

CHROMOGENIC COLIFORM ACC. ISO 9308-1:2014

INSTRUKCJA UŻYCIA

Produkt do użytku profesjonalnego.

Przeznaczenie: *Chromogenic Coliform acc. ISO 9308-1:2014* jest podłożem selektywnym i różnicującym przeznaczonym do określania ilości *Escherichia coli* i innych bakterii z grupy coli w próbkach wody metodą filtracji membranowej zgodnie z ISO 9308-1:2014.

| Nr kat.: | Rodzaj podłoża: | Opakowanie: |
|----------|-------------------|-------------------|
| 149 | podłoże sypkie | 500 g |
| 3174 | podłoże w butelce | 100, 200, 500 ml |
| 1423 | podłoże na płytce | 1x10 szt. (90 mm) |

1. Właściwości: Tergitol 7 obecny w podłożu hamuje wzrost bakterii Gram dodatnich. Dodatek substancji chromogennych różnicuje bakterie z grupy coli od *E.coli*: 6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside (Salomon-GAL) poprzez wykrywanie β-galaktozydazy oraz X-β-G-glucuronide poprzez wykrywanie β-glukuronidazy. 6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside jest hydrolizowany przez bakterie z grupy coli, które uzyskują kolor różowo-czerwony. Reakcja ta jest wzmocniona w podłożu poprzez obecność w składzie IPTG (izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd). X-β-G-glucuronide jest hydrolizowany wśród *Enterobacteriaceae*, przez *E.coli* i kilka szczepów *Salmonella* i *Shigella*, które to wytwarzają niebieski pigment.

2. Skład w g/l wody destylowanej:

| | |
|---|--------|
| Enzymatyczny hydrolizat kazeinowy | 1,0 g |
| Ekstrakt drożdżowy | 2,0 g |
| Chlorek sodu | 5,0 g |
| Wodorofosforan disodu | 2,7 g |
| Diwodorofosforan sodu x 2H ₂ O | 2,2 g |
| Pirogronian sodu | 1,0 g |
| Sorbitol | 1,0 g |
| Tryptofan | 1,0 g |
| Tergitol 7 | 0,15 g |
| 6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside | 0,2 g |
| X-β-G-glucuronide (CHX salt) | 0,1 g |
| Izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd (IPTG) | 0,1 g |
| Agar | 10,6 g |

3. pH: 6,8 ± 0,2 w temperaturze 25°C.

4. Przygotowanie podłoża:

Podłoże sypkie:

Rozpuścić 27,1 g suchego podłoża w 1000 ml wody destylowanej. Podgrzewać często mieszając, do całkowitego rozpuszczenia. Doprowadzić do wrzenia. Nie autoklawować, nie przegrzewać. Nieznaczne zmętnienie może pojawić się po zgotowaniu pożywki, jest to normalne zjawisko nie wpływające na jakość podłoża. Zmętnienie zniknie po obniżeniu temp. do 45-50°C. Po wystudzeniu podłoża rozlać aseptycznie na płytki Petriego*.

Butelki z agarem:

Podłoże w butelkach powinno być rozpuszczone w łaźni wodnej w temp 80°C lub mikrofalówce.

Rozpuszczanie agaru w mikrofalówce

1. Poluzować nakrętkę na butelce przed umieszczeniem jej w mikrofalówce.
2. Umieścić butelkę z agarem w centralnym miejscu mikrofalówki.
3. Podgrzewać agar w odstępach jednonminutowych na małej mocy do momentu całkowitego rozpuszczenia.
4. Między przerwami, delikatnie obracać butelkę, aby upewnić się, że agar upłynnia się równomiernie.

5. W międy czasie nałożyć rękawice ochronne, ostrożnie wyjąć gorącą butelkę i pozostawić przed rozlaniem do ostygnięcia do temp. 45- 50 °C.
6. Po schłodzeniu podłoża rozlać na płytki.*

Rozpuszczanie agaru w łaźni wodnej

1. Poluzować nakrętkę na butelce przed umieszczeniem jej w łaźni wodnej.
2. Temperatura wody powinna pozostać na poziomie około 80°C.
3. Pozostawić w łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia.
4. Między przerwami, delikatnie obracać butelkę, aby upewnić się, że agar upłynnia się równomiernie.
5. W międy czasie nałożyć rękawice ochronne, ostrożnie wyjąć gorącą butelkę i pozostawić przed rozlaniem do ostygnięcia do temp. 45- 50 °C.
6. Po schłodzeniu podłoża rozlać na płytki.*

**Pracować w czystym, wolnym od zanieczyszczeń obszarze. Stosować środki dezynfekcyjne. Pracować zgodnie z zasadami aseptyki. W tym samym czasie rozlewać tylko jedną płytkę. Uchylić delikatnie wieczko i wlać 15-20 ml płynnego podłoża na denko płytki. (podłoże powinno zakryć 2/3 powierzchni płytki). Delikatnie obracać płytkę do momentu, aż podłoże pokryje całą jej powierzchnię. Zakryć płytkę wieczkiem. Grubość warstwy powinna mieć 3-4mm głębokości. Przed użyciem płytkę należy ostudzić i poczekać do całkowitego zestalenia agaru. Trwa to około 1 godziny. Można przyspieszyć proces poprzez umieszczenie płytki w lodówce, ale nie w zamrażarce. W celu uniknięcia nagromadzenia się wody kondensacyjnej na wieczku, przed wykonaniem posiewu należy płytkę z agarem umieścić w komorze laminarnej lub cieplarni (temp. 37°C) uchylając delikatnie wieczko na około 20 minut.*

5. Wygląd:

Wygląd podłoża sypkiego: homogenne, jasnobezowe do beżowego.

