pH do $7,2 \pm 0,1$ i sterylizować w 121°C przez 15 min. Tłuszcz margaryny należy oddzielić przez

ogrzewanie margaryny w 50°C w kolbie i ostrożnie zdekantować lub odpipetować. Sterylizować w 121°C przez 20 min. Do 1000 cm³ agaru drożdżowego należy dodać 50 cm³ tłuszczu margaryny w sposób jałowy. Emulgować przez intensywne mieszanie obniżając temperaturę mieszaniny do 50°C. Wylewać na płytki przy posiewie metodą zalewową. Przy sporządzaniu podłoża zamiast wytopionego tłuszczu z margaryny można użyć osnowy tłuszczowej.

Do odczytywania wyników przygotować nasycony roztwór siarczanu miedzi wg załącznika 4.

ZAŁĄCZNIK 4

ODCZYNNIKI I ROZTWORY

1. Kwas cytrynowy, roztwór 10%. Odważyć 10 g kwasu cytrynowego i rozpuścić w 100 cm³ wody destylowanej. Wyjałować w autoklawie w temperaturze 121°C przez 10 min.

2. Telluryn potasowy, roztwór 1%. 1 g tellurynu potasowego rozpuścić w kolbie pomiarowej w 100 cm³ wody destylowanej i wyjałować przez przesączenie przez filtr Seitza.

Roztwór przechowywać w temperaturze 4°C.

3. Emulsja żółtka jaja kurzego, zawiesina 20%. Świeże jajko umyć dokładnie wodą i mydłem. Zanurzyć w alkoholu etylowym 96% i po wyjęciu opalić. Rozbić skorupkę i oddzielić żółtko od białka. Żółtko w ilości 20 cm³ przenieść do 80 cm³ jałowego roztworu fizjologicznego chlorku sodowego. Przechowywać w temperaturze +4°C — nie dłużej niż 48 h.

4. Roztwór fizjologiczny chlorku sodowego, zbuforowany. 8,5 g chlorku sodowego rozpuścić w kolbie po-

miarowej w 1000 cm³ wody destylowanej, dodać 6 cm³ $\frac{1}{15}$ molowego roztworu jednozasadowego fosforanu sodowego (NaH₂PO₄). Rozlać do kolb, wyjałować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min. Końcowe pH powinno wynosić $7,0 \pm 0,1$.

5. Tanina, roztwór 1%. 1 g taniny rozpuścić w 100 cm³ wody destylowanej.

6. Plazma królicza rozcieńczona w stosunku 1:5. Plazmę króliczą pobrać z fiolki jałową strzykawką w ilości 1 cm³ i przenieść do probówki zawierającej roztwór fizjologiczny chlorku sodowego, zbuforowany, w ilości 4 cm³. Wymieszać jałową pipetą pojemności 1 cm³ i rozlać do małych probówek po 0,3 cm³ z zachowaniem warunków jałowości. Tak przygotowaną serię około 16 probówek plazmy należy zużyć w tym samym dniu.

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa.

2. Istotne zmiany w stosunku do BN-76/8050-04

a) wprowadzono oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, mezofilnych zamiast oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów niekwaszących,

b) wprowadzono oznaczanie liczby drobnoustrojów kwaszących,

c) wprowadzono metodę oznaczania liczby gronkowców chorobotwórczych na podłożu Baird-Parkera,

d) wprowadzono metodę oznaczania drobnoustrojów proteolitycznych na agarze mlecznym,

e) wprowadzono metodę oznaczania drożdży i pleśni na podłożu z chloramfenikolem zamiast na podłożu syntetycznym,

f) wprowadzono metodę oznaczania drobnoustrojów lipolitycznych na agarze z tłuszczem margaryny zamiast metody oznaczania na agarze z trójbutyryną,

g) zmieniono sposób przygotowywania rozcieńczeń próbki zmniejszając ilość płynu do rozcieńczeń, zamiast płynu Ringera zastosowano płyn do rozcieńczeń,

h) pominięto metodę oznaczania beztlenowców przetrwalnikujących, gazotwórczych,

i) zlikwidowano metodę filtrów membranowych do oznaczania miana *coli* oraz liczby drożdży i pleśni.

3. Autor projektu normy — mgr Paweł Kitzman — Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa.