



Rycina 1. Powody zakwestionowania produktów akwakultury

które odżywiają się poprzez filtrowanie, a należy podkreślić, że to one spożywane są na surowo (15). Jednocześnie w tkankach tych organizmów stwierdzono obecność naturalnych substancji antibakteryjnych: są to peptydy zawierające duże ilości cysteiny, które działają na określone bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Ze względu na występowanie tych substancji wynik badania mikrobiologicznego małży może być niejednoznaczny (16).

W grupie badań chemicznych (5,53% zakwestionowanych) na uwagę zasługuje fakt obecności dużej liczby substancji niedozwolonych z podgrupy B3 (pestycydów) zarówno w świeżych, jak i przetworzonych produktach akwakultury.

Podkreślić należy, że odsetek zakwestionowanych próbek produktów akwakultury był

stosunkowo niski (4,04%) i nie zakwestionowano żadnej próbki z powodów odchyień organoleptycznych i obecności radionuklidów.

Podsumowując można stwierdzić, że przeprowadzona analiza raportów Głównego Inspektoratu Weterynarii, a także dane piśmiennictwa (15) wskazują, że bezpieczeństwo spożywanych produktów akwakultury zależy od stosowania dobrej praktyki higienicznej w czasie ich przetwarzania, obrotu i dystrybucji.

Piśmiennictwo

1. Szweda W., Siwicki A. K., Terech-Majewska E. (red.): *ChOROBY MIĘCZAKÓW I SKORUPIAKÓW PODLEGĄCE OBOWIĄZKOWI ZWALCZANIA*. Wydawnictwo IRS. Olsztyn 2011 r.
2. RYNEK RYB stan i perspektywy nr 17 kwiecień 2012.
3. Hryszko K.: Sektor rybny w Polsce tendencje rozwojowe. *Przemysł Spożywczy* 2009, 63(9), 14-17.

4. Bykowski P.J.: Żywność pochodzenia morskogo korzyści dla zdrowia konsumenta. *Przemysł Spożywczy* 2011, 65 (12), 31-33.
5. Kołakowska A., Kołakowski E.: Szczególne właściwości żywieniowe ryb. *Przemysł Spożywczy* 2001, 55(6), 10-33.
6. Brzozowska E.: Ryby – wartość odżywcza i przydatność kulinarna. *Przemysł Spożywczy* 1998, 52 (7), 37-38.
7. Greła E., Pisarski R. K., Kowalczyk – Vasilev E., Rudnicka A.: Zawartość składników odżywczych, mineralnych i profil kwasów tłuszczowych w mięsie wybranych gatunków ryb w zależności od terminu odłowu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 4(71), 63-72.
8. Niewiadomska A., Kijanek T., Semenik S., Żmudzki J.: Zawartość pestycydów chloroorganicznych i kongenerów polichlorowanych bifenyli w rybach bałtyckich. *Med. Veter.* 2012, 68, 114-118.
9. Bykowski P.J.: Żywność pochodzenia morskogo konsumpcja a potencjalne zagrożenia. *Przemysł Spożywczy* 2010, 64(9), 34-38.
10. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* 2006, L 364, 5-24.
11. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* 2005, L 338, 1-26.
12. RRW – 5. Dział 3. Sprawozdanie GIW z wyników badań laboratoryjnych produktów pochodzenia zwierzęcego w Polsce za lata 2003–2011.
13. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 28 lipca 2006 r. w sprawie sposobu postępowania z substancjami niedozwolonymi, pozostałościami chemicznymi, biologicznymi, produktami leczniczymi i skażeniami promieniotwórczymi u zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego – Dz.U.147 poz. 1067.
14. Rozporządzenie (WE) Nr 853/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* 2004, L 139, 55.
15. Aguirre G.: Bezpieczeństwo ryb pochodzących z hodowli. *Magazyn Przemysłu Rybnego* 2006, 49 (1), 14-15.
16. Różańska H., Michalski M., Osek J.: Antibacterial activity of tissues of bivalve molluscs available on polish market. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2012, 56, 569-571.

Prof. dr hab. Krzysztof Szukcik,
e-mail: krzysztof.szukcik@up.lublin.pl

Nowe normatywne wytyczne w zakresie wytwarzania i stosowania pożywek mikrobiologicznych

Krzysztof Kwiatek

z Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

W badaniach stanu mikrobiologicznego żywności, pasz i wody, a tym samym w zapewnieniu ich bezpieczeństwa zdrowotnego dużą rolę odgrywa jakość użytych materiałów w połączeniu z jakością

wykonania tych badań. W ramach prowadzonych badań laboratoryjnych wymienionych matryc, wykonywanych w ramach kontroli wewnętrznej czy też urzędowej, należy zapewnić wiarygodność

otrzymywanych wyników. Oznacza to konieczność wdrożenia systemu zapewnienia jakości badań i uwzględnienia wszystkich elementów gwarantujących rzetelność i prawdziwość otrzymywanych rezultatów. Jednym z ważniejszych elementów zapewnienia jakości mikrobiologicznych badań laboratoryjnych jest stosowanie właściwych pożywek oraz zapewnienie stałości parametrów, jakimi się one charakteryzują. Stąd istnieje potrzeba normalizacji całego procesu przygotowywania, stosowania i kontroli jakości pożywek mikrobiologicznych. Jakość pożywek mikrobiologicznych stosowanych w różnego rodzaju badaniach, a więc i wiarygodność otrzymanego wyniku, uzależniona jest od wielu czynników, a w szczególności od jakości

New normative guidelines for production and use of microbiological culture media

Kwiatek K., Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs, National Veterinary Research Institute, Puławy

The purpose of this article was to present new guidelines (GLs) for manufacturing and use of culture media in diagnostic microbiology. Many tests and procedures which require various culture media during microbiological examinations are used. Therefore, they play crucial role in providing consistent and reliable results in diagnostic approach. Current requirements for the best quality of these products during each step of manufacturing resulted in elaborating the International Standards ISO/DIS 11133 which will be published in 2013. These documents provide terminology related to quality assurance and specify the requirements for preparation of culture media to be used during microbiological analysis of food, feed, water and other materials from the food production environment. In this paper requirements applicable to all categories of laboratory culture media for performing microbiological analysis are described and briefly discussed.

Keywords: microbiological culture media, quality standards.

poszczególnych składników i substancji stosowanych, poprawności procedur przygotowania czy odpowiedniego procesu pakowania i przechowywania (1).

Wytwórca pożywek lub laboratorium je przygotowujące muszą zapewnić, że gotowa do użycia pożywka odpowiada pod względem cech fizycznych, chemicznych i biologicznych określonemu standardowi. Zatem wdrożony system jakości powinien zapewniać otrzymanie odpowiednich cech wytworzonej i używanej w badaniach pożywki w zakresie parametrów ogólnych i hodowlanych (1, 2, 3). Stąd obecne dążenie w skali międzynarodowej do standaryzacji metod analitycznych dla wszystkich rodzajów badań, także mikrobiologicznych. Chodzi bowiem o opracowanie, a następnie zastosowanie w praktyce laboratoryjnej jednolitych metod badań mikrobiologicznych, odpowiednich dla różnego rodzaju matryc, dających powtarzalne oraz wiarygodne wyniki. W efekcie pozwoli to, aby były one porównywalne w przypadku wykonywania badań tej samej próbki w różnych laboratoriach, niezależnie od miejsca czy kraju. Powinno to pozwolić na wiarygodną, pełną i szybką identyfikację czynników zagrożeń mikrobiologicznych występujących w żywności, paszach i wodzie oraz ułatwiać podejmowanie coraz bardziej obiektywnych decyzji administracyjnych przez organy kontrolne. Jak ważny to element w zapewnieniu wiarygodności wyników, świadczy o tym nowe

podejście w skali międzynarodowej oraz UE w zakresie bezpieczeństwa łańcucha żywnościowego, gdzie określona jest hierarchia stosowania metod analitycznych do badań urzędowych żywności i pasz (4, 5).

Normalizacja metod wytwarzania, stosowania i kontroli jakości pożywek

Wyrazem dążenia do dalszej harmonizacji metod kontroli jakości stosowanych pożywek jest ostatnio opracowany i poddany procedurze głosowania projekt normy ISO/DIS 11133-1:2012 pt.: „Mikrobiologia żywności i pasz – Przygotowywanie, wytwarzanie, przechowywanie i kontrola jakości pożywek” (Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media; 6). Głosowanie nad tym projektem trwało do 2 stycznia 2013 r. i zakończyło się przyjęciem projektu do publikacji. W tym artykule przedmiotem omówienia będzie część normy poświęcona kwestiom wytwarzania, stosowania i przechowywania pożywek, które mają być użyte w laboratorium. Zagadnienie kontroli jakości pożywek podczas ich przygotowywania i stosowania będzie przedmiotem oddzielnego artykułu.

