



Ćwiczenie 9 i 10

Temat: Metody ilościowe w mikrobiologicznych badaniach potraw. Pobieranie prób do badań. Oznaczanie liczby i obecności drobnoustrojów występujących w potrawach o różnym stopniu przetworzenia

Według obowiązujących przepisów w żywności oznacza się grupy drobnoustrojów określone jako wskaźniki higieny procesu oraz wskaźniki bezpieczeństwa produktu.

Producenci żywności mając na uwadze zapewnienie właściwej jakości produktów oraz ich trwałość mimo braku wymagań prawnych poszerzają zakres analiz o oznaczanie grup drobnoustrojów mogących ze względu na swój metabolizm powodować wady produktów lub znacznie skracać jego termin przydatności do spożycia.

Przed podjęciem decyzji o zakresie wykonywanych analiz mikrobiologicznych żywności trzeba dobrze poznać specyfikę produktu (rodzaj i jakość surowców używanych do jego produkcji, proces technologiczny, sposoby przechowywania).

W produktach fermentowanych nie oznacza się liczby mezofilnych bakterii tlenowych, ponieważ na agarze odżywczym może wyrosnąć obok drobnoustrojów zanieczyszczających produkt część mikroflory technologicznej (mikroflora szczepionek lub zakwasów). Natomiast bardzo często oznacza się w tej żywności liczbę drobnoustrojów dodanych jako szczepionki, np. w jogurcie oznacza się liczbę *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. W ostatnim dniu trwałości jogurtu, liczba tych bakterii nie powinna być mniejsza niż 107 kom/cm³.

Z kolei w produktach przechowywanych chłodniczo znacznie więcej informacji dostarcza poziom zanieczyszczenia drobnoustrojami psychrotrofowymi niż liczba mezofilnych bakterii tlenowych, np. przy przechowywaniu mięsa drobiowego w temperaturze 2°C bakterie psychrotrofowe i psychrofilne stopniowo opanowują to środowisko i mogą stanowić nawet 96% ogólnej liczby drobnoustrojów.

W produktach o znacznie obniżonej aktywności wody, np. w przyprawach najczęściej główną mikroflorę stanowią przetrwalniki *Bacillus* sp. i *Clostridium* sp. oraz zarodniki grzybów.

MIEŚO ZWIERZĄT RZEŹNYCH

Przy prawidłowym uboju, prowadzonym w dobrych warunkach higienicznych głębokie partie mięśni są jałowe lub wykazują obecność nielicznych ziarniaków z rodzaju *Micrococcus*. Na powierzchni tusz mikroflora jest liczniejsza, a stanowią ją bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Przy bardzo dobrej higienie uboju i obróbki tusz liczebność bakterii waha się w granicach 100-900 kom/g lub cm².

Psucie mięsa powodują najczęściej tlenowe pałeczki Gram-ujemne, zwykle psychrotrofowe – przy zanieczyszczeniu rzędu 10⁶ kom/g lub cm² występują już wyczuwalne zmiany zapachowe.

Mięso jako surowiec nie podlega ocenie mikrobiologicznej. W przypadkach, gdy jakość surowca budzi wątpliwości, można przeprowadzić ocenę jego świeżości na podstawie obrazu mikroskopowego powierzchni.



1. Wykonanie badań mikroskopowych

Czyste szkiełko przedmiotowe przyłożyć do powierzchni badanego mięsa i lekko przycisnąć. Uzyskany preparat odciskowy wysuszyć, utrwalić (w razie potrzeby odtłuścić w chloroformie) i zabarwić metodą Grama. Przeprowadzić obserwacje mikroskopowe (pod immersją) w co najmniej 20 polach widzenia.

Ocena świeżości mięsa na podstawie obrazu mikroskopowego powierzchni

brak bakterii lub obecne pojedyncze ziarniaki Gram-dodatnie	mięso świeże (pH 5,8-6,5)
w polu widzenia 20-30 ziarniaków, nieliczne pałeczki Gram-ujemne	mięso o podejrzanym świeżości (pH 6,6)
w polu widzenia liczne bakterie z przewagą pałeczek Gram-ujemnych	mięso nieświeże (pH $\geq$ 6,7)

SUROWCE ROŚLINNE

Liczebność i rodzaje mikroorganizmów występujących na surowcach roślinnych zależą m. in. od ich składu, sposobności zanieczyszczenia glebą, otaczającego środowiska biologicznego (chwasty, owady, ptaki, gryzonie), warunków atmosferycznych podczas zbioru, sposobu zbioru. Na mikroflorę surowców roślinnych składają się mikroorganizmy epifityczne, egzystujące na ich powierzchni w okresie wzrostu roślin oraz mikroorganizmy pochodzące z zanieczyszczeń wtórnych.

Mikroflora warzyw zależna jest od ich rodzaju. Na warzywach zielonych (sałata, kapusta, szpinak) występują głównie bakterie fermentacji mlekowej oraz drożdże i pleśnie. Warzywa korzeniowe i bulwiaste są znacznie bardziej zanieczyszczone niż inne. Ogólna liczba drobnoustrojów zanieczyszczających ziemniaki oraz buraki cukrowe wynosi ok. 10^5 - 10^8 kom/g. Dominują bakterie z rodzajów *Clostridium* i *Bacillus* oraz *Micrococcus* i *Flavobacterium*. Przy intensywnym nawożeniu naturalnym mikroflorę zanieczyszczającą również bakterie pochodzenia jelitowego oraz chorobotwórcze: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* oraz patogenne szczepy *Escherichia coli*. Na warzywach bakterie występują w ilościach 10^4 - 10^7 kom/g. Częstą mikroflorą warzyw są także bakterie przetrwalnikujące, a także bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*, a także grzyby w populacjach rzędu 10^2 - 10^6 /g. Zepsucia surowców roślinnych podczas składowania powodują zwykle grzyby strzępkowe (pleśnie).



Mikroflora owoców znajduje się zazwyczaj na ich powierzchni, gdzie przenoszona jest przez powietrze, a także przez bezpośredni kontakt z glebą w czasie zbiorów. Dominującą mikroflorą owoców są grzyby, wśród których przeważają drożdże z rodzajów *Saccharomyces*, *Candida* i *Pichia* oraz pleśnie *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Występują także bakterie z rodzajów *Micrococcus*, *Bacillus* oraz pałeczki z grupy coli.

W czasie przechowywania owoców rozwój przeważającej części mikroflory bakteryjnej jest naturalnie ograniczana przez niskie pH. Istnieje niebezpieczeństwo namnożenia się drobnoustrojów acydofilnych, m.in. *Alicyclobacillus*, występujących w surowcu i mogących stanowić zagrożenie dla pasteryzowanych przetworów owocowych.

Coraz większym zainteresowaniem konsumentów cieszą się wyroby takie jak: skielkowane nasiona, myte i rozdrobnione warzywa do sałatek oraz niektóre warzywa drobno liściowe. Produkty te cechują się zwykle krótkim okresem przydatności do spożycia. Ze względu na bardzo ograniczoną obróbkę jakiej są poddawane, zachodzą w nich w dalszym ciągu procesy, w tym mikrobiologiczne, prowadzące na ogół po kilku dniach składowania do dyskwalifikacji wyrobów ze względu na zmiany sensoryczne. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym nasileniu niekorzystnych przemian biochemicznych jest rozdrobnienie. Powoduje ono zniszczenie naturalnej bariery, jaką jest skórka i umożliwia szybszy rozwój mikroorganizmów, jak również ułatwia kontakt uwolnionych enzymów z substratami.

RYBY I PRZETWORY RYBNE

Mikroflora ryb i produktów rybnych zależy od wielu czynników: zanieczyszczenia bakteryjnego surowca, rodzaju połowu, stanu higienicznego i jakości sprzętu używanego do połowu. Do wtórnych zanieczyszczeń dochodzi często podczas sprawiania ryb, transportu, kontaktu z materiałem do pakowania. Ryby mogą być źródłem zróżnicowanej mikroflory saprofitycznej i chorobotwórczej. Najczęściej izolowana jest mikroflora psychrofilna z gatunków: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*. Do tkanek ryb mnogą przenikać i inicjować procesy rozkładu mezofilne bakterie gnilne np. *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus* sp. pochodzące ze środowiska, w którym umieszczono ryby po złowieniu. W tkankach ryb mogą także być obecne drobnoustroje chorobotwórcze: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*. Zagrożeniem zdrowia konsumenta może być także nadmierna koncentracja histaminy w mięśniach ryb np. makreli lub łososiowatych. Histamina powstaje na skutek dekarboksylacji L-histydyny przeprowadzanej przez pałeczki *Proteus* sp., *Hafnia* sp., *Ps. fluorescens*, *Micrococcus* sp. Histamina jest ciepłooporna i jej ogrzewanie podczas przygotowywania posiłków do konsumpcji nie powoduje jej inaktywacji.

Ryby bezpośrednio po połowie należy zabezpieczyć przed zepsuciem. W tym celu stosowane są różne metody biologiczne, chemiczne lub fizyczne. Zabezpieczenie metodami chemicznymi polega na stosowaniu soli kuchennej lub konserwantów. W metodzie biologicznej ryby utrzymuje się przy życiu transportując je w wodzie. Fizyczne metody polegają na obniżeniu temperatury ryb poprzez schłodzenie, lodowanie lub zamrożenie. Lód powinien być produkowany wyłącznie z wody zdanej do picia, ze względu na bezpośredni kontakt z surowcem. Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy stopniem obniżania



temperatury tkanki mięśniowej a jej trwałością (tab. 1). Trwałość ryb ulega przedłużeniu także przy pakowaniu ich w folie gazoszczelne o zmodyfikowanej atmosferze (MAP).

Tab. 1 Wpływ czasu chłodzenia ryb w wodzie na liczbę komórek bakterii.

Temperatura wody [°C]	Czas przetrzymywania ryb [godz.]	Liczba bakterii [kom./g]
0	0	3 800 000
3	3	5 400 000
5	6	9 000 000
6	15	25 000 000

Przetwory z ryb to produkty wytworzone z ryb, wzbogacone w różne dodatki, które powinny zawierać co najmniej 50% mięsa ryb. W wyniku procesu przetwórczego uzyskują właściwości sensoryczne umożliwiające ich bezpośrednie spożywanie. Do przetworów rybnych zaliczmy m.in.: ryby wędzone, marynaty rybne, rybne przetwory garmażeryjne.

Wyróżnia się dwa asortymenty ryb wędzonych – wędzone na gorąco i wędzone na zimno. Do wędzenia na gorąco używane są świeże albo mrożone ryby, solone. Wędzenie odbywa się w wysokiej temperaturze: 82,2°C/ 30min. Ryby wędzone na zimno poddawane są działaniu dymu o temperaturze 28-30°C. Bakterie powodujące psucie się ryb wędzonych to przede wszystkim *Micrococcus* sp. i *Pseudomonas* sp., nierzadko również pleśnie (obecne w drewnie używanym do wytworzenia dymu). Bakteriami chorobotwórczymi stwierdzonymi w rybach wędzonych są pałeczki *Salmonella* sp. i laseczki jadu kiełbasianego *Clostridium botulinum*.

Marynaty rybne otrzymuje się w wyniku poddaniu mięśni ryb działaniu kwasu octowego. Najpierw przez kilka dni mięśnie ryb dojrzewają w kąpieli roztworu soli i kwasu octowego. Po uzyskaniu właściwych cech dodaje się do nich przyprawy i warzywa, a następnie uzupełnia zalewą z soli kuchennej, kwasu octowego, cukru i wody. Powodem psucia się marynat jest najczęściej namnożenie się heterofermentatywnych bakterii fermentacji mlekowej z gatunków: *L. brevis*, *L. buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides*. W środowisku marynat ze względu na niskie pH (zwykle poniżej 5,0) nie ma warunków do rozwoju pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Rybne przetwory garmażeryjne to potrawy w postaci półproduktów lub produktów gotowych, z których można szybko przyrządzić posiłki. Jakość tych produktów zależy od jakości ryb, ich rozdrobnienia oraz higieny uzyskiwania. Powodem psucia się produktów garmażeryjnych jest ich przechowywanie w zbyt wysokich temperaturach umożliwiających namnożenie się bakterii pochodzących z zakażeń wtórnych, najczęściej pałeczki *Proteus* sp. oraz laseczki *Bacillus subtilis*.



ANALIZY MIKROBIOLOGICZNE

Pobieranie prób do badań

Próbka pobrana do badań mikrobiologicznych powinna być „reprezentatywna” tzn. powinna odzwierciedlać stan całego badanego produktu. Najczęściej do badań ilościowych pobiera się 10g lub 10cm³ produktu. Produkty płynne należy przed pobraniem próbki dokładnie wymieszać. Z produktów stałych i sypkich jałowym skalpelem, łyżeczką lub świdrem pobiera się 10g produktu, przenosi do jałowego woreczka, dodaje się do 90cm³ płynu do rozcieńczeń i homogenizuje (np. w stomacherze) w celu ujednolicenia próby.

Żywność o spodziewanej dużej liczbie drobnoustrojów (w jednym mililitrze/gramie mogą się znajdować miliony (10⁶) lub nawet miliardy (10⁹) komórek) należy przed posiewem rozcieńczyć - zwykle stosuje się szeregi 10-krotnych rozcieńczeń w postępie geometrycznym.

Przygotowanie 10-krotnych rozcieńczeń badanego materiału

Po wymieszaniu próbki badanego materiału płynnego pobiera się jałową pipetą 10 cm³, przenosi do kolby zawierającej 90 cm³ płynu rozcieńczającego (nie zanurzając pipety w płynie), dokładnie miesza. W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1:10, oznaczane jako 1. Z produktów stałych i sypkich rozcieńczenie 1:10 otrzymuje się na etapie ujednolicania próby. (patrz pobieranie prób do badań)

Następnie z pierwszego (1:10) rozcieńczenia (dokładnie wymieszanego) przenosi się 1 cm³ do probówki zawierającej 9 cm³ płynu rozcieńczającego (nie zanurzając pipety w płynie). W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 1:100, czyli 2.

Po dokładnym wymieszaniu i przeniesieniu nową pipetą szklaną (lub końcówką pipety automatycznej) 1 cm³ rozcieńczenia 2 do 9 cm³ płynu rozcieńczającego otrzymuje się rozcieńczenie 1:1000, czyli 3.

W analogiczny sposób wykonuje się kolejne rozcieńczenia w zależności od spodziewanego zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanej próby. Najczęściej stosowane w analizie mikrobiologicznej rozcieńczalniki to :

- płyn fizjologiczny – (0,85% roztwór wodny NaCl)
- płyn Ringera – (mieszanina: wody, chlorków: sodu, potasu, wapnia i dwuwęglanu sodu)
- płyn fizjologiczny z peptonem – (płyn fizjologiczny z dodatkiem 0,1% peptonu kazeinowego)
- płyn fizjologiczny z cytrynianem
- płyn fizjologiczny z buforem fosforanowym

Metody oznaczeń ilościowych

W badaniach mikrobiologicznych żywności przeprowadza się oznaczenie liczby m. in.

- ✓ ogólnej liczby drobnoustrojów
- ✓ grzybów
- ✓ mikroorganizmów psychrotrofowych
- ✓ bakterii kwaszących
- ✓ bakterii proteolitycznych
- ✓ pałeczek z grupy coli lub całej rodziny *Enterobacteriaceae*



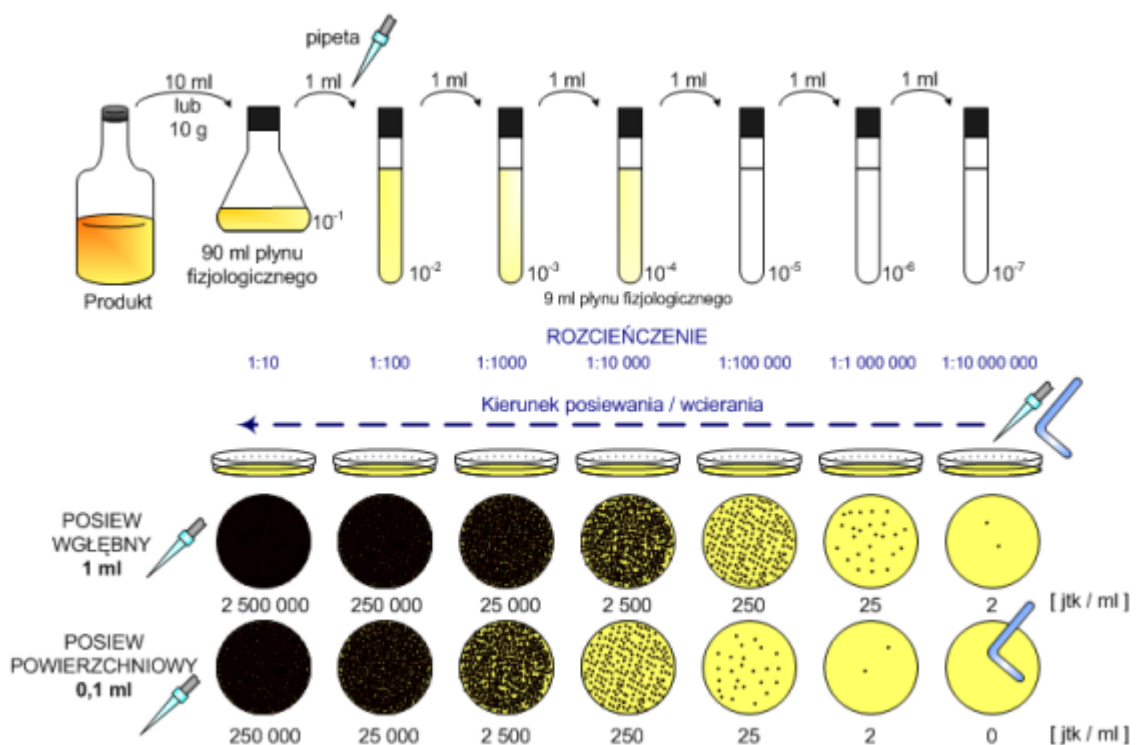
✓ paciorkowców kałowych z rodzaju *Enterococcus*

Do oznaczania liczby drobnoustrojów metodą hodowlaną stosuje się głównie dwie metody posiewu do płytek Petriego: posiew wgłębny i posiew powierzchniowy.

Oznaczenie liczby drobnoustrojów metodą płytkową

Metoda oznaczania liczby drobnoustrojów przez posiew na podłoże stałe zakłada, że liczba powstających kolonii odpowiada liczbie żywych komórek w badanej próbce. Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie - jtk (ang. cfu - colony forming units) w 1g lub 1cm³ produktu.

Schemat wykonywania rozcieńczeń i posiewów metodą wgłebną i powierzchniową



a. Posiewy wgłębne

Posiew do płytki Petriego po 1 cm³ wybranych kolejnych rozcieńczeń w dwóch powtórzeniach; *podłoża*: agar odżywczy przy oznaczaniu liczby mezofilnych bakterii tlenowych (ogólnej liczby drobnoustrojów) lub podłoże wybiórcze, wybiórczo-różnicujące lub różnicujące przy oznaczaniu liczby wybranych grup drobnoustrojów.

Warunki inkubacji: przy oznaczaniu ogólnej liczby drobnoustrojów - 30°C przez 72 godz., lub optymalne temperatury przy oznaczaniu wybranych grup drobnoustrojów.



Zasada odczytania wyników:

Do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 30 do 300 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm³ lub w 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C}{(N1 + 0,1N2)} \cdot d, \text{ gdzie:}$$

C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia

N1 - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia

N2 - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia

d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu

przykład:

rozcieńczenie	2	3	4
liczba wyrosłych kolonii na pierwszej płytce	300	150	15
liczba wyrosłych kolonii na drugiej płytce	300	156	16

$$L = \frac{337}{2+0,1 \cdot 2} \cdot 1000 = 154181$$

Z uwagi na to, że liczbę drobnoustrojów wyraża się liczbą z jednym miejscem po przecinku należy dokonać zaokrąglenia zgodnie z regułami matematyki:

$$L=1,5 \times 10^5 \text{ jtk/cm}^3 \text{ lub g}$$

Do odczytu wyników można wybrać jedno rozcieńczenie, policzyć kolonie na płytkach z równoległych powtórzeń, wyliczyć średnią liczbę kolonii w rozcieńczeniu i przeliczyć na 1 cm³ lub 1 g próby, mnożąc przez odwrotność rozcieńczenia. Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w 1 cm³ lub 1 g produktu

b. Posiewy powierzchniowe

Posiewy wykonuje się nanosząc badany materiał na powierzchnię zestalonego podłoża.

UWAGA: Przed posiewem, płytki z pożywką podsuszamy w celu usunięcia kondensatu wody z powierzchni pożywki. Płytki należy podsuszać w temp. 40°C przez 30-60 min. W tym celu umieszcza się płytki w termostacie, otwiera i układa tak, aby denko było oparte na wieczku płytki; zarówno wieczko jak i denko są odwrócone.

Posiew do płytki Petriego z zestalonym podłożem po 0,1 cm³ wybranych kolejnych rozcieńczeń próby w dwóch powtórzeniach.

Posiany materiał rozprowadza się jałową, zgiętą bagietką na powierzchni całego podłoża, aż do wsiąknięcia.

Podłoża i warunki inkubacji: jak w metodzie wgłębnej



Zasada odczytania wyników: do odczytu wybiera się płytki z 2 kolejnych rozcieńczeń, na których wyrosło od 15 do 150 kolonii. Liczbę drobnoustrojów (L) w 1 cm³ lub w 1 g próbki oblicza się wg wzoru:

$$L = \frac{C}{(N1 + 0,1N2)} \cdot d \cdot a, \text{ gdzie:}$$

C - suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia

N1 - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia

N2 - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia

d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu

a - współczynnik posianej ilości materiału, przy posiewie 0,1cm³ a = 10

Do odczytu wyników można wybrać jedno rozcieńczenie, policzyć kolonie na płytkach z równoległych powtórzeń, wyliczyć średnią liczbę kolonii w rozcieńczeniu i przeliczyć na 1 cm³ lub 1 g próby, uwzględniając liczone rozcieńczenie i posiewaną objętość. Wynik podaje się w jednostkach tworzących kolonie (jtk) w 1 cm³ lub 1 g produktu

Wykrywanie obecności drobnoustrojów

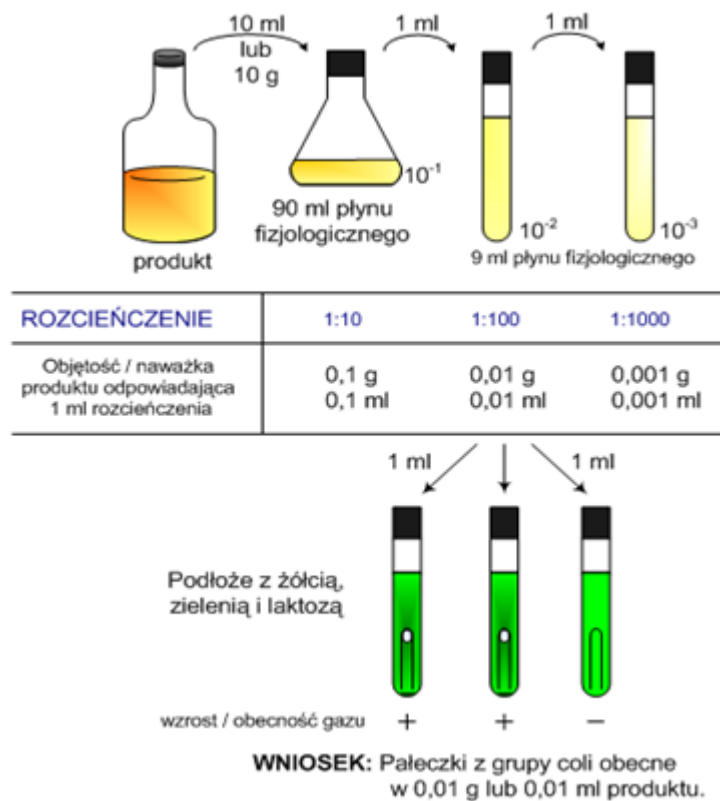
W mikrobiologicznej analizie żywności w określonych przypadkach nie oznaczamy liczby mikroorganizmów tylko stwierdzamy ich obecność w określonej ilości materiału, np. w 1; 0,1 g/cm³ itd. Najczęściej wykrywa się obecność:

- pałeczek grupy coli
- *E. coli*
- *Enterococcus* sp.
- beztlenowców przetrwalnikujących
- bakterii chorobotwórczych

Oznaczenie wykonuje się poprzez posiew 1cm³ próby lub/i jej rozcieńczenia do odpowiedniej pożywki wybiórczej w trzech powtórzeniach. W żywności wykrywa się również obecność drobnoustrojów chorobotwórczych, najczęściej jednak w ilości 10; 25 g lub cm³. Oznaczenia te są wieloetapowe i obejmują etapy namnażania wstępnego lub przednamnażania, namnażania wybiórczego, różnicowania i potwierdzania.



Schemat wykonywania posiewów celem oznaczenia obecności drobnoustrojów na przykładzie pałeczek grupy coli





Część praktyczna – ćwiczenie 9

1. **Badanie mikroskopowe mięsa** zgodnie z instrukcją podaną przez prowadzącego.
2. **Mikrobiologiczna analiza jakości surowców i produktów pochodzenia roślinnego:**

- Mix sałat (sałata świeża)
- Sałatka lub surówka warzywna z dodatkiem sosu

Produkty do badań zostały odważone w ilości 10g do jałowego worka. Należy wykonać rozcieńczenie 1:10 (w tym celu przelać do worka 90cm³ jałowego płynu fizjologicznego) i ujednolicić próbkę w stomacherze. Część płynną przelać przez filtr w worku do kolby po płynie fizjologicznym. Następnie wykonać rozcieńczenie 1:100. Oznaczenia:

- Ogólna liczba drobnoustrojów – posiew wgłębny po 1 cm³ do jałowej płytki Petriego z rozcieńczenia 1:10 i 1:100 bez powtórzeń, posiewy zalać upłynnionym podłożem agar odżywczy, inkubować w temperaturze 30°C/72godz.
- Liczba grzybów posiew wgłębny po 1 cm³ do jałowej płytki Petriego z rozcieńczenia 1:10 i 1:100 bez powtórzeń, posiewy zalać upłynnionym podłożem YGC, inkubować w temperaturze 25°C/96godz.
- Obecność pałeczek grupy coli – posiew po 1cm³ rozcieńczenia 1:10 lub 1:100 do 3 probówek z podłożem z żółcią, zielenią brylantową i rurką Dürhama. Inkubacja w temperaturze 37°C/37godz.

3. **Mikrobiologiczna analiza jakości surowców i produktów pochodzenia zwierzęcego:**

- Ryba surowa
- Ryba po grecku

Produkty do badań zostały odważone w ilości 10g do jałowego worka. Należy wykonać rozcieńczenie 1:10 (w tym celu przelać do worka 90cm³ jałowego płynu fizjologicznego) i ujednolicić próbkę w stomacherze. Część płynną przelać przez filtr w worku do kolby po płynie fizjologicznym. Następnie wykonać rozcieńczenie 1:100. Oznaczenia:

- Ogólna liczba drobnoustrojów – posiew wgłębny po 1 cm³ do jałowej płytki Petriego z rozcieńczenia 1:10 i 1:100 bez powtórzeń, posiewy zalać upłynnionym podłożem agar odżywczy, inkubować w temperaturze 30°C/72godz.
- Liczba grzybów posiew wgłębny po 1 cm³ do jałowej płytki Petriego z rozcieńczenia 1:10 i 1:100 bez powtórzeń, posiewy zalać upłynnionym podłożem YGC, inkubować w temperaturze 25°C/96godz.
- Obecność pałeczek grupy coli – posiew po 1cm³ rozcieńczenia 1:10 lub 1:100 do 3 probówek z podłożem z żółcią, zielenią brylantową i rurką Dürhama. Inkubacja w temperaturze 37°C/37godz.

Ćwiczenie 10

Odczyty posiewów z ćwiczenia 9, interpretacja uzyskanych wyników. Zaliczenia końcowe.