Wygląd podłoża po rozpuszczeniu : przygotowane podłoże jest klarowne i jasnosłomkowe.

6. Materiał do badań: próbki wody.

7. Sposób wykonania: jeżeli podłoże było przechowywane w warunkach chłodniczych, należy je doprowadzić przed użyciem do temp. pokojowej. Przefiltrować 100 ml badanej próbki wody (lub inna objętość np. 250 ml wody butelkowanej). Użyć filtr o średnicy 47-50 mm i średnicy porów 0,45µm, zaleca się stosowanie filtrów z siatką. Aby zapewnić równomierne rozprowadzenie roztworu minimalna objętość próbki użytej do filtracji powinna wynosić 10 ml lub jej rozcieńczenie. Po przefiltrowaniu filtr umieścić na podłożu Chromogenic Coliform acc. ISO 9308-1:2014. Zwrócić uwagę, aby cała powierzchnia filtra przylegała do podłoża, i aby między podłożem, a filtrem nie tworzyły się pęcherzyki powietrza odwrócić płytkę agarem do góry i inkubować w temperaturze 36 ± 2 ° C przez 21-24 godziny. Sprawdzić filtry membranowe i policzyć kolonie.

8. Odczyt i interpretacja wyników: po okresie inkubacji obserwować wzrost bakterii. Kryterium różnicującym bakterie rosnące na tym podłożu jest fermentacja laktozy. Palczki laktozo-dodatnie rosną w postaci kolonii różowych lub czerwonych, palczki laktozo-ujemne tworzą kolonie bezbarwne. Identyfikację drobnoustroju należy potwierdzić testami biochemicznymi.

- Wszystkie różowe do czerwonych kolonii (pozytywna reakcja dla β -D-galaktozydazy) uznać jako domniemane bakterie z grupy coli, nie *E.coli*.
- Wszystkie ciemnoniebieskie do fioletowych (pozytywna reakcja dla β -D-galaktozydazy i β -D-glukoronidazy) uznać jako *E.coli*.

Aby uniknąć wyników fałszywie dodatnich wyników, spowodowanych przez oksydazo-dodatne bakterie, na przykład *Aeromonas* spp. domniemane kolonie powinno potwierdzać się przez negatywną reakcję oksydazy. (Paski na osydazę nr kat. MID61G). Wykonać test oksydazy preferencyjnie na wszystkich lub przynajmniej 10 wybranych różowych do czerwonych kolonii bakterii z grupy coli, (inne niż *E. coli*), wynik badania powinien być ujemny. Liczba wszystkich bakterii z grupy coli jest sumą wszystkich oksydazo-ujemnych różowych do czerwonych kolonii, a także wszystkich ciemnoniebieskich do fioletowych kolonii.

9. Kontrola jakości: podłoże należy kontrolować z użyciem szczepów wzorcowych dających dodatnią i ujemną reakcję. Badanie należy wykonać na reprezentatywnej próbce używając czystą hodowlę mikroorganizmów dających pożądane reakcje. Postępować zgodnie z wymogami ISO 11133:2014.

| Mikroorganizm: | Metoda badania: | żywność/selektywność/ specyficzność: | Wygląd kolonii: |
|--|----------------------------------|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 | żywność: metoda ilościowa | >0,7 | kolonie ciemnoniebieskie do fioletowych |
| <i>E.aerogenes</i> WDCM 00175 | żywność: metoda ilościowa | >0,7 | kolonie różowe do czerwonych |
| <i>E.faecalis</i> WDCM 00009 | selektywność: metoda jakościowa | zahamowanie wzrostu | – |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00024 | specyficzność: metoda jakościowa | dobry wzrost | kolonie bezbarwne |

10. Uwagi: produkt przeznaczony wyłącznie do użytku laboratoryjnego.

11. Postępowanie ze użytymi podłożami: hodowle należy zniszczyć przez sterylizację w autoklawie lub postępować zgodnie z obowiązującymi procedurami w zależności od typu laboratorium. Płytki muszą być zutylizowane poprzez autoklawowanie w temp. 121°C przez 20 minut.

12. Przechowywanie: podłoża suche należy przechowywać w temp. 2-8°C w chłodnym, suchym miejscu w szczelnie zamkniętym opakowaniu. Podłoże w butelkach przechowywać w temp. 6–25°C. Chronić przed dostępem światła. Gotowe płytki z podłożem należy przechowywać w temp. 2–12°C do upływu terminu ważności z dala od bezpośredniego źródła światła w pozycji odwróconej. Aby uniknąć zamrożenia agaru nie należy trzymać płytek blisko ścian lodówki. Aby uniknąć pojawienia się większej ilości wody na wieczku płytki nie należy otwierać zbyt często lodówki. Nie przechowywać podłoży w przepelnionej lodówce. Przed wykonaniem posiewu doprowadzić płytki do temp. pokojowej. Podłoża zawierające barwniki powinny być chronione przed bezpośrednim źródłem światła. Gotowe płytki z podłożem przechowywać w oryginalnym opakowaniu, do czasu upływu daty ważności. Zachować zalecany czas inkubacji podany przez producenta. Nie należy używać płytek, jeżeli wykazują oznaki zanieczyszczenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wysuszenia, pęknięcia lub innej oznaki uszkodzenia.

13. Termin ważności: podłoże sypkie: 3 lata,
butelki: 1 rok,
płytki: 3 miesiące.

14. Dodatkowe suplementy niedostarczone do podłoża bazowego: nie wymagane.

15. Piśmiennictwo: Dostępne na życzenie klienta.



Graso Zenon Sobiecki
Kraś 4A; 83-200 Starogard Gdański
www.grasobiotech.pl
tel. + 48 (58) 562 30 21



Oddział produkcyjny
Leśna 1, Owidz
83-211 Jabłowo