Na wstępie należy wskazać, że projekt normy ISO 11133 w rozdziale 3 zawiera ogólną terminologię odnoszącą się do systemu zapewnienia jakości przygotowywanych pożywek stosowanych w badaniach mikrobiologicznych produktów spożywczych, pasz i wody. Podobnie jak w poprzednich dokumentach normalizacyjnych z tego zakresu, określono, że podane wymagania mają zastosowanie do kategorii pożywek wykorzystywanych w laboratoriach, które są przygotowywane i/lub używane podczas wykonywania analiz mikrobiologicznych, a mianowicie pożywek:

- gotowych do użycia wytworzonych w celach handlowych;
- wymagających upłynnienia, uzupełnienia i rozlania;
- przygotowanych z dostępnych na rynku suchych półproduktów;
- przygotowanych z pojedynczych składników.

Dla celów normy podano szereg ujednoliconych terminów i definicji związanych z wytwarzaniem i kontrolą pożywek. Zdefiniowano, że kontrola jakości oznacza operacje techniczne i działalność podejmowaną w celu spełnienia wymogów jakościowych pożywek. Określono także, że w rozumieniu dokumentu partia pożywki jest to w pełni identyfikowalna jednostka danej pożywki odnosząca się do określonej masy, półproduktu lub końcowego produktu, cechująca się jednolitością pod względem rodzaju i jakości, a także spełniająca wymagania produkcyjne (kontrola

procesu produkcji) i kryteria wykonania, która została wytworzona w trakcie jednego określonego cyklu produkcyjnego, oznaczona tym samym numerem serii. W dalszej części omawianej normy podano szereg definicji dla różnych rodzajów pożywek, począwszy od definicji ogólnej, co to jest pożywka, poprzez pożywki klasyfikowane na podstawie składu, konsystencji, sposobu użycia i przygotowania, a skończywszy na pożywce referencyjnej.

Wart podkreślenia jest fakt, że w prezentowanej normie podano bardzo istotną z praktycznego punktu widzenia praktyczną klasyfikację i definicje dotyczące drobnoustrojów testowych, a mianowicie, co to jest:

- **organizm testowy** (test organism) – jest to drobnoustrój ogólnie stosowany do kontroli przydatności pożywek;
 - **szczep referencyjny** – (reference strain) – drobnoustrój otrzymany bezpośrednio z uznanej kolekcji szczepów, która jest członkiem Światowej Federacji Kolekcji Szczepów (World Federation of Culture Collections) lub Europejskiej Organizacji Kolekcji Szczepów (European Culture Collections Organisation), określony przynajmniej co do rodzaju i gatunku, skatalogowany i opisany pod względem cech, przy jednoczesnym wskazaniu preferowanego źródła pochodzenia, takiego jak żywność lub woda, jeżeli to ma zastosowanie;
 - **szczep macierzysty** (reference stock) – zestaw odrębnych, identycznych szczepów, uzyskanych w laboratorium z pierwszego pasażu szczepu referencyjnego otrzymanego z laboratorium lub też od dostawcy;
 - **kultura macierzysta** (stock culture) – pierwsza kultura otrzymana ze szczepu referencyjnego;
 - **kultura robocza** (working culture) – jest to kultura uzyskana ze szczepu referencyjnego lub szczepu macierzystego, lub materiału referencyjnego, certyfikowana albo niecertyfikowana.
- Ponadto w omawianym dokumencie zdefiniowano, że materiał referencyjny to materiał zawierający określoną liczbę możliwych do ożywienia drobnoustrojów, równomiernie rozmieszczonych, o stabilnej liczbie. Certyfikowany materiał referencyjny to materiał, w którym liczba drobnoustrojów jest potwierdzona odpowiednim certyfikatem.
- W rozdziale 4 norma podaje wytyczne dotyczące zapewnienia jakości pożywek w czasie ich przygotowania i stosowania. W pierwszej kolejności określono, że w systemie zapewnienia jakości zaleca się, aby wytwórca lub producent pożywek udostępnił klientowi następujące dane:
- nazwę pożywki, pojedyncze składniki i suplementy oraz kody tych produktów;
 - kartę specyfikacji technicznej;

- informacje o zasadach bezpieczeństwa i/lub zagrożeniach, o ile jest to konieczne;
- numer partii/serii;
- docelowa wartość pH kompletnej porcji przed zastosowaniem;
- informacje dotyczące przechowywania i przydatności do stosowania;
- certyfikat kontroli jakości i nazwę użytych organizmów testowych;
- wyniki testów kontrolnych w zakresie przydatności porcji, z uwzględnieniem kryteriów ich akceptacji.

W procesie akceptacji produktów przy dostawie dla każdej partii produktu (składnik lub porcja) należy sprawdzić następujące dane: znaki identyfikacyjne produktu, integralność opakowania, datę ważności produktu i dołączoną dokumentację. Ponadto należy zapisać datę otrzymania produktu. W trakcie przechowywania porcji we wszystkich sytuacjach postępować zgodnie z instrukcją producenta, dotyczącą warunków przechowywania, daty ważności i stosowania.

Zarządzanie jakością, kontrola gotowych do użycia i suchych porcji oraz suplementów

W przypadku stosowania gotowych, dostępnych w handlu porcji należy przestrzegać instrukcji producenta w zakresie warunków przechowywania, przydatności do użycia i stosowania.

Porcje suche dostarczane są w szczelnie zamkniętych pojemnikach, w postaci suchego proszku lub granulatu. Suplementy mające właściwości selektywne lub substancje diagnostyczne dostarczane są w postaci zliofilizowanej lub płynnej. Jednak zaleca się, aby zakupy były planowane w sposób zapewniający obrót w magazynie zgodnie z zasadą: „pierwsze przyszło – pierwsze wyszło” (first in – first out). W ramach prowadzonej gospodarki magazynowej porcji należy sprawdzić szczelność opakowania, zapisać datę pierwszego otwarcia i ocenić wizualnie zawartość otwartego opakowania. Szczególnie po otwarciu nowego pojemnika jakość porcji zależy od warunków przechowywania. Na utratę jakości suchej (odwodnionej) porcji wskazuje zmiana konsystencji sproszkowanej porcji, jej jednorodności, występujące zbrylenia czy zmiana zabarwienia. Każda sucha porcja, która wchłonęła wilgoć lub wykazuje jakiegokolwiek zmiany fizykochemiczne powinna być wybrakowana.

Ogólne zasady przygotowania porcji w laboratorium

W rozdziale 4.3 omawianej normy stwierdzono, że właściwe przygotowanie porcji jest jednym z najważniejszych etapów badania mikrobiologicznego i należy zwracać na to baczność. W szczególności należy

zadbać o przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP) oraz zaleceń producenta porcji w zakresie postępowania z suchymi porcjami i innymi składnikami, zwłaszcza zawierającymi niebezpieczne materiały, takie jak sole żółci czy inne selektywne czynniki. W przypadku sporządzania produktów należy bezwzględnie przestrzegać zaleceń producenta. Ważne jest zapisywanie wszystkich kluczowych danych dla zapewnienia jakości, takich jak: masa/objętość, wartość pH, data przygotowania, warunki sterylizacji czy wykonawca. W przypadku robienia porcji z pojedynczych składników należy przestrzegać dokładnie receptury i odnotowywać wszystkie istotne szczegóły procedury oraz dodatkowo zapewnić, aby wszystkie użyte składniki były w pełni identyfikowalne (kod i numer serii). Przewodność właściwa wody wytwarzanej w laboratorium nie powinna być wyższa niż $25 \mu\text{S cm}^{-1}$ (odpowiada oporności $0,4 \text{ M W cm}$) w temperaturze 25°C , jeśli nie jest to inaczej założone. Zaleca się, aby zanieczyszczenie mikrobiologiczne nie przekraczało $10^3/\text{ml}^{-1}$, a wartością preferowaną była liczba drobnoustrojów niższa od $10^2/\text{ml}^{-1}$. Zaleca się regularne przeprowadzanie badań mikrobiologicznych wody, sprawdzając zanieczyszczenie, zgodnie z ISO 6222 (inkubacja w temperaturze 22°C przez 68 h ± 4 h) lub zastosować inną zwalidowaną metodę. Do dokładnie odważonej odpowiedniej ilości sproszkowanej porcji (unikając wdychania pyłu, szczególnie w przypadku porcji zawierających substancje toksyczne) stopniowo dodawać wymaganą ilość wody, tak aby podczas mieszania uniknąć zbrylenia się porcji. W przypadku odwodnionych porcji wymagających właściwego i szybkiego rozpuszczenia należy stosować cykliczne lub stałe mieszanie przed i podczas ogrzewania. Zaleca się, aby porcje zawierające agar pozostawić zalane wodą przez kilkanaście minut w celu uwodnienia składników i ogrzewać mieszając w celu rozpuszczenia. Pomiaru wartości pH dokonywać za pomocą pH-metru i doprowadzić, jeżeli to konieczne, do takiej wartości, aby po schłodzeniu do temperatury 25°C porcja miała wymaganą wartość $\text{pH} \pm 0,2$ jednostki pH, chyba że są ustalone inne wymagania. Przy ustalaniu wartości pH należy korzystać z roztworu 1 mol/l NaOH (około 40 g/l) lub 1 mol/l HCl ($36,5 \text{ g/l}$). Jeżeli ustalanie wartości pH jest przeprowadzane po sterylizacji, używać roztworu uprzednio wyjałowionego. Produkowane porcje dostępne na rynku mogą wykazywać znaczne wahania pH przed i po sterylizacji. W przypadku stosowania wody destylowanej lub dejonizowanej ustalanie pH przed sterylizacją nie jest konieczne, należy rozlewać porcję do odpowiednio większych pojemników niż objętość porcji.

Zasady i sposób sterylizacji porcji

Steryлизację porcji na ogół wykonuje się za pomocą przegrzanej pary wodnej lub przez filtrację. Niektóre porcje nie wymagają sterylizacji, ale wystarcza ich zagotowanie przed użyciem, czyli pasteryzacja. Dla przykładu, porcje dla *Enterobacteriaceae* zawierające zielen brylantową są bardzo wrażliwe na ogrzewanie i światło, stąd zaleca się, aby były szybko schłodzone po zagotowaniu oraz chronione przed światłem. Również niektóre odczynniki mogą być używane bez sterylizacji, biorąc pod uwagę zalecenia odpowiednich norm międzynarodowych lub instrukcji producenta. Sterylizacja za pomocą przegrzanej pary wodnej jest przeprowadzana w autoklawie lub urządzeniu do przygotowywania porcji. Zazwyczaj proces sterylizacji trwa 15 min w temperaturze $121^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. W przypadku objętości większych niż 1000 ml należy dostosować cykl sterylizacji do zwiększonej objętości, gdyż wymaga ona innych parametrów obróbki termicznej. We wszystkich przypadkach należy postępować zgodnie ze wskazaniami zawartymi w odpowiednich normach międzynarodowych lub w instrukcjach producenta. Aby zapobiec przegrzaniu, po zakończeniu obróbki cieplnej ważne jest schłodzenie porcji. Odnosi się to szczególnie do porcji w dużych objętościach lub wrażliwych, np. zawierających zielen brylantową. Sterylizacja przez filtrację może być wykonywana w warunkach próżni lub nadciśnienia. Do tego celu należy stosować odpowiedni sprzęt i filtry membranowe o średnicy porów $0,22 \mu\text{m}$. Części aparatu do filtracji należy sterylizować zgodnie z PN EN ISO 7218 albo używać sprzętu wysterylizowanego wcześniej. Niektóre filtry membranowe mogą zatrzymywać białka albo inne substancje, np. antybiotyki. W celu uzyskania odpowiedniego stężenia należy używać filtrów wstępnie zwilżonych. Zaleca się, aby po sterylizacji, gotowaniu lub filtracji wszystkie porcje były monitorowane pod kątem wartości pH, zabarwienia, sterylności i fizycznej konsystencji.

Przygotowywanie suplementów stosowanych przy sporządzaniu porcji

W normie podkreślono, że nie można stosować suplementów po upływie okresu trwałości określonym przez producenta. W przypadku roztworów roboczych antybiotyków należy zużyć je tego samego dnia. W pewnych warunkach roztwory antybiotyków mogą być przechowywane w stanie zamrożenia, ale po rozmrożeniu nie mogą być ponownie zamrażane. Zaleca się, aby stopień potencjalnej utraty aktywności antybiotyków w trakcie mrożenia był ustalony z producentem lub określony przez użytkownika. Wyprodukowane

suplementy zawierające substancje toksyczne, szczególnie antybiotyki, powinny być traktowane z ostrożnością w celu uniknięcia pylenia się, co może powodować reakcje alergiczne u personelu laboratorium podczas przygotowywania roztworów. Podczas przygotowywania roztworów należy zastosować wszelkie środki ostrożności i postępować zgodnie z zaleceniami producenta.

