

31991D0180

13.4.1991

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 93/1

DECYZJA KOMISJI
z dnia 14 lutego 1991 r.
ustanawiająca niektóre metody analizy i badania surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej

(91/180/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 85/397/EWG z dnia 5 sierpnia 1985 r. w sprawie zdrowia i problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na wewnątrzwspólnotowy handel mlekiem poddanym obróbce termicznej ⁽¹⁾, ostatnio zmienioną dyrektywą 89/662/EWG ⁽²⁾, w szczególności jej art. 10 ust. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

artykuł 10 ust. 2 przewiduje, że Komisja ustanawia metody analizy i badania, jakie mają być stosowane podczas kontroli zgodności z normami odnoszącymi się do surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej;

w przypadku mleka surowego konieczne jest ustanowienie metod w szczególności ustalających liczbę płytek, liczbę komórek, temperatury zamrażania oraz obecności antybiotyków;

w przypadku mleka pasteryzowanego konieczne jest ustalenie metod w szczególności stwierdzania nieobecności czynników chorobotwórczych, liczby bakterii z grupy coli, liczby płytek, stwierdzania nieobecności fosfatazy, obecności peroksydazy, nieobecności antybiotyków oraz temperatury zamrażania;

w przypadku mleka poddanego sterylizacji UHT (bardzo wysoka temperatura) konieczne jest ustanowienie metod w szczególności ustalania liczby płytek oraz nieobecności antybiotyków;

ze względów technicznych właściwe jest, aby najpierw ustanowić odpowiednie metody analizy i badania, aby zapewnić zgodność z niektórymi normami; w szczególności konieczne jest dalsze badanie warunków, zgodnie z którymi muszą być stosowane rutynowe, analityczne i testowe metody; w oczekiwaniu na wyniki tych badań Państwa Członkowskie odpowiadają za stosowanie właściwych metod rutynowych w celu zapewnienia zgodności z normami ustanowionymi w dyrektywie 85/397/EWG;

wyznaczenie odpowiednich metod analizy i badania obejmuje wyznaczenie procedur analitycznych oraz ustanowienie kryteriów dokładności, w celu zapewnienia jednolitej interpretacji wyników;

środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu Weterynaryjnego,

PRZYMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

Artykuł 1

Wzorcowe procedury analizy i badania mleka surowego obejmują:

- oznaczanie temperatury zamrażania,
- wyliczenie mikroorganizmów — metodą płytkową w temp. 30 °C,
- wyliczenie komórek somatycznych,
- wykrywanie antybiotyków i sulfonamidów.

⁽¹⁾ Dz.U. L 226 z 24.8.1985, str. 13.

⁽²⁾ Dz.U. L 395 z 30.12.1989, str. 13.

Artykuł 2

Wzorcowe procedury analizy i badania mleka pasteryzowanego obejmują:

- oznaczanie temperatury zamarzania,
- oznaczenie aktywności fosfatazy,
- oznaczenie aktywności peroksydazy,
- wyliczenie mikroorganizmów — metodą płytkową w temp. 30 °C,
- wyliczenie mikroorganizmów — metodą płytkową w temp. 21 °C,
- wyliczenie bakterii z grupy coli — liczba kolonii w temp. 30 °C,
- wykrywanie antybiotyków i sulfonamidów,
- wykrywanie mikroorganizmów chorobotwórczych.

Artykuł 3

Wzorcowe procedury analizy i badania mleka poddanego sterylizacji UHT i sterylizowanego obejmują:

- wyliczenie mikroorganizmów — metodą płytkową w temp. 30 °C,
- oznaczanie temperatury zamarzania,
- wykrywanie antybiotyków i sulfonamidów.

Artykuł 4

Wzorcowe procedury analizy i badań, określanie kryteriów dokładności oraz pobieranie próbek należy przeprowadzać zgodnie z zasadami określonymi w załączniku I.

Artykuł 5

Wzorcowe procedury analizy i badań, określone w art. 1, 2 i 3, są opisane w załączniku II.

Artykuł 6

Niniejsza decyzja zostanie ponownie zbadana przed dniem 31 grudnia 1992 r. w celu wzięcia pod uwagę postępu naukowo-technicznego.

Artykuł 7

Niniejsza decyzja skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 14 lutego 1991 r.

W imieniu Komisji

Ray MAC SHARRY

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK I

SPIS TREŚCI

	Strona
I. Przepisy ogólne	187
II. Pobieranie próbek surowego mleka i mleka poddanego obróbce termicznej	189

I. PRZEPISY OGÓLNE

1. Wstęp

Przepisy ogólne odnoszące się do odczynników, sprzętu, formułowania wyników, dokładności i sprawozdań z badań. Właściwe władze Państw Członkowskich oraz laboratoria odpowiedzialne za pobieranie próbek i badanie mleka muszą przestrzegać przepisów ogólnych.

2. Odczynniki

2.1. Woda

2.1.1. W każdym przypadku, gdy jest mowa o wodzie służącej do przygotowywania, rozcieńczania i płukania, należy przyjąć, że chodzi o wodę destylowaną, dejonizowaną lub wodę zdemineralizowaną co najmniej o równoważnym stopniu czystości, chyba że ustalono inaczej. Woda stosowana w celach mikrobiologicznych nie zawiera jakichkolwiek substancji, które w warunkach badania mogłyby wpływać na rozwój mikroorganizmów.

2.1.2. W każdym przypadku odniesienia się do określeń „roztwór” lub „rozcieńczenie”, bez dalszego wskazania, oznaczają odpowiednio „roztwór wodny” lub „rozcieńczenie wodą”.

2.2. Chemikalia

Wszystkie użyte chemikalia powinny mieć uznaną jakość odczynników analitycznych, chyba że ustalono inaczej.

3. Sprzęt

3.1. Wykazy sprzętu

Wykazy sprzętu podane przy różnych wzorcowych procedurach obejmują jedynie pozycje o przeznaczeniu specjalistycznym oraz pozycje posiadające szczególną specyfikację.

3.2. Waga analityczna

Waga analityczna oznacza wagę umożliwiającą dokonanie pomiaru z dokładnością do 0,1 mg.

4. Formułowanie wyników

4.1. Wyniki

Wyniki podawane w analitycznym sprawozdaniu powinny mieć wartość średniej arytmetycznej uzyskanej z dwóch testów, które spełniają kryterium powtarzalności (5.1) określone dla danej metody, chyba że ustalono inaczej. Jeśli kryterium powtarzalności nie zostanie spełnione, test musi zostać powtórzony lub wynik uznany za nieważny.

4.2. Obliczanie procentów

Wynik obliczany jest jako procent masy próbki, chyba że ustalono inaczej.

5. Kryteria dokładności: powtarzalność i odtwarzalność

5.1. Kryteria dokładności podawane przy każdej procedurze są określone następująco:

5.1.1. „Powtarzalność (r)” jest to wartość, poniżej której znajduje się bezwzględna różnica wyników między dwoma niezależnymi wynikami, uzyskanymi przy zastosowaniu tej samej procedury, na tym samym materiale badawczym oraz w takich samych warunkach (ten sam laborant, ta sama aparatura, to samo laboratorium oraz krótki odstępow czasu).

5.1.2. „Odtwarzalność (R)” jest to wartość, poniżej której znajduje się bezwzględna różnica wyników między dwoma niezależnymi wynikami testów, uzyskanymi przy zastosowaniu tej samej procedury, na tym samym materiale badawczym, w różnych warunkach (przez różnych laborantów, przy użyciu różnej aparatury, w różnych laboratoriach i/lub w różnym czasie).

- 5.1.3. Wartości kryteriów powtarzalności i odtwarzalności podawane we wzorcowych klauzulach każdej procedury reprezentują 95 % poziomu ufności przedziałów określonych w ISO 5725, drugie wydanie 1986, chyba że ustalono inaczej. Są one obliczane na podstawie wyników uznanych wspólnych prób stosowanych przy ocenie procedury. Jednakże dla niektórych procedur nie zostały przeprowadzone próby wspólne. W takich przypadkach wartości powtarzalności i odtwarzalności są szacunkowe.
- 5.1.4. Próby wspólne i badania określone w 5.1.3 powinny być planowane i przeprowadzane zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi.

6. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań precyzuje zastosowane metod analizy, jak również uzyskane wyniki. Ponadto podaje szczegóły dotyczące procedur stosowanych opcjonalnie lub niesprecyzowanych w metodzie analizy, a także wszelkie inne okoliczności mogące mieć wpływ na uzyskane wyniki. Sprawozdanie z badania podaje wszystkie informacje konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

II. POBIERANIE PRÓBEK MLEKA SUROWEGO ORAZ PODDANEGO OBRÓBCE TERMICZNEJ

1. Przedmiot i zakres stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę pobierania próbek surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej. Procedury pobierania, transportu i przechowywania próbek mają zastosowanie do surowego mleka z dostaw producenta oraz do surowego mleka oraz mleka poddanego obróbce termicznej w zbiornikach do przechowywania i transportowania.

Procedury podane w 2, 4.4, 5 i 6 stosowane są do pobierania próbek mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniego spożycia.

2. Przepisy ogólne

Pobieranie próbek mleka surowego oraz mleka poddanego obróbce termicznej znajdującego się w pojemnikach, zbiornikach itp. przeprowadzane jest przez wykwalifikowanego laboranta, który przeszedł uprzednio odpowiednie szkolenie przed podjęciem się pobierania próbek mleka.

Jeśli uzna się za stosowne, właściwe władze lub laboratorium badawcze instruują personel w zakresie technik pobierania próbek, aby zapewnić, że pobrana próbka jest reprezentatywna i zgodna z całą partią.

Jeśli uzna się za stosowne, właściwe władze lub laboratorium badawcze instruują personel w zakresie znakowania próbek, aby zapewnić jednoznaczną identyfikację próbki.

3. Sprzęt do pobierania próbek

3.1. Przepisy ogólne

Sprzęt do pobierania próbek wykonany jest z nierdzewnej stali lub innego odpowiedniego materiału o stosownej wytrzymałości oraz konstrukcji, odpowiedniej do zamierzonego celu (mieszanie, pobieranie próbek itp.), Bełtaki i mieszadła do mieszania płynów w pojemnikach mają powierzchnię na tyle dużą, by zapewnić właściwe mieszanie produktu i nie przyczyniać się do powstania zjełczałego zapachu. Próbniki muszą posiadać dostatecznie długi, mocny uchwyt, odpowiedniej długości, aby możliwe było pobieranie próbek z dowolnej głębokości pojemnika. Pojemność próbniaka jest nie mniejsza niż 50 ml.

Pojemniki na próbki oraz zamknięcia powinny być wykonane ze szkła, odpowiednich metali lub tworzyw sztucznych.

Materiały, z których wykonany jest sprzęt do pobierania próbek (włącznie z pojemnikami i zamknięciami), nie mogą powodować jakichkolwiek zmian w próbce, które mogłyby wpłynąć na wyniki badań. Wszystkie powierzchnie sprzętu do pobierania próbek oraz pojemników na próbki są czyste i suche, gładkie i wolne od pęknięć, o zaokrąglonych rogach.

3.2. Sprzęt do pobierania próbek do badań mikrobiologicznych

Sprzęt do pobierania próbek, włącznie z pojemnikami, w uzupełnieniu do przepisów określonych w pkt 3.1, jest sterylny.

Jeśli do pobierania kolejnych próbek używa się tego samego sprzętu, to po każdym pobraniu próbek jest czyszczony i sterylizowany zgodnie z instrukcjami lub wymogami przewidzianymi przez laboratorium badawcze lub właściwe władze, w celu zachowania integralności kolejnych próbek.

4. Technika pobierania próbek

4.1. Przepisy ogólne

Bez względu na rodzaj badań, jakie mają być wykonane, przed pobraniem próbek mleko dokładnie wymieszać za pomocą środka ręcznego lub mechanicznego.

Próbkę pobrać niezwłocznie po wymieszaniu, podczas gdy mleko jest jeszcze poruszone.

Przy równoczesnym pobieraniu kilku próbek mleka do różnych badań w pierwszej kolejności pobrać próbkę do badania mikrobiologicznego.

Objętość próbki odpowiada wymogom badawczym. Pojemność używanych pojemników na próbki jest taka, aby próbka wypełniała je prawie całkowicie, co umożliwia właściwe wymieszanie zawartości przed badaniem, a równocześnie zapobiega gwałtownemu mieszanemu podczas transportu.

- 4.2. *Ręczne pobieranie próbek*
- 4.2.1. *Pobieranie próbek z wiader i baniek*
- Aby zamieszać mleko, należy szybko poruszyć w górę i w dół bełtakiem w wiadrze lub bańce tak, aby mleko było właściwie wymieszane i aby do szyjki bańki nie przylegała śmietana. Pobrać próbkę reprezentatywną dla całej partii uzyskiwaną zgodnie z 4.2.4.
- 4.2.2. *Pobieranie próbek z pojemników lub kadzi z mlekiem zamrożonym przez farmera*
- Zamieszać mleko mechanicznie lub ręcznie aż do uzyskania odpowiedniej jednorodności.
- Jeśli objętość mleka nie pozwala na wymieszanie go mieszadłem mechanicznym, mieszanie należy wykonać ręcznie.
- 4.2.3. *Pobieranie próbek z pojemnika wagowego*
- Istotne jest odpowiednie wymieszanie mleka przed umieszczeniem go w pojemniku wagowym. Aby zapewnić równomierne rozprowadzenie tłuszczu, może być konieczne zastosowanie dodatkowego mieszania ręcznego lub mechanicznego. Jeśli objętość partii, z której pobierane są próbki, przekracza objętość pojemnika wagowego, próbkę reprezentatywną dla całej partii uzyskuje się zgodnie z 4.2.4.
- 4.2.4. *Pobieranie próbek z podzielonej partii produktu*
- W przypadku gdy ilość mleka, z którego mają być pobrane próbki, znajduje się w więcej niż jednym pojemniku, pobrać reprezentatywną próbkę z każdego pojemnika i odnotować ilość mleka, do jakiej odnosi się każda z tych próbek. Jeśli próbki z poszczególnych pojemników muszą być badane indywidualnie, należy wymieszać ze sobą reprezentatywne ilości w ilościach, które są proporcjonalne do ilości w pojemniku, z których pochodzi każda próbka. Po wymieszaniu pobranych proporcjonalnie ilości pobiera się z nich próbkę).
- 4.2.5. *Pobieranie próbek z dużych zbiorników: cystern składowych, kolejowych i samochodowych.*
- 4.2.5.1 *Przed pobraniem próbek wymieszać mleko, stosując odpowiednią procedurę.*
- Zaleca się mechaniczne mieszanie zawartości dużych zbiorników, cystern składowych kolejowych lub samochodowych (4.2.5.2).
- Czas i intensywność mieszania odpowiadają długości czasu, w jakim mleko pozostawało w spoczynku. Skuteczność zastosowanej w danych okolicznościach procedury mieszania jest wykazywane jako będące odpowiednie do celów przewidzianej analizy; kryterium skuteczności mieszania ma w szczególności wpływ na podobieństwo wyników analitycznych, uzyskanych w efekcie badania próbek pobranych z różnych części partii lub z wylotu zbiornika pobranych w odstępach czasu. Procedurę mieszania mleka uważa się za skuteczną, jeśli różnica zawartości tłuszczu między dwoma próbkami pobranymi w takich warunkach wynosi mniej niż 0,1 %.
- W dużym zbiorniku z wylotem w dnie w punkcie wylotu może występować niewielka ilość mleka, która nawet po wymieszaniu nie jest reprezentatywna dla całej zawartości. Dlatego próbki powinny być pobierane przez otwór włączowy. Jeśli próbki pobierane są z otworu wylotowego, należy wylać odpowiednią ilość mleka w celu zapewnienia, że próbki są reprezentatywne dla całości.
- 4.2.5.2 *Mieszanie zawartości dużych zbiorników bądź cystern składowych, kolejowych lub samochodowych może być przeprowadzane:*
- za pomocą mieszadła mechanicznego wbudowanego w zbiorniki i napędzanego silnikiem elektrycznym,
 - za pomocą mieszadła śmigłowego lub mieszadła napędzanego silnikiem elektrycznym i umieszczonego na otworze włączowym, z mieszadłem zawieszonym w mleku,
 - w przypadku cystern kolejowych lub samochodowych przez recyrkulację mleka poprzez umieszczony w otworze włączowym wąż tłoczący podłączony do pomp opróżniających zbiornik,
 - za pomocą czystego, przefiltrowanego, sprężonego powietrza; w takim wypadku, aby zapobiec powstawaniu zjełczałego zapachu, powinno być stosowane minimalne ciśnienie i objętość powietrza.
- 4.3. *Automatyczne lub półautomatyczne pobieranie próbek*
- Automatyczne lub półautomatyczne urządzenia do pobierania próbek surowego mleka z dostaw producenta mogą być używane zgodnie z instrukcją podaną przez laboratorium badawcze lub inny właściwy organ.
- Takie wyposażenie, przed pierwszym użyciem oraz w regularnych odstępach czasu w trakcie użytkowania, poddawać odpowiednim testom określonym przez odpowiedzialny organ. Przydatność procedur pobierania próbek należy weryfikować w celu ustalenia:

- minimalnej objętości mleka, z której można właściwie pobrać próbki,
- prędkości przenoszenia (związanej z minimalną objętością próbki),
- zdolności pobrania reprezentatywnej próbki dla partii produktu wcześniej wymieszanej.

Przy stosowaniu automatycznych lub półautomatycznych urządzeń do pobierania próbek odpowiedzialny organ krajowy może określić:

- minimalną objętość mleka, z jakiej należy pobierać próbki,
- minimalną objętość próbki,
- maksymalną prędkość przenoszenia,
- jakie analizy należy wykonywać lub jakie środki ostrożności należy podjąć.

4.4. *Pobieranie próbek mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniej konsumpcji w opakowaniach detalicznych*

Próbki mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do bezpośredniej konsumpcji w opakowaniach detalicznych, muszą być pełne, zamknięte opakowania. Jeśli to możliwe, próbki należy pobierać z maszyny pakującej lub chłodni w zakładzie przetwórczym, jak najszybciej po przetworzeniu. W przypadku mleka pasteryzowanego w dniu przetworzenia.

Próbki pobierane są z każdego rodzaju mleka poddanego obróbce termicznej (pasteryzowanego, poddanego sterylizacji UHT) w liczbie odpowiadającej badaniom, które będą przeprowadzone, oraz zgodnie z instrukcjami przewidzianymi przez laboratorium badawcze bądź inny właściwy organ.

5. **Identyfikacja próbki**

Posługując się instrukcją opracowaną przez laboratorium badawcze lub właściwy organ, próbkę należy oznaczyć kodem tak, aby można ją było łatwo zidentyfikować i zapewnić tożsamość próbki (patrz 2).

6. **Transport i przechowywanie próbek**

Laboratorium badawcze opracowuje instrukcje dotyczące warunków transportu, przechowywania oraz odstępu czasu między pobraniem próbek a analizą mleka, w zależności od rodzaju mleka oraz zastosowanej procedury analizy. Instrukcje ustanawiane są zgodnie z wymogami właściwego organu krajowego.

Instrukcje zawierają następujące punkty:

- środki ostrożności podczas transportu i przechowywania są podejmowane, by zabezpieczyć próbki przed skażającymi zapachami i bezpośrednim działaniem promieni słonecznych. Jeśli do próbek stosuje się pojemniki przezroczyste, należy przechowywać je w ciemnym miejscu,
- próbki surowego mleka pobrane do analizy mikrobiologicznej są transportowane i przechowywane w temperaturze 0—4 °C. Czas między pobraniem próbek a analizą jest możliwie jak najkrótszy i w żadnym przypadku nie przekracza 36 godzin. Właściwy organ może zaakceptować temperaturę przechowywania między 0—6 °C, jeśli czas między pobraniem próbek a analizą nie przekracza 24 godzin,
- próbki mleka pasteryzowanego do analizy mikrobiologicznej są transportowane i przechowywane w temperaturze 0—4 °C. Czas między pobraniem próbek a analizą jest możliwie jak najkrótszy i w żadnym przypadku nie przekracza 24 godzin,
- próbki inne niż mleka surowego i pasteryzowanego do analizy mikrobiologicznej przechowywane są w laboratorium w lodówce, a czas między pobraniem próbek a analizą jest możliwie jak najkrótszy.

Należy podjąć specjalne środki ostrożności przy dokonywaniu niektórych analiz wynikających z różnych procedur.

ZAŁĄCZNIK II

SPIS TREŚCI

	Strona
I. Oznaczenie temperatury zamarzania	193
II. Oznaczenie aktywności fosfatazy	199
III. Oznaczenie aktywności peroksydazy	202
IV. Wyliczenie mikroorganizmów metodą płytkową w temperaturze 30 °C	203
V. Wyliczenie mikroorganizmów metodą płytkową w temperaturze 21 °C	208
VI. Wyliczenie bakterii z grupy coli — liczba kolonii w temperaturze 30 °C	212
VII. Wyliczanie komórek somatycznych	216
VIII. Wykrywanie antybiotyków i sulfonamidów	222
IX. Wykrywanie mikroorganizmów chorobotwórczych	231

I. OZNACZANIE TEMPERATURY ZAMARZANIA

1. Przedmiot i zakres stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę oznaczania temperatury zamarzania surowego, pasteryzowanego, poddanego sterylizacji UHT mleka pełnego, mleka częściowo odtłuszczonego oraz całkowicie odtłuszczonego za pomocą aparatu (krioskop termistorowy), w którym sterowanie termostatyczne kąpeli odbywa się poprzez chłodzenie elektryczne, a zamiast termometru szklanego z rtęcią stosuje się zgłębnik termistorowy.

Dostępne są dwa rodzaje przyrządów. Pierwszy z nich wyszukuje maksymalny punkt „plateau” krzywej zamarzania; podczas gdy drugi ze względów handlowych ustawiony jest na odczyt w ustalonym czasie po rozpoczęciu zamarzania. Ponieważ krzywe zamarzania mogą się różnić dla poszczególnych rodzajów mleka, a także między mlekiem a roztworami wzorcowymi wykorzystywanymi do kalibracji, niniejsza procedura wzorcowa wymaga zastosowania przyrządów wyszukujących punkty plateau. Przyrządy ustawiane na czas mogą być używane do rutynowych pomiarów klasyfikacyjnych.

Temperaturę zamarzania można stosować do oceny proporcji wody obcej w mleku, pod warunkiem że kwasowość próbki nie przekracza 0,18 g kwasu mlekowego na 100 ml (patrz 7.4).

2. Definicja

Temperatura zamarzania mleka. Wartość uzyskana przy pomiarze zgodnym z opisaną procedurą i wyrażona w stopniach Celsjusza (°C).

3. Zasada

Porcję mleka do badań schładza się do właściwej temperatury, w zależności od rodzaju stosowanego przyrządu oraz zależnie od krystalizacji wywoływanej przez drgania mechaniczne, które powodują szybki wzrost temperatury, osiągając plateau odpowiadający zamarzaniu próbki.

Przyrząd wzorcować, regulując go tak, aby dawał prawidłowy odczyt dla dwóch standardowych roztworów, przy zastosowaniu tej samej procedury co dla próbek mleka. W takich warunkach plateau oznacza temperaturę zamarzania mleka, w stopniach Celsjusza.

4. Aparatura i szkło laboratoryjne

Podstawowy sprzęt laboratoryjny oraz w szczególności:

4.1. Krioskop

Krioskop składa się z termostatycznie kontrolowanej łaźni chłodzącej, próbnika termistorowego (półprzewodnikowego termometru oporowego) wraz z obwodem przyłączonym oraz galwanometrem lub „odczytem”, mieszkadłem do próbki, urządzeniem inicjującym zamarzanie oraz próbek z próbkami.

4.1.1. Łaźnia chłodząca

Można stosować dwa rodzaje łaźni chłodzącej.

4.1.1.1. Typ zanurzeniowy

Dobrze izolowana łaźnia zawierająca odpowiednią ciecz chłodzącą, która jest mieszana tak, aby różnica temperatury między dwoma dowolnymi punktami cieczy nie przekraczała 0,2 °C. Temperatura cieczy nie różni się o więcej niż $\pm 0,5$ °C od wartości nominalnej podanej przez producenta.

Ważne jest, aby ciecz w łaźni chłodzącej utrzymywać na stałym poziomie. Cała powierzchnia probówki z próbką znajdującą się poniżej kreski wskazującej objętość powinna być pokryta cieczą chłodzącą.

4.1.1.2. Typ cyrkulacyjny

Ciągły strumień odpowiedniej cieczy chłodzącej krąży wokół probówki z próbką. Temperatura cieczy nie powinna się różnić o więcej niż $\pm 0,5$ °C od nominalnej wartości podanej przez producenta.

Odpowiednią cieczą chłodzącą jest 33 % (v/v) wodny roztwór etano1,2—diolu (glikol etylenowy).

4.1.2. Termistor i obwód przyłączony

Termistor typu zgłębnika szklanego o średnicy nie większej niż $1,8 \pm 0,2$ mm oraz średnicy prowadzącej nie większej niż 0,31 mm. Stała czasowa termistora wynosi mniej niż dwie sekundy, a wartość β (patrz uwaga) jest wysoka. Napięcie robocze, prąd i stała rozproszenia powinny mieć taką wartość, aby temperatura termistora nie podnosiła się o więcej niż $0,0005$ °C ponad temperaturę otaczającą - $0,512$ °C. Maksymalna tolerancja oporu wynosi ± 5 %.

Kiedy zgłębnik znajduje się w pozycji roboczej w krioskopie, końcówka jego szklanego brzegu znajduje się wzdłuż osi próbki z próbką, w odległości $44,6 \pm 0,1$ mm poniżej wierzchołka próbki (patrz rys. 1). Użytkownik dysponuje wzornikiem w celu ustawienia zgłębnika w takiej pozycji.

Uwaga

β określa cechy współzależności oporu i temperatury termistora według wzoru:

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2}$$

gdzie:

T to temperatura w stopniach Kelvina,

R to opór w omach w temperaturze T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R}$$

β to stała zależna od materiału, z jakiego wykonany jest termistor. Aktualnie w praktyce zaleca się, aby jej wartość była większa od 3 000.

4.1.3. Urządzenie pomiarowe i odczytowe

4.1.3.1. Zasada pomiaru

Stosowany przyrząd działa na zasadzie wyszukiwania pierwszego płaskiego odcinka charakterystyki temperatury zamarzania. Odcinek taki stanowi tę część krzywej, w której temperatura pozostaje stała w granicach maksimum $\pm 0,002$ °C co najmniej przez 20 sekund.

4.1.3.2. Pomiar ręczny

Opór termistora równoważyć za pomocą mostka Wheatstone'a lub podobnego urządzenia i przy użyciu najwyższej jakości stałych oporników, których tolerancja nie jest większa niż ± 10 % i których współczynnik temperaturowy nie przekracza 2×10^{-5} °C.

Zmienny (wyrównawczy) opornik nie odchodzić od liniowości w całym swoim zakresie o więcej niż 0,3 % swojej wartości maksymalnej.

Zapewnić środek do regulacji oporników w celach wzorcowania.

Tarcza pomiarowa ma podziałkę nie większą niż 0,001 °C.

4.1.3.3. Pomiar automatyczny

Urządzenie odczytowe zapewnia zdolność rozróżniania przynajmniej 0,001 °C w zakresie od 0 do -1 °C.

Stabilność urządzenia odczytowego i jego obwodu przyłączonego powinna być taka, aby kolejne wskazania tej samej temperatury nie różniły się o więcej niż 0,001 °C.

Liniowość obwodu jest taka, aby przy prawidłowej obsłudze w żadnym punkcie w zakresie od -0,400 °C do -0,600 °C nie zaistniał błąd większy niż $\pm 0,001$ °C.

4.1.4. Drut mieszający

Do mieszania badanej porcji używać drutu z metalu obojętnego dla mleka, o średnicy 1—1,5 mm.

Drut mieszający jest dostosowywany do amplitudy i montowany pionowo, a jego dolny koniec sięga poziomu zgłębnika termistorowego. Dopuszcza się tolerancję około 1,5 mm powyżej lub poniżej tego położenia.

Drut mieszający powinien drgać w osi bocznej, z amplitudą podaną przez producenta (nie mniej niż $\pm 1,5$ mm), aby zapewnić, by temperatura w obrębie próbki podczas oznaczania pozostała jednakowa. Podczas normalnego mieszania drut nie uderza o zgłębnik termistorowy ani o ścianę próbki.

4.1.5. Urządzenie inicjujące zamarzania

Może być to jakiekolwiek urządzenie, które po uruchomieniu natychmiastowo powoduje rozpoczęcie zamarzania próbki tak, że temperatura badanej porcji wzrasta do temperatury zamarzania. Można użyć w tym celu drutu mieszącego; jedną procedurą jest zwiększenie amplitudy drgań przez 1-2 sekundy, tak aby drut mieszący uderzał o ścianę próbówki z próbką.

4.1.6. Probówki

Probówki (patrz rys. 1) wykonane są ze szkła i mają wymiary: długość $50,8 \pm 0,1$ mm, średnicę zewnętrzną $16,0 \pm 0,1$ mm oraz średnicę wewnętrzną $13,5 \pm 0,1$ mm. Grubość ściany nie różni się w obrębie całej próbówki o więcej niż 0,1 mm.

Probówki mają oznaczoną objętość 29,8 mm poniżej końca (21 mm powyżej podstawy próbówki), wskazującą objętość próbki $2,5 \pm 0,1$ ml.

4.1.7. Zasilanie prądem elektrycznym

Napięcie zasilające stabilizować w ramach urządzenia bądź zewnętrznie, tak aby fluktuacja nie przekraczała ± 1 % wartości nominalnej, podczas gdy zasilanie sieciowe waha się ± 6 %.

4.2. Waga analityczna

4.3. Kolby pomiarowe z pojedynczą podziałką, pojemności 1 000 ml, klasa A.

4.4. *Piec suszarniczy*, o dobrej wentylacji, umożliwiający utrzymanie temperatury 130 ± 1 °C, lub

Piec elektryczny, wentylowany, umożliwiający utrzymanie temperatury 300 ± 25 °C.

4.5. Eksykator

5. Odczynniki

5.1. Woda destylowana na szkło borokrzemianowym, zagotowana i schłodzona do 20 ± 2 °C w kolbie z umieszczoną w niej próbówką absorbcyjną do ditlenku węgla.5.2. Chlorek sodu, jakość analityczna odczynnika, drobnomielony, suszony przez pięć godzin w temperaturze 300 ± 25 °C w piecu, ewentualnie suszony w piecu w temperaturze 130 ± 1 °C co najmniej przez 24 godziny i schłodzony w najefektywniejszym eksykatorze do temperatury pokojowej.

5.3. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Odważyć w naczynku wagowym odpowiednią ilość (patrz tabela 1) suchego chlorku sodu (5.2). Rozpuścić w wodzie destylowanej (5.1), przenieść ilościowo do 1 000 ml kolby pomiarowej z pojedynczą podziałką i rozcieńczyć do kreski wodą o temperaturze 20 ± 2 °C.

Przechowywać nie dłużej niż dwa miesiące, w temperaturze około 5 °C w dobrze zakorkowanych butelkach polietylenowych o pojemności nie większej niż 250 ml.

Temperatura zamarzania roztworów chlorku sodu w 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Przed użyciem roztworu wzorcowego delikatnie odwrócić butelkę do góry dnem i obracać kilkakrotnie w celu dokładnego wymieszania zawartości. Nie wolno, w żadnym razie, poruszać roztworem gwałtownie, aby nie wprowadzić powietrza do środka.

Próbki roztworu wzorcowego należy pobierać z butelki poprzez wlewanie roztworu do czystej, suchej zlewki; nigdy nie wolno używać w tym celu pipet.

Nie należy używać roztworu z butelek wypełnionych mniej niż do jednej czwartej objętości oraz nie należy używać roztworów po upływie dwóch miesięcy, jeśli nie zostały zabezpieczone środkiem grzybobójczym (np. roztworem tiomersalu 10 g/l).

6. Wzorcowanie krioskopu termistorowego

Krioskop musi być założony tak, aby temperatura otaczającego powietrza nie odbiegała o więcej niż 1 °C od temperatury, w jakiej prowadzi się wzorcowanie. Krioskop nie może być wystawiony na działanie promieni słonecznych, przeciągów oraz temperatury pokojowej wyższej niż 26–27 °C.

Zapewnić dobry stan roboczy krioskopu, zgodnie z instrukcjami producenta; przed wzorcowaniem musi on być włączony co najmniej przez 12 godzin. Sprawdzić położenie zgłębnika, amplitudę drgań drutu mieszającego oraz temperaturę cieczy chłodzących.

Wybrać dwa roztwory wzorcowe (patrz tabela 1 powyżej), które sąsiadują najbliżej ze spodziewaną wartością temperatury zamarzania badanych próbek mleka. Najlepiej, jeśli różnica między temperaturami zamarzania dwóch roztworów nie jest mniejsza niż – 0,100 °C.

(W niektórych modelach obecnie dostępnych krioskopów obwód przyłączony do termistora skonstruowany jest tak, że jest równoważony przy określonej wartości temperatury zamarzania w ramach zakresu pomiarowego urządzenia. W takich wypadkach wzorcowanie ułatwia użycie roztworu wzorcowego posiadającego temperaturę zamarzania jak jeden z roztworów wzorcujących; producent powinien wskazać tę wartość).

Odmierzyć pipetą $2,5 \pm 0,1$ ml jednego wzorca do czystej, suchej próbówki i posłużyć się krioskopem.

Uwaga

Użyte podczas wzorcowania próbówki powinny być wykonane z tego samego rodzaju szkła; umyte i spłukane wodą zdemineralizowaną równocześnie z tymi, których używa się podczas badania próbek mleka. Temperatura roztworów wzorcowych powinna być zbliżona do temperatury próbek mleka.

Regulację wzorcowania dostosowuje się, zgodnie z zaleceniami producenta, aż do uzyskania na krioskopie odczytu równego temperaturze zamarzania roztworu wzorcowego. Procedurę tę powtarza się z innym roztworem wzorcowym i kontynuować, zmieniając roztwory aż do momentu, gdy kolejne odczyty dla obydwu roztworów bez konieczności dalszej regulacji będą wskazywać prawidłowe wartości temperatury zamarzania każdego z nich. Krioskop jest wtedy gotowy do użycia i będzie wskazywał bezpośrednio temperaturę zamarzania próbki mleka, bez stosowania jakichkolwiek korekt.

7. Przygotowanie próbki do badań

- 7.1. W razie potrzeby próbki przechowuje się w temperaturze 0–5 °C.
- 7.2. W razie potrzeby należy usunąć z próbki wszelkie widoczne ciała obce i stały tłuszcz mleka, przefiltrowując ją do czystego, suchego naczynia, po czym delikatnie wymieszać. Używany ewentualnie filtr jest obojętny w stosunku do mleka i jest skuteczny w temperaturze laboratorium.
- 7.3. Mleko można badać, kiedy jego temperatura jest równa temperaturze przechowywania (między 0 a 5 °C) lub bezpośrednio przed rozpoczęciem badania pozwoli mu się osiągnąć temperaturę laboratorium. Jednakże zadbać o to, aby temperatura roztworów wzorcowych oraz próbek mleka była jednakowa.
- 7.4. Oznaczyć kwasowość mleka w miarę możliwości równocześnie z badaniem temperatury zamarzania. Probki o kwasowości przekraczającej 0,18 g kwasu mlekowego na 100 ml mleka nie mogą być badane.
- 7.5. Mleko poddane sterylizacji UHT pozostaje w otwartym pojemniku co najmniej przez 20 minut przed rozpoczęciem badania.

8. Procedura

8.1. Kontrola wstępna

Sprawdzić, czy poziom i temperatura cieczy chłodzącej są zgodne z zaleceniami producenta oraz — ewentualnie — czy w pustej probówce umieszczonej w studzience do próbek znajduje się zgłębnik termistorowy. Włączyć krioskop i sprawdzić, czy ciecz chłodząca jest właściwie mieszana bądź czy jej cyrkulacja jest prawidłowa. Po upływie 12 godzin od włączenia krioskopu sprawdzić temperaturę cieczy chłodzącej oraz położenie i amplitudę drgań druta mieszającego.

8.2. Rutynowa kontrola wzorcowania

Każdorazowo przed przeprowadzeniem testu zmierzyć temperaturę zamarzania wzorcowego roztworu chlorku sodu (np. roztworu o temperaturze zamarzania $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$) aż do momentu, gdy dwa kolejne oznaczenia nie różnią się od siebie o więcej niż $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeśli średnia tych wartości różni się od temperatury zamarzania roztworu wzorcowego o więcej niż $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$, należy ponownie wzorcować krioskop zgodnie z 6.

Jeśli krioskop znajduje się w użytku ciągłym, przeprowadza się rutynową kontrolę wzorcowania co najmniej raz na godzinę. Zalecenia podane przez producenta brane są pod uwagę.

8.3. Oznaczanie temperatury zamarzania mleka

Delikatnie odwrócić butelkę z próbką mleka i kilkakrotnie obracać nią, aby wymieszać zawartość. Nie należy wstrząsać nią gwałtownie, gdyż powoduje to jego napowietrzanie.

Odmierzyć pipetą $2,5 \pm 0,1$ ml mleka do czystej, suchej probówki; nadmiar usunąć pipetą. Upewnić się, czy zgłębnik i drut mieszający są czyste i suche; jeśli trzeba, przetrzeć je starannie z dołu do góry miękką, czystą i niepozostawiającą kłaczek cienką tkaniną.

Probówkę umieszcza się we wzorcowanym krioskopie zgodnie z zaleceniami producenta. W granicach $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ podanej przez producenta temperatury mleko zostanie schłodzone i rozpocznie się jego zamarzanie.

(Na niektórych przyrządach automatycznych tę temperaturę można obserwować na odczycie cyfrowym; w przypadku przyrządów obsługiwanych ręcznie niezbędną dokładność uzyskuje się poprzez zapewnienie, aby przy rozpoczęciu zamarzania wskaźnik lub włos galwanometru pokrywał się z właściwą kreską).

Jeśli z jakichkolwiek powodów zamarzanie rozpoczyna się przed lub poza wyznaczonym zakresem temperatury, należy przerwać badanie i powtórzyć je z inną próbką mleka. Jeśli druga próbka również zamarza przed określoną temperaturą, kolejną próbkę należy podgrzać do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ i utrzymać przez pięć minut, aby pozwolić na rozpuszczenie się tłuszczu krystalicznego.

Następnie ponownie schłodzić i natychmiast przeprowadzić badanie. Temperatura mleka po rozpoczęciu zamarzania wzrośnie gwałtownie do wartości, która pozostaje praktycznie stała przez pewien czas, zanim zacznie ponownie spadać. Temperatura zamarzania odpowiada najwyższej temperaturze osiągniętej w tym okresie; wartość ta jest rejestrowana.

Uwaga

Czas, w którym temperatura pozostaje stała, i odstęp czasu między rozpoczęciem zamarzania a osiągnięciem najwyższej temperatury będzie się różnił dla poszczególnych próbek i będzie znacznie krótszy dla wody i wzorcowego roztworu chlorku sodu niż dla mleka. Ważne jest, aby odnotować najwyższą temperaturę.

Po pomyślnym zakończeniu pomiaru usunąć probówkę, przepłukać wodą, a następnie wytrzeć do sucha zgłębnik termistorowy i mieszadło za pomocą miękkiej, czystej nie pozostawiającej kłaczek cienkiej tkaniny, w kierunku z dołu do góry; po czym wykonać powtórne oznaczenie na kolejnej porcji próbki mleka.

Jeśli różnica uzyskanej temperatury zamarzania jest większa niż wartość powtarzalności ($0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$), przeprowadza się powtórne oznaczanie na innej porcji tej próbki. Jeśli dwa oznaczenia są zgodne w zakresie $0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$, wartości należy odnotować i na ich podstawie obliczyć wynik końcowy.

8.4. Chłodzenie zgłębnika

Po użyciu przyrządu pustą probówkę umieszcza się w otworze na próbki oraz obniża się głowicę roboczą, aby utrzymać zgłębnik w stanie schłodzonym. (W niektórych modelach krioskopu jest to niemożliwe; w takich wypadkach konieczne jest zapewnienie właściwego schłodzenia zgłębnika przed wykonaniem pomiarów, np. poprzez kilkakrotne wykonanie pozornych oznaczeń aż do uzyskania zgodności kolejnych odczytów).

9. **Formułowanie wyników**9.1. *Obliczanie*

Jeśli rutynowa kontrola wzorcowania da wynik pozytywny, należy obliczyć średnią dwóch uzyskanych i akceptowanych wartości temperatury zamarzania, z dokładnością do trzeciego miejsca dziesiętnego.

Jeśli suma dwóch akceptowanych wartości jest liczbą nieparzystą, średnią należy zaokrąglić do najbliższej wartości parzystej, jak pokazano na poniższym przykładzie:

Temperatura krzepnięcia (°C)

Dwie wartości		Średnia
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

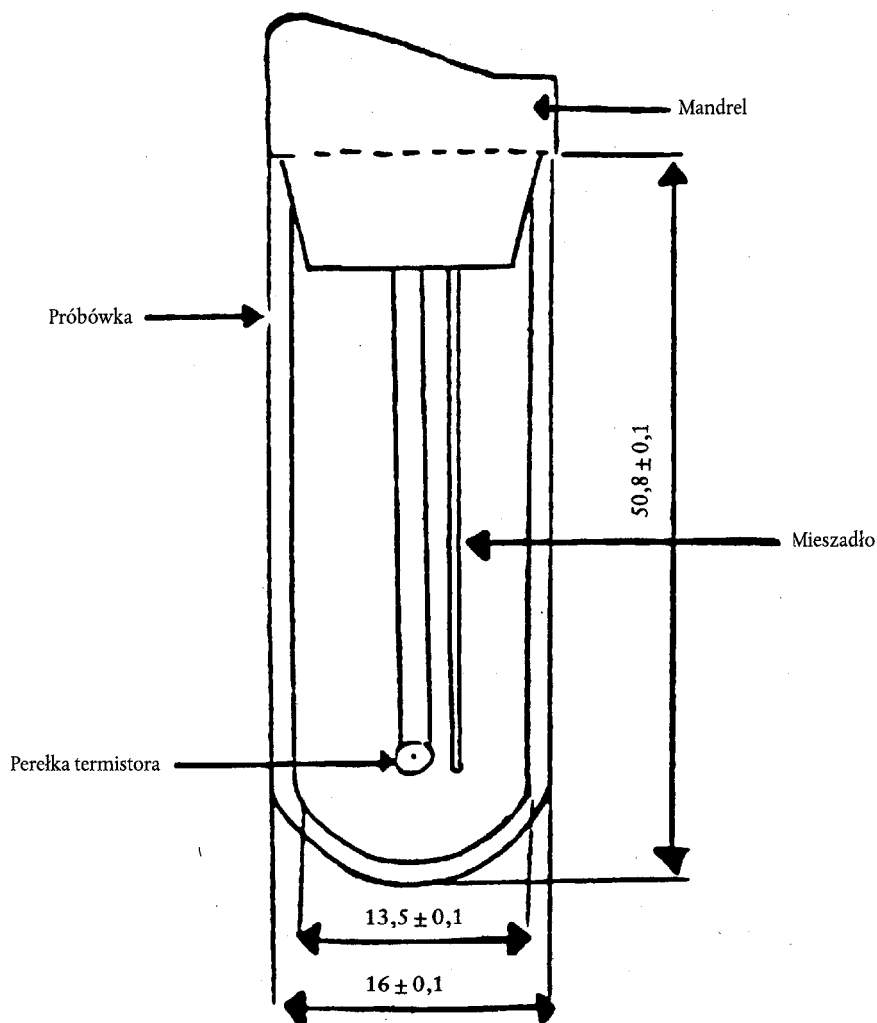
9.2. *Dokładność*

9.2.1. Powtarzalność (r): 0,004 °C.

9.2.2. Odtwarzalność (R): 0,006 °C.

Rysunek 1

Szczegółowa budowa krioskopu termistorowego 4.1 (położenie próbówki w stosunku do perełki termistora i mieszadła)



Wymiary podane w mm

II. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZY

1. Zakres i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę oznaczania aktywności fosfatazy w mleku pasteryzowanym.

2. Definicja

2.1. Aktywność fosfatazy jest to miara ilości aktywnej fosfatazy zasadowej obecnej w produkcie, wyrażona jako ilość fenolu w mikrogramach, który zostaje uwolniony zgodnie z warunkami wymienionymi w procedurze przez 1 ml mleka pasteryzowanego.

2.2. Za wynik negatywny przyjmuje się każde mleko, którego aktywność fosfatazy wynosi mniej niż 4 µg/ml.

3. Zasada

Aktywność fosfatazy oceniana jest na podstawie ilości fenolu uwolnionego z fenylofosforanu disodowego dodanego do próbki. Uwolniony fenol reaguje z dibromochinonochlorimidem, wytwarzając dichromoindofenol (o niebieskawym zabarwieniu), który mierzy się kolorymetrycznie na 610 nm, porównując z próbką, gdzie enzym fosfatazy został zniszczony.

4. Odczynniki

4.1. Roztwór buforowy boranu — wodorotlenku baru

4.1.1. Rozpuścić 50,0 g wodorotlenku baru [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] w wodzie i dopełnić do 1 000 ml.

4.1.2. Rozpuścić 22,0 g kwasu borowego [H_3BO_3] w wodzie i dopełnić do 1 000 ml.

4.1.3. Podgrzać po 500 ml każdego z roztworów do temperatury 50 °C, połączyć roztwory, wymieszać, schłodzić szybko do około 20 °C, jeśli trzeba — wyrównać pH do $10,6 \pm 0,1$ poprzez dodanie roztworu 4.1.1 lub 4.1.2. Przechowywać w szczelnie zamkniętym pojemniku.

4.1.4. Przed użyciem rozcieńczyć roztwór pół na pół wodą.

4.2. Roztwór buforowy do wywoływania zabarwienia

Rozpuścić w wodzie 6,0 g metaboranu sodu (NaBO_2) lub 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) oraz 20,0 g chlorku sodu (NaCl), dopełnić do 1 000 ml.

4.3. Roztwór buforowy do rozcieńczania zabarwienia

Rozcieńczyć wodą 10 ml roztworu buforowego do wywoływania zabarwienia (4.2) do 100 ml.

4.4. Substrat roztworu buforowego

Rozpuścić 0,1 g odwodnionego niezawierającego fenolu fenylofosforanu disodowego w 100 ml roztworu buforowego (4.1.3) bądź rozpuścić 0,5 g fenylofosforanu dwusodowego w 4,5 ml roztworu buforowego do wywoływania zabarwienia (4.2), dodać dwie krople roztworu BQC (4.6) i pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej. Ekstrahować tak utworzony barwnik za pomocą 2,5 ml butanolu-1 i pozostawić do oddzielenia się butanolu-1. Usunąć i odrzucić butanol-1. W razie potrzeby powtórzyć ekstrakcję.

Roztwór można przechowywać przez kilka dni w lodówce; przed użyciem wywołać zabarwienie i ponownie ekstrahować. Bezpośrednio przed użyciem przygotować substrat roztworu buforowego przez rozcieńczenie 1 ml tego roztworu do 100 ml, stosując do tego roztwór buforowy wodorotlenku boranu baru (4.1.3.).

4.5. Odczynnik strącający cynkowo-miedziowy

Rozpuścić 3,0 g siarczany cynku ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) i 0,6 g siarczany miedzi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w wodzie i dopełnić do 100 ml.

4.6. Roztwór 2,6-dibromochinonochlorimidu (roztwór BQC)

Rozpuścić 40 g $\pm$ 1 mg 2,6-dibromochinonochlorimidu (BQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) w 10 ml 96 % (v/v) etanolu.

Przechowywać w lodówce w ciemnej butelce. Odrzucić w przypadku odbarwienia lub po upływie jednego miesiąca.

4.7. *Roztwór siarczanu miedzi (II)*

Rozpuścić 0,05 g siarczanu miedzi (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w wodzie i dopełnić do 100 ml.

4.8. *Wzorcowe roztwory fenolu*

4.8.1. Odważyć 200 ± 2 mg czystego bezwodnego fenolu, przenieść do 100–ml kolby objętościowej, dodać wody, wymieszać i uzupełnić do kreski. Ten roztwór podstawowy zachowuje w lodówce trwałość przez kilka miesięcy.

4.8.2. Rozcieńczyć wodą 10 ml roztworu podstawowego do 100 ml i wymieszać. 1 ml zawiera 200 µg fenolu.

5. **Aparatura i szkło laboratoryjne**

Uwagi:

- a) Całe szkło laboratoryjne, korki i narzędzia do pobierania próbek muszą być dokładnie oczyszczone. Zaleca się spłukanie ich świeżo zagotowaną wodą destylowaną lub poddanie ich działaniu pary.
- b) Niektóre rodzaje korków plastikowych mogą powodować zanieczyszczenia fenolowe i nie dopuszcza się ich stosowania.

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

- 5.1. *Waga analityczna*
- 5.2. *Łaźnia wodna, umożliwiająca utrzymanie temperatury 37 ± 1 °C.*
- 5.3. *Spektrofotometr umożliwiający odczyty na długości fal 610 nm.*
- 5.4. *Probówki do badań, 16 lub 18 mm x 150 mm, najlepiej wyskalowane na 5 i 10 ml.*
- 5.5. *Pipety*
- 5.6. *Lejki szklane odpowiednich rozmiarów, np. o średnicy 5 cm.*
- 5.7. *Karbowane sączki o średnicy co najmniej 9 cm i średniej prędkości filtrowania.*
- 5.8. *Kolby objętościowe do przygotowania roztworów wzorcowych.*

6. **Procedura**

Uwagi:

- a) Podczas oznaczania unikać bezpośredniego działania promieni słonecznych.
- b) Unikać śladowych zanieczyszczeń śliną lub oddechem, ponieważ może to powodować błędne wyniki pozytywne. W tym aspekcie przykładana jest szczególna uwaga procedurze pipetowania.

6.1. *Przygotowanie próbki do badań*

6.1.1. Analizę wykonywać bezpośrednio po pobraniu próbek. W przeciwnym razie próbkę należy przechowywać w lodówce, jednak nie dłużej niż dwa dni.

6.2. *Porcja do badania*

Odmierzyć pipetą do dwóch probówek (5.4) po 1 ml próbki do badań, używając jednej probówki jako próby kontrolnej lub ślepej.

6.3. *Oznaczanie*

6.3.1. Ogrzewać próbę ślepą przez dwie minuty w gotującej się wodzie; przykryć probówkę do badań oraz zlewkę z gotującą wodą folią aluminiową, aby zapewnić ogrzanie całej probówki. Schłodzić szybko do temperatury pokojowej.

6.3.2. Przez cały czas trwania badania postępować z próbą ślepą i badaną próbką w podobny sposób. Dodać 10 ml substratu roztworu buforowego (4.4) i wymieszać.

- 6.3.3. Natychmiast zanurzyć próbki na 60 minut w łaźni wodnej (5.2), mieszając od czasu do czasu zawartość (minimum czterokrotnie).
- 6.3.4. Ogrzewać w gotującej wodzie przez dwie minuty w ten sam sposób, jak podano w 6.3.1. Schłodzić szybko do temperatury pokojowej.
- 6.3.5. Dodać 1 ml odczynnika strącającego cynkowo-miedziowego (4.5) do każdej próbki i dokładnie wymieszać.
- 6.3.6. Przefiltrować przez suchą bibułę filtracyjną, odrzucić pierwsze 2 ml; w razie potrzeby przefiltrować ponownie, aż do uzyskania całkowicie klarownego przesącza, po czym umieścić 5 ml w próbówce do badań.
- 6.3.7. Dodać 5 ml roztworu buforowego do wywoływania zabarwienia (4.2).
- 6.3.8. Dodać 0,1 ml roztworu BQC (4.6), wymieszać i pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej w celu wywoływania zabarwienia.
- 6.3.9. Za pomocą spektrofotometru (5.3) na długości fali 610 nm dokonać pomiaru wartości absorpcji w porównaniu z próbą kontrolną lub ślepą.
- 6.3.10. Powtórzyć oznaczanie z odpowiednim rozcieńczeniem próbki, jeśli wartość absorpcji mierzonej zgodnie z 6.3.9 jest większa od absorpcji wzorca zawierającego 20 µg fenolu na próbówkę, mierzonej zgodnie z 6.4.4. Przygotować ten roztwór, mieszając jedną objętość badanej próbki z odpowiednią objętością części tej samej próbki ogrzanej dokładnie do temperatury wrzenia, w celu dezaktywacji fosfatazy.
- 6.4. *Opracowanie krzywej odwzorowania*
- 6.4.1. Przygotować odpowiedni zakres rozcieńczonych wzorców, poczynawszy od fenolu wzorcowego (4.8.2), zawierające 0 (próba kontrolna lub ślepa), 2, 5, 10 i 20 µg fenolu na mililitr, oraz dodać pipetą odpowiednio 1 ml wody oraz 1 ml czterech wzorcowych roztworów fenolu do każdej z pięciu próbek.
- 6.4.2. Dodać do każdej próbki 1 ml roztworu siarczany miedzi (II) (4.7), 5 ml roztworu buforowego do wywoływania zabarwienia (4.3), 3 ml wody oraz 0,1 ml roztworu BQC (4.6); wymieszać.
- 6.4.3. Pozostawić na 30 minut w temperaturze pokojowej w celu wywołania zabarwienia.
- 6.4.4. Za pomocą spektrofotometru przy długości fali 610 nm (5.3) dokonać pomiaru wartości absorpcji w porównaniu z próbą kontrolną lub ślepą.
- 6.4.5. Na podstawie wartości absorpcji (6.4.4) uzyskanych dla każdej dodanej ilości fenolu (6.4.1) obliczyć metodą najmniejszych kwadratów linię regresji.
7. **Formułowanie wyników**
- 7.1. *Obliczanie i wzór*
- 7.1.1. Za pomocą uzyskanej (6.4.5) linii regresji obliczyć z odczytu absorpcji (6.3.9) ilość fenolu.
- 7.1.2. W oparciu o poniższy wzór obliczyć aktywność fosfatazy wyrażoną w mikrogramach fenolu na mililitr pasteryzowanego mleka:
- $$\text{Aktywność fosfatazy} = 2,4 \times A \times D$$
- gdzie:
- A to ilość fenolu w mikrogramach uzyskana zgodnie z 7.1.1;
- D to współczynnik rozcieńczenia zgodnie z 6.3.10 (w przypadku braku rozcieńczenia D = 1);
- Współczynnik 2,4 jest to współczynnik rozcieńczenia (5/12 z 1 ml badanej próbki) — Patrz 6.2 w związku z 6.3.2, 6.3.5 i 6.3.6.
- 7.2. *Dokładność*
- 7.2.1. Powtarzalność (r): 2 µg fenolu/ml.
- 7.2.2. Odtwarzalność (R): 3 (wstępnie) µg fenolu/ml.
- 7.2.3. Jeśli rozcieńczenie wykonywane jest zgodnie z 6.3.10, do wyników uzyskanych na rozcieńczonej próbce odnosi się limit wymieniony w 7.2.1 oraz 7.2.2.

III. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PEROKSYDAZY

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę oznaczania obecności lub nieobecności enzymu peroksydazy w mleku, jako kontroli pasteryzacji.

2. Definicja

Pozytywna reakcja na peroksydazę:

Jeśli mleko jest właściwie pasteryzowane, w ciągu 30 sekund po wymieszaniu pojawi się niebieskie zabarwienie.

Negatywna reakcja na peroksydazę:

W ciągu 30 sekund po wymieszaniu nie pojawi się zabarwienie.

3. Zasada

Enzym peroksydazy rozkłada nadtlenek wodoru. Uwolniony tlen atomowy utlenia bezbarwną 1,4-fenylendiaminę do purpurowego indofenolu (test skrobiowy). Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia enzymu.

4. Odczynniki

4.1. Roztwór 1,4-fenylendiaminy

Rozpuścić 2 g 1,4-fenylendiaminy ($C_6H_8N_2$) w ciepłej (50 °C) wodzie i dopełnić do objętości 100 ml. Trzymać roztwór w butelce z ciemnobrązowego szkła z korkiem szklanym oraz przechowywać w chłodnym i ciemnym miejscu. W ciągu jednego lub dwóch dni po przygotowaniu roztwór 1,4-fenylendwaminy tworzy osad: który musi zostać odrzucony.

4.2. Roztwór nadtlenu wodoru

Rozpuścić 9 ml 30 % nadtlenu wodoru w wodzie i dopełnić do objętości 100 ml. W celu stabilizacji dodać 1 ml stężonego kwasu siarkowego na litr roztworu.

Roztwór nadtlenu wodoru jest trwały przez okres jednego miesiąca, jeśli jest przechowywany w chłodnym, ciemnym miejscu, w butelce ze szklanym korkiem, co chroni go przed kontaktem ze związkami organicznymi.

5. Procedura

5.1. Umieścić 5 ml próbki mleka w czystej probówce z odpowiednim zamknięciem.

5.2. Dodać 5 ml roztworu 1,4-fenylendiaminy (4.1).

5.3. Dodać 2 krople roztworu nadtlenu wodoru (4.2).

5.4. Obserwować powstawanie zabarwienia w ciągu 30 sekund po wymieszaniu. Wystąpienie niebieskiego zabarwienia później niż w 30 sekund po dodaniu odczynników oznacza, że reakcja jest niespecyficzna.

IV. WYLICZANIE MIKROORGANIZMÓW — METODĄ PŁYTKOWĄ W TEMPERATURZE 30 °C

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę oznaczania mikroorganizmów za pomocą techniki obliczania liczby kolonii w temperaturze 30 °C. Procedura ma zastosowanie do mleka surowego i pasteryzowanego, a także do mleka poddanego sterylizacji UHT, przez 15 dni, inkubowanego wstępnie w temperaturze 30 °C.

2. Definicja

Określenie „mikroorganizmy” oznacza organizmy, które podczas tlenowej inkubacji w cieplarni w określonych warunkach tworzą policzalne kolonie.

3. Zasada

Określoną objętość próbki mleka miesza się na płytkach Petriego z pożywką, oraz inkubuje przez 72 godziny w temperaturze 30 °C. Zlicza się kolonie, po czym liczy się ilość mikroorganizmów na 1 ml mleka surowego lub pasteryzowanego bądź na 0,1 ml wstępnie inkubowanego mleka poddanego sterylizacji UHT.

4. Aparatura i szkło laboratoryjne

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

4.1. Przyrządy

- 4.1.1. Piec z gorącym powietrzem, umożliwiający pracę w temperaturze 170—175 °C.
- 4.1.2. Autoklaw, umożliwiający pracę w temperaturze 121 ± 1 °C.
- 4.1.3. Inkubator, umożliwiający utrzymanie temperatury 30 ± 1 °C w każdym miejscu jego wnętrza.
- 4.1.4. pH-metr, z kompensacją temperatury i dokładnością do $\pm 0,1$ jednostki pH.
- 4.1.5. Łaźnia wodna, umożliwiająca pracę w temperaturze 45 ± 1 °C.
- 4.1.6. Soczewka, powiększenie 2—4x.
- 4.1.7. Soczewka, powiększenie 8—10x.
- 4.1.8. Licznik sumujący
- 4.1.9. Mikser umożliwiający mieszanie 1 ml próbki mleka lub rozcieńczanie dziesiętne z 9 ml rozcieńczalnika oraz działający na zasadzie mimośrodowego obracania zawartości próbówki.

4.2. Szkło laboratoryjne

- 4.2.1. Probówki z odpowiednim zamknięciem, które posiadają dostateczną pojemność, aby pomieścić, z odpowiednio dużą przestrzenią do mieszania, 10 ml rozcieńczenia podstawowego lub kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych.
- 4.2.2. Kolby o pojemności 150—250 ml lub probówki o pojemności około 20 ml, do przechowywania pożywki hodowlanej.
- 4.2.3. Pipety (zatkane watą) ze szkła lub sterylne materiały syntetyczne z nieuszkodzoną końcówką, o nominalnej pojemności 1 ml, posiadające wylot o średnicy 1,75—3 mm.
- 4.2.4. Płytki Petriego z czystego, bezbarwnego szkła lub sterylne materiały syntetyczne, dolna płytka o średnicy wewnętrznej około 90—100 mm. Wewnętrzna grubość powinna wynosić minimum 10 mm. Dno nie powinno mieć żadnych nieregularności, które utrudniałyby zliczanie kolonii.
- 4.2.5. Sterylizacja szkła laboratoryjnego:
Szkło laboratoryjne powinno być sterylizowane w jeden z podanych niżej sposobów:
 - a) poprzez utrzymywanie co najmniej przez godzinę w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1) w temperaturze 170—175 °C;
 - b) poprzez utrzymywanie co najmniej przez 20 minut w autoklawie (4.1.2) w temperaturze 121 ± 1 °C.

W przypadku autoklawu należy zapewnić właściwą penetrację pary — np. jeśli sprzęt jest sterylizowany w pojemnikach, nie należy ich szczelnie zamykać, kolby powinny mieć luźno umocowane pokrywy.

Szkło sterylizowane w autoklawie należy osuszyć poprzez odparowanie.

Pipety należy wyjaławiać w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1).

5. Pożywka hodowlana — agar do badania liczby płytek mleka

5.1. Skład:

Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glukoza D (+) lub dekstroza	1,0 g
Odtłuszczone mleko w proszku	1,0 g
Agar	10—15 g, zależnie od właściwości żelujących użytego agaru
Woda	1 000 ml

Odtłuszczone mleko w proszku nie zawiera substancji hamujących. Należy sprawdzić to za pomocą badań porównawczych przy użyciu odtłuszczonego mleka w proszku, o którym wiadomo, że nie zawiera substancji hamujących.

Przygotowanie:

Utworzyć zawiesinę i rozpuszczać w wodzie składniki w następującej kolejności: ekstrakt drożdżowy, trypton, glukoza i na końcu odtłuszczone mleko w proszku. Podgrzanie zawiesiny ułatwi tę procedurę. Dodać agar i podgrzać do wrzenia, mieszając przez cały czas aż do całkowitego rozpuszczenia agaru, ewentualnie parować przez około 30 minut.

W razie potrzeby przefiltrować przez bibułę filtracyjną.

Za pomocą pH-metru sprawdzić pH (4.1.4); jeśli trzeba — stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $6,9 \pm 0,1$ w temperaturze 25 °C.

5.2. Rozdzielenie, sterylizacja i przechowywanie pożywki hodowlanej

Podzielić pożywkę (5.1) na porcje: po 100–150 ml w kolbach lub 12–15 ml w probówkach (4.2.2). Zakorkować kolby i probówki.

Sterylizować w autoklawie (4.1.2) przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C.

Sprawdzić pH pożywki.

Jeśli rozcieńczalnik nie jest przeznaczony do natychmiastowego użytku, przechowywać go nie dłużej niż miesiąc od chwili przygotowania, w ciemnym miejscu i temperaturze 1–5 °C.

5.3. Handlowa odwodniona pożywka hodowlana

Pożywka hodowlana (5.1) może być przygotowywana z odwodnionej pożywki handlowej. Należy kierować się wskazówkami producenta, dodając jednak przed rozpuszczeniem pożywki odtłuszczone mleko w proszku, jeśli nie znajduje się ono w jej składzie.

Wyregulować pH na $6,9 \pm 0,1$ w temperaturze 25 °C w sposób opisany w 5.1, po czym rozdzielić, sterylizować i przechowywać pożywkę zgodnie z 5.2.

6. Rozcieńczalniki

6.1. Roztwór soli/peptonu

Skład:

Pepton	1,0 g
Chlorek sodu (NaCl)	8,5 g
Woda	1 000 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki w wodzie, podgrzewając w miarę potrzeby.

Za pomocą pH-metru (4.1.4) sprawdzić pH; jeśli trzeba, stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,0 \pm 0,1$ w temperaturze 25 °C.

- 6.2. *Rozdzielenie, sterylizacja i przechowywanie rozcieńczalników*
- Rozdzielić rozcieńczalnik (6.1) do probówek (4.2.1) w takich ilościach, aby po sterylizacji w każdej probówce znajdowało się $9,0 \pm 0,2$ ml rozcieńczalnika. Zakorkować probówki.
- Steryliżować w autoklawie (4.1.2) przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C.
- Sprawdzić pH rozcieńczalnika.
- Jeśli rozcieńczalnik nie jest przeznaczony do natychmiastowego użytku, przechowywać go nie dłużej niż miesiąc od chwili przygotowania, w ciemnym miejscu i w temperaturze 1-5 °C.
- 6.3. *Handlowe rozcieńczalniki odwodnione*
- Rozcieńczalnik (6.1) można przygotować z odwodnionych tabletek lub proszków znajdujących się w handlu. Należy kierować się wskazówkami producenta. Wyregulować pH w sposób opisany w 6.1; rozdzielić, sterylizować i przechowywać rozcieńczalniki zgodnie z 6.2.
7. **Procedura**
- 7.1. *Topienie pożywki*
- Przed rozpoczęciem badania mikrobiologicznego stopić szybko wymaganą ilość pożywki oraz odpuścić ją do 45 ± 1 °C w łaźni wodnej (4.1.5).
- 7.2. *Przygotowanie próbki mleka*
- Szybko odwracając 25-krotnie pojemnik z mlekiem, wymieszać dokładnie próbkę mleka tak, aby w miarę możliwości rozprowadzić równomiernie mikroorganizmy. Należy unikać tworzenia się piany lub pozostawić do rozproszenia się piany. Odstęp czasu między mieszaniem a pobieraniem porcji do badań nie powinien przekraczać trzech minut.
- 7.3. *Przygotowanie rozcieńczenia podstawowego (10⁻¹) (mleko surowe i pasteryzowane)*
- Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml próbki (7.2) mleka surowego lub pasteryzowanego do 9 ml rozcieńczalnika (6.1), unikając kontaktu pipety z rozcieńczalnikiem. Temperatura rozcieńczalnika powinna być w przybliżeniu taka sama jak temperatura próbki mleka. Wymieszać dokładnie ten podstawowy rozcieńczony roztwór w mikserze (4.1.9) przez 5-10 sekund.
- W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie podstawowe 10^{-1} .
- 7.4. *Przygotowanie kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych (mleko surowe i pasteryzowane)*
- Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml podstawowego roztworu (7.3) do 9 ml rozcieńczalnika (6.1), zgodnie z instrukcjami w pkt 7.3.
- W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 10^{-2} .
- Powtarzać powyższe czynności w celu uzyskania kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych, aż do momentu uzyskania odpowiedniej liczby spodziewanych mikroorganizmów (8.1.1).
- 7.5. *Posiew na płytkach Petriego*
- 7.5.1. Mleko surowe: Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml próbki i/lub odpowiednie dziesiętne rozcieńczenie na płytkę (4.2.4). Należy zbadać co najmniej dwa rozcieńczenia. Przygotować jedną płytkę z każdego wybranego rozcieńczenia zgodnie z (8.1.1).
- 7.5.2. Mleko pasteryzowane: Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml próbki i/lub odpowiednie dziesiętne rozcieńczenie na płytkę (4.2.4). Należy zbadać co najmniej dwa rozcieńczenia. Przygotować dwie płytki z każdego wybranego rozcieńczenia zgodnie z (8.1.1).
- 7.5.3. Mleko poddane sterylizacji UHT (badane po 15 dniach inkubacji w temperaturze 30 °C — dyrektywa 85/397/EWG, załącznik A, rozdział VII, pkt 5):
- Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 0,1 ml próbki mleka (7.2) na płytkę (4.2.4). Przygotować dwie płytki.

7.6. *Aplikowanie pożywki*

Wlać około 15—18 ml pożywki (7.1) na każdą płytkę z posiewem.

Wymieszać bezpośrednio po wleciu poprzez obracanie płytką Petriego tak, aby uzyskać równomierne rozproszenie kolonii po inkubacji.

Odstęp czasu między zakończeniem przygotowania próbki mleka a mieszaniem, w zależności od rodzaju mleka, porcji badanej lub rozcieńczenia z pożywką nie powinien przekraczać 15 minut.

Pozostawić do zestalenia się na czystej i chłodnej płaskiej powierzchni.

7.7. *Inkubacja płytek Petriego*

Przenieść płytki do inkubatora (4.1.3). Inkubować odwrócone płytki. Nie ustawiać więcej niż sześciu płytek na sobie. Płytki w stosie powinny być oddzielone jedna od drugiej; należy je również oddzielić od ścian bocznych i górnej inkubatora.

Inkubować przez 72 ± 2 godziny w temperaturze 30 ± 1 °C.

7.8. *Zliczanie kolonii*

Zliczyć kolonie na płytkach Petriego zawierających nie więcej niż 300 kolonii.

Zbadać płytki w przytłumionym świetle. W celu ułatwienia zliczania można posłużyć się odpowiednią soczewką (4.1.6) i/lub licznikiem sumującym (4.1.8). Unikać pomyłkowego zaliczania cząsteczek strąconej substancji na płytkach jako kolonii mikroorganizmów. Zbadać dokładnie wątpliwe obiekty przy użyciu soczewki o większym powiększeniu (4.1.7), aby rozróżnić kolonie od ciała obcego.

Rozrastające się kolonie należy uważać za kolonie pojedyncze. Jeśli mniej niż jedna czwarta płytki jest porośnięta koloniami rozrastającymi się, należy zliczyć kolonie na pozostałej części płytki oraz odpowiednio wyliczyć ich liczbę dla całej płytki. Jeśli więcej niż jedna czwarta płytki porośnięta jest koloniami rozrastającymi się, odrzucić płytkę.

8. **Obliczanie i formułowanie wyników**8.1. *Mleko surowe i pasteryzowane*

8.1.1. Wykorzystać obliczenia z wszystkich płytek zawierających 10—300 kolonii (patrz 8.1.3 oraz 8.1.4).

8.1.2. Liczbę mikroorganizmów na 1 ml mleka surowego lub pasteryzowanego oblicza się według wzoru:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

gdzie:

$\sum C$ to suma zliczonych kolonii zgodnie z 8.1.1;

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ jest równe objętości posianej próbki, przy czym:

n_1 to liczba płytek zliczanych dla pierwszego rozcieńczenia;

n_2 to liczba płytek zliczanych dla drugiego rozcieńczenia;

d to współczynnik rozcieńczenia, z którego uzyskano pierwsze obliczenie;

Obliczenie podane jest z dokładnością do dwóch cyfr znaczących. Jeśli cyfrą zaokrąglaną jest pięć, należy zaokrąglić obliczenie tak, aby sąsiednia cyfra po lewej stronie była parzysta.

Przykład (mleko pasteryzowane):

Rozcieńczenie 10^{-2} : 278 i 290 kolonii

Rozcieńczenie 10^{-3} : 33 i 28 kolonii

$$\begin{aligned} \text{Liczba/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28590 \\ &= 29000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

- 8.1.3. Jeśli w obliczeniu występują jedynie liczby mniejsze od 10, należy podać w sprawozdaniu liczbę mikroorganizmów na mililitr jako „mniej niż 10 x d na ml”, przy „d” będącym odwrotnością najniższego współczynnika rozcieńczenia.
- 8.1.4. Jeśli występują jedynie liczby większe niż 300 kolonii, ale ich zliczenie jest możliwe, obliczyć przybliżoną liczbę i pomnożyć przez odwrotność współczynnika rozcieńczenia. Podać w sprawozdaniu wynik jako „przybliżona liczba drobnoustrojów na ml”.
- 8.2. *Mleko poddane sterylizacji UHT*
Uznaje się, że liczby ponad 10 kolonii na 0,1 ml nie spełnia już wymogów dyrektywy 85/397/EWG.
9. **Dokładność**
Brak jest dotąd zaakceptowanych wyników międzynarodowych badań zespołowych.

V. WYLICZANIE MIKROORGANIZMÓW — METODĄ PŁYTKOWĄ W TEMPERATURZE 21 °C

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę wyliczania mikroorganizmów za pomocą techniki zliczania kolonii w temperaturze 21 °C w mleku pasteryzowanym poddanym inkubacji w temp. 6 °C przez pięć dni; w celu oznaczenia stopnia zanieczyszczenia mleka pasteryzowanego mikroorganizmami psychofilnymi zdolnymi do rozmnażania w mleku o temperaturze 6 °C.

2. Definicja

Określenie „mikroorganizmy” oznacza organizmy, które podczas tlenowej inkubacji w cieplarni na warunkach tu opisanych tworzą przeliczalne kolonie.

3. Zasada

Mleko pasteryzowane inkubowane jest w temperaturze 6 °C przez pięć dni. Określoną objętość próbki mleka miesza się na płytkach Petriego z pożywką hodowlaną i inkubuje przez 25 godzin w cieplarni w temperaturze 21 °C. Zlicza się kolonie, po czym oblicza się liczbę mikroorganizmów na 1 ml mleka pasteryzowanego.

4. Aparatura i szkło laboratoryjne

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

4.1. Przyrządy

- 4.1.1. Piec z gorącym powietrzem, umożliwiający pracę w temperaturze 170—175 °C.
- 4.1.2. Autoklaw umożliwiający pracę w temperaturze 121 ± 1 °C.
- 4.1.3. Inkubator umożliwiający utrzymanie w każdym punkcie wewnątrz temperatury:
 - a) $6 \pm 0,2$ °C
 - b) 21 ± 1 °C
- 4.1.4. pH-metr, z kompensacją temperatury i dokładnością do $\pm 0,1$ jednostki pH.
- 4.1.5. Łaźnia wodna, umożliwiająca pracę w temperaturze 45 ± 1 °C.
- 4.1.6. Soczewka, powiększenie 2—4x.
- 4.1.7. Soczewka, powiększenie 8—10x.
- 4.1.8. Licznik sumujący
- 4.1.9. Mikser umożliwiający mieszanie 1 ml próbki mleka lub rozcieńczanie dziesiętne z 9 ml rozcieńczalnika oraz działający na zasadzie mimośrodowego obracania zawartością próbki.

4.2. Szkło laboratoryjne

- 4.2.1. Probówki z odpowiednim zamknięciem, które posiadają dostateczną pojemność, aby pomieścić, z pozostawieniem odpowiednio dużej przestrzeni do mieszania, 10 ml rozcieńczenia podstawowego lub dalszych rozcieńczeń dziesiętnych.
- 4.2.2. Kolby o pojemności od 150 do 250 ml lub probówki o pojemności około 20 ml, do trzymania pożywki hodowlanej.
- 4.2.3. Pipety (zatykane watą) ze szkła lub sterylnej tworzywa sztucznego z nieuszkodzoną końcówką, o nominalnej pojemności 1 ml, posiadające wylot o średnicy 1,75-3 mm.
- 4.2.4. Płytki Petriego z czystego, bezbarwnego szkła lub sterylnej tworzywa sztucznego, dolna płytka o średnicy wewnętrznej około 90—100 mm. Wewnętrzna grubość powinna wynosić minimum 10 mm. Dno nie ma żadnych nieregularności, które utrudniałyby zliczanie kolonii.

4.2.5. Sterylizacja szkła laboratoryjnego

Szkło laboratoryjne wysterylizować się w jeden z podanych niżej sposobów:

- a) poprzez utrzymywanie co najmniej przez godzinę w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1) w temperaturze od 170 do 175 °C.
- b) poprzez utrzymywanie co najmniej przez 20 minut w autoklawie (4.1.2) w temperaturze 121 ± 1 °C.

W przypadku autoklawu należy zapewnić właściwą penetrację pary, np. jeśli sprzęt sterylizuje się w pojemnikach, nie należy ich ściśle zamykać, kolby powinny mieć luźno umocowane pokrywy.

Szkło sterylizowane w autoklawie należy osuszyć poprzez odparowanie.

Pipety należy sterylizować w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1).

5. Pożywka hodowlana — agar do badania liczby płytek mleka

5.1. Skład:

Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glukoza D (+) lub dekstroza	1,0 g
Odtłuszczone mleko w proszku	1,0 g
Agar	10—15 g, zależnie od właściwości żelujących użytego agaru
Woda	1 000 ml

Odtłuszczone mleko w proszku nie powinno zawierać substancji hamujących. Należy sprawdzić to za pomocą badań porównawczych przy użyciu odtłuszczonego mleka w proszku, o którym wiadomo, że nie zawiera substancji hamujących.

Przygotowanie:

Utworzyć zawiesinę i rozpuszczać w wodzie składniki w następującej kolejności: ekstrakt drożdżowy, trypton, glukoza i na końcu odtłuszczone mleko w proszku. Podgrzanie zawiesiny ułatwi tę procedurę. Dodać agar i doprowadzić do wrzenia, mieszając przez cały czas aż do całkowitego rozpuszczenia agaru, ewentualnie, parować przez około 30 minut.

W razie potrzeby przefiltrować przez bibułę filtracyjną.

Za pomocą pH-metru sprawdzić pH (4.1.4); w razie potrzeby stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $6,9 \pm 0,1$ w temperaturze 25 °C.

5.2. Rozdzielenie, sterylizowanie, przechowywanie pożywki hodowlanej

Podzielić pożywkę (5.1) na porcje: po 100—150 ml w kolbach lub 12—15 ml w probówkach (4.2.2). Zakorkować kolby i probówki.

Sterylizować w autoklawie (4.1.2) przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C.

Sprawdzić pH pożywki.

Jeśli pożywka nie jest przeznaczona do natychmiastowego użytku, przechowywać ją nie dłużej niż miesiąc po przygotowaniu, w ciemnym miejscu w temperaturze 1—5 °C.

5.3. Handlowa odwodniona pożywka hodowlana

Pożywkę hodowlaną (5.1) można przygotować z odwodnionej pożywki dostępnej w handlu. Należy kierować się wskazówkami producenta, dodając jednak przed rozpuszczeniem pożywki odtłuszczone mleko w proszku, jeśli nie znajduje się ono w jej składzie.

Dostosować pH do $6,9 \pm 0,1$ w 25 stopni C jak w 5.1 i dawkować, sterylizować i przechowywać pożywkę podobnie jak w 5.2

6. Rozcieńczalniki

6.1. Roztwór soli/peptonu

Skład:

Pepton	1,0 g
Chlorek sodu (NaCl)	8,5 g
Woda	1 000 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki w wodzie, podgrzewając w miarę potrzeby.

Za pomocą pH-metru (4.1.4) sprawdzić pH; w miarę potrzeby, stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,0 \pm 0,1$ w temperaturze 25 °C.

6.2. Rozdzielenie, sterylizowanie i przechowywanie rozcieńczalników

Rozdzielić rozcieńczalnik (6.1) do probówek (4.2.1) w takich ilościach, aby po sterylizacji w każdej probówce było $9,0 \pm 0,2$ ml rozcieńczalnika. Zakorkować probówki.

Steryliżować w autoklawie (4.1.2) przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C. Sprawdzić pH rozcieńczalnika.

Jeśli rozcieńczalnik nie jest przeznaczony do natychmiastowego użytku, można przechowywać go nie dłużej niż miesiąc od chwili przygotowania, w ciemnym miejscu i temperaturze 1—5 °C.

6.3. Handlowe rozcieńczalniki odwodnione

Rozcieńczalnik (6.1) można przygotować z odwodnionych tabletek lub proszków znajdujących się w handlu. Należy kierować się wskazówkami producenta. Wyregulować pH w sposób opisany w 6.1; rozdzielić, sterylizować i przechowywać rozcieńczalniki zgodnie z 6.2.

7. Procedura**7.1. Topienie pożywki**

Przed rozpoczęciem badania mikrobiologicznego stopić szybko wymaganą ilość pożywki oraz odpuścić ją do 45 ± 1 °C w łaźni wodnej (4.1.5).

7.2. Przygotowanie próbki mleka

7.2.1. Inkubować zamknięte opakowanie mleka pasteryzowanego bądź, jeśli jest to niemożliwe, inkubować w cieplarni (4.1.3a)) reprezentatywną próbkę nie mniejszą niż 100 ml przez 120 ± 2 godziny w temperaturze $6 \pm 0,5$ °C.

7.2.2. Po inkubacji, szybko odwracając pojemnik z próbką 25 razy, wymieszać dokładnie próbkę mleka tak, aby w miarę możliwości równomiernie rozprowadzić drobnoustroje. Należy unikać tworzenia się piany lub pozostawić pianę do rozproszenia się. Odstęp czasu między mieszaniem a pobraniem porcji do badania nie powinien przekraczać trzech minut.

7.3. Przygotowanie rozcieńczenia podstawowego (10^{-1})

Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml próbki (7.2) do 9 ml rozcieńczalnika (6.1) unikając kontaktu pipety z rozcieńczalnikiem. Temperatura rozcieńczalnika jest w przybliżeniu taka sama jak temperatura próbki mleka. Wymieszać dokładnie ten podstawowy roztwór rozcieńczony w mikserze (4.1.9) przez 5—10 sekund.

W ten sposób otrzymuje się pierwsze rozcieńczenie 10^{-1} .

7.4. Przygotowanie kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych

Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml podstawowego roztworu rozcieńczonego (7.3) do 9 ml rozcieńczalnika (6.1), zgodnie z instrukcjami w 7.3.

W ten sposób otrzymuje się rozcieńczenie 10^{-2} .

Powtarzać powyższe czynności w celu wykonania kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych aż do momentu uzyskania odpowiedniej liczby spodziewanych mikroorganizmów (8.1.1).

7.5. Posiