



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 12.X.1964 (P 105 953)

Pierwszeństwo: -----

Opublikowano: 25.II.1966

Kl. 421, 5/10

MKP G 01 n 33/04



Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Bronisław Habaj, mgr inż. Kazimierz Hoppe

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Mleczarskiego (Zakład Czystych Kultur Mleczarskich), Olsztyn (Polska)

Sposób przygotowania wskaźników do szybkiego oznaczania miana coli w cieczach, zwłaszcza w mleku

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowania wskaźników do szybkiego oznaczania stopnia zakażenia bakteriami z grupy coli-aerogenes, zwanego mianem coli, ciekłych produktów, zwłaszcza mleka. Wskaźniki te zostały przez twórców nazwane coliwskażami.

Dotychczasowy sposób oznaczania bakterii z grupy coli-aerogenes w przemyśle mleczarskim oparty jest na metodzie Kessler-Swenartona. W metodzie tej używa się płynnych pożywek, w skład których wchodzi pepton tryptozą, laktozą, żółć wołowa i gencjana w określonych przez receptury proporcjach. Obecność bakterii objawia się przy hodowli na tej pożywce powstawaniem pęcherzyków gazu, które gromadzą się w małej probówce zatopionej do góry dnem w środowisku z pożywką. Wyniki badań otrzymuje się po 48 godzinach hodowli prowadzonej w warunkach laboratoryjnych w temperaturze 37—38 °C.

W wyniku długotrwałych badań opracowano, podłoże pozwalające na utrzymanie wskaźników do szybkiego, łatwego i prostego w wykonaniu oznaczania miana bakterii z grupy coli aerogenes zwanego mianem coli. Wskaźniki nazwane przez twórców coliwskażami wykonuje się z wyjałowionej promieniami ultrafioletowymi bibuły chromatograficznej, korzystnie nr 3 firmy Whatman przez zanurzenie do pożywki o temperaturze 60—70 °C.

Pożywka do nasycania bibuły zawiera na 1 litr wody destylowanej 30 g bulionu suchego, 6 g lak-

2

tozy rafinady, 2 g agar-agaru o krzepliwości w temperaturze 35 °C oczyszczonego uprzednio w temperaturze 70—80 °C i przefiltrowanego pod ciśnieniem 0,3—0,4 atn oraz wskaźnik chlorek 2,3,5-trójfenylo-

tetrazoliowy zwany TTC, dodawany przed nasyceniem bibuły w stosunku takim, by stężenie jego w gotowej pożywce wynosiło 1 do 450. Wartość pH takiej pożywki zawarta jest w granicach 6,6 do 6,7. Nasyconą bibułę z odpowiednią perforacją podaje się suszeniu w suszarce o wymuszonym obiegu powietrza w temperaturze poniżej 40 °C. Wysuszoną bibułę tnie się na paski przedzielone perforacją na dwie nierówne części, z których część większa korzystnie powinna mieć powierzchnię 15 cm² co warunkuje wchłonięcie 0,5 ± 0,04 ml płynu. Poszczególne paseczki wkłada się do woreczków z folii polietylenowej o wymiarach 5 × 15 cm i grubości ścianki 0,1 do 0,09 mm a następnie łączy brzegi zgrzewarką do polietylenu.

Użycie coliwskażów polega na wyciągnięciu paseczka z torebki po jej otworzeniu od strony gdzie znajduje się krótsza część paska przedzielonego perforacją, przez uchwycenie go za tę część palcami, zanurzenie w badanym płynie, otrząśnięcie zwisających kropel lub przy cieczach o dużej lepkości usunięcie nadmiaru płynu specjalnymi uprzednio wyżarzonymi widelkami i wkłada z powrotem do woreczka, przyprasowuje dłonią do jego boków, zamyka nad płomieniem i wstawia do ciepłarki o temperaturze 37 °C na 8 godzin.

Na rysunku pokazano wygląd coliwskazów po wyjęciu z suszarki. Ilość wyraźnie widocznych punkcików w rzeczywistości czerwonych pozwala określić miano. Brak punkcików — coli nieobecne w 1 ml; 1 do 16 punkcików — miano coli 0,1; 17 do 105 punkcików — miano coli 0,01; 106 do 306 punkcików — miano coli 0,001; powyżej 306 punkcików — miano coli poniżej 0,001.

Prostota metody pozwala na wykonanie analizy i interpretację wyników przez pracowników niewykwalifikowanych w zakresie mikrobiologicznym. Zastosowanie coliwskazów pozwala na szerokie stosowanie kontroli bakteriologicznej w przemyśle mleczarskim. Kontrola jest tu 6-krotnie szybsza w stosunku do stosowanej metody Kessler-Swenartona, a do wykonania analizy za pomocą coliwskazów nie potrzeba oprócz ciepłarki innych urządzeń czy odczynników. Przykład. Dla przygotowania pożywki potrzebnej do nasycania użyto:

- 1000 ml wody destylowanej, sterylizowanej,
- 30 g bulionu suchego,
- 6 g laktozy rafinady,
- 2 g agar-agaru,
- 2,3 g wskaźnika TTC.

Z przygotowanych 1000 ml wody odmierzono 100 ml, w których rozpuszczono przez dodanie i wytrząsanie

2,3 g wskaźnika TTC. W pozostałej ilości wody, to jest 900 ml rozpuszczono suchy bulion, laktozę i agar-agar a następnie wyjałowiono przez autoklawowanie przy 1 atn przez 10 minut. Roztwór wskaźnika zmieszano z pozostałym podłożem przed przystąpieniem do nasycania odpowiednich arkuszy bibuły z zachowaniem warunków aseptycznych.

Zastrzeżenia patentowe

Sposób przygotowania wskaźników do szybkiego oznaczania miana coli w cieczach, zwłaszcza w mleku, **znamienny tym**, że wyjałowioną bibułę, najkorzystniej firmy Whatman nasycy się w warunkach aseptycznych w temperaturze 60—70 °C podłożem płynnym zawierającym w swoim składzie suchy bulion, laktozę rafinadę, agar-agar o krzepliwości w temperaturze 35 °C oczyszczony uprzednio przez rozpuszczenie go w temperaturze 70—80 °C i przefiltrowany pod ciśnieniem 0,3 do 0,4 atn oraz chlorek 2, 3, 5 — trójfenylotetrazoliowy jako wskaźnik, po czym nasyconą bibułę suszy się w suszarce o wymuszonym obiegu powietrza w temperaturze 40 °C i tnie na paski przedzielone perforacją na dwie nierówne części, a następnie zamyka się w woreczkach z folii polietylenowej.