Zasady przechowywania i określania trwałości przygotowanych pożywek

Okres trwałości pożywek mikrobiologicznych jest zróżnicowany w zależności od rodzaju i warunków przechowywania. Określone warunki i okresy trwałości mogą być zawarte w odpowiednich normach międzynarodowych i krajowych. Pożywki należy przechowywać w warunkach zapobiegających wystąpieniu jakichkolwiek modyfikacji ich składu, chroniąc przede wszystkim przed światłem, odwodnieniem oraz, jeżeli to konieczne, przechowywać w lodówce w temperaturze $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Na ogół zaleca się, aby nie przechowywać płytek z rozlaną pożywką dłużej niż od 2 do 4 tygodni, natomiast w przypadku pożywek rozlanych do butelek lub probówek okres ten wynosi od 3 do 6 miesięcy, jeżeli nie jest to inaczej podane w odpowiednich normach. Na podstawie wyników laboratoryjnych badań walidacyjnych trwałości czas przechowywania pożywek może być wydłużony. Zaleca się, aby pożywki, do których zostały dodane niestabilne suplementy, były użyte w dniu ich przygotowania. Inne okresy przydatności mogą być stosowane w przypadku istnienia zapisów w odpowiednich normach lub gdy wykazano w laboratoryjnych badaniach walidacyjnych dłuższy okres trwałości. Zaleca się, aby stałe pożywki zawierające chemicznie reaktywne i/lub niestabilne substancje nie były przechowywane na zapas w magazynie przed upłynięciem. Zaleca się, aby dla każdej pożywki przeznaczonej do przechowywania była ustalona zwalidowana data trwałości/przydatności. Obserwować należy również wszelkie zmiany zabarwienia pożywki, oznaki jej parowania/odwodnienia lub wzrost drobnoustrojów. Partie pożywek wykazujące takie zmiany nie powinny być stosowane w badaniach. Przed użyciem lub dalszą obróbką cieplną zaleca się wyrównanie temperatury pożywki z temperaturą otoczenia.

W przypadku pożywek gotowych należy przestrzegać zaleceń producenta w zakresie przechowywania, okresu trwałości i stosowania.

Przygotowanie pożywek do użycia w badaniach laboratoryjnych

Zestaloną pożywkę należy rozpuszczać przez umieszczenie jej w gotującej się wodzie lub

poprzez zastosowanie każdego innego procesu dającego identyczne wyniki (np. zastosowanie strumienia bieżącej pary wodnej). Pożywki, które były uprzednio sterylizowane, należy ogrzewać tak krótko, jak to jest możliwe, w celu zachowania ich jakości. Unikając należy przegrzewania, przerywając ogrzewanie pożywki zaraz po rozpuszczeniu. potem pozostawić w temperaturze pokojowej przez krótki okres, np. 2 min, celem uniknięcia pęknięcia szkła. Powinno się schłodzić rozpuszczoną pożywkę do temperatury $47\text{--}50^{\circ}\text{C}$ i trzymać do momentu zastosowania w łaźni wodnej z termostatem. Czas potrzebny do uzyskania temperatury od 47 do 50°C zależy od rodzaju pożywki, objętości i liczby pojemników umieszczonych w łaźni wodnej. Rozpuszczona pożywka powinna być zużyta tak szybko, jak to jest możliwe. Nie zaleca się przetrzymywania rozpuszczonej pożywki dłużej niż 4 h. Niewykorzystana pożywka nie powinna być ponownie upłynniwana do dalszego stosowania. W przypadku pożywek szczególnie wrażliwych czas przetrzymywania w formie upłynnionej powinien być skrócony, zgodnie z wymaganiami odpowiedniej normy międzynarodowej. Należy ponadto ustalić i dokumentować przestrzeganie parametrów temperatury poprzez ustawienie termometru w pożywce agarowej w osobnym pojemniku, podobnym do tego, w którym jest stosowana pożywka. Pożywki użyte w badaniu danej próbki powinny mieć temperaturę w zakresie od 44 do 47°C albo zgodną z wymaganiami odpowiedniej normy międzynarodowej. Jeżeli to konieczne, należy bezpośrednio przed użyciem ogrzewać pożywkę w gotującej wodzie lub w strumieniu bieżącej pary wodnej przez 15 min, z poluzowanymi korkami lub zamknięciami. Po ogrzewaniu korki trzeba szczelnie zamknąć i pożywkę szybko schłodzić do wymaganej temperatury roboczej. Zaleca się, aby wrażliwe na ciepło dodatki dodawać do pożywki po jej schłodzeniu do temperatury 47 do 50°C . Sterylne suplementy przed dodaniem do pożywki agarowej trzeba doprowadzić do temperatury pokojowej. Dodanie chłodnego suplementu do pożywki może doprowadzić do zestalenia się pożywki lub tworzenia się w niej przezroczyście strątołów. Wszystkie suplementy dodane do pożywki należy delikatnie i dokładnie wymieszać, a następnie jak najszybciej rozlać do pojemników.

Przygotowanie stałych pożywek agarowych na płytkach Petriego

Agar należy rozlewać na płytki w taki sposób, aby grubość warstwy pożywki wyniosła przynajmniej 3 mm (do płytek Petriego o średnicy 90 mm zazwyczaj wlewa się od 18 do 20 ml agaru). Płytki należy przykryć wieczkami i pozostawić do zestalenia na wy poziomowanej chłodnej powierzchni. Jeżeli

płytki są przechowywane lub inkubowane dłużej niż 72 h lub w temperaturze powyżej 40°C , trzeba rozlewać większą objętość pożywki. W czasie inkubacji posiewów dochodzi nieuchronnie do utraty wody z pożywki agarowej, co w pewnych sytuacjach może wpływać na wzrost drobnoustrojów. Natomiast stopień utraty wody uzależniony jest od szeregu czynników, a mianowicie: od składu pożywki, objętości pożywki obecnej na płytce, typ stosowanej cieplarki (wymuszony obieg powietrza zwiększa parowanie), wilgotności powietrza w cieplarni, sposobu ułożenia, i liczby płytek w cieplarni czy temperatury inkubacji. Ważnym elementem GLP jest to, aby natychmiast po przygotowaniu zużyć pożywkę agarową lub zapewnić takie warunki przechowywania, które chronią ją przed zmianą składu, tj. przechowywać w ciemności i/lub w chłodziarce w temperaturze $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ w szczelnych torebkach. Płytki należy oznaczyć na ich spodzie lub na boku, podając datę przygotowania i/lub datę ważności oraz dane umożliwiające identyfikację pożywki. Alternatywnie może być zastosowany system kodowania, który spełnia powyższe wymagania. Okres trwałości przygotowanych płytek z pożywką wydłuży się, jeżeli będą one przechowywane w szczelnych plastikowych opakowaniach. W celu uniknięcia skraplania wody płytki należy schłodzić przed zapakowaniem w szczelne opakowania. Nie suszyć powierzchni pożywki agarowej przed przechowywaniem w chłodziarce. Na ogół, w przypadku posiewów powierzchniowych na stałych pożywkach, płytki należy podsuszać. Najlepiej w tym celu uchylić wieczka i pozostawić odwrócone denkiem do góry płytki w cieplarni w temperaturze od 25 do 50°C lub w komorze laminarnej do chwili zniknięcia kropelek wody z powierzchni agaru. Nie należy przesuszać pożywek. Komercyjnie przygotowane płytki z pożywką należy przechowywać i stosować zgodnie z instrukcją producenta.

Piśmiennictwo

1. Kwiatek K., Hoszowski A.: *Kontrola jakości pożywek w laboratorium akredytowanym*. Monografia. PIWet. Puławy 2002.
2. Kwiatek K.: Normy metodyczne w urzędowym badaniu mikrobiologicznym żywności i pasz. *Życie Wet.* 2009, **84**, 816-821.
3. Kwiatek K.: Standaryzacja metod kontroli pożywek w skali międzynarodowej. *Życie Wet.* 2009, **84**, 910-913.
4. Norma PN-EN ISO 7218; 2007 Mikrobiologia żywności i pasz. Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych
5. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004 z 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych prowadzonych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia i dobrostanu zwierząt (Dz. U. UE L 139 z 30.04.2004, późn. zm.).
6. Projekt normy – prISO/DIS 11133: 2013. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Mikrobiologia żywności, pasz i wody. – Przygotowywanie, wytwarzanie, przechowywanie i kontrola jakości pożywek.

Prof. dr hab. Krzysztof Kwiatek,
e-mail: kwiatekk@piwet.pulawy.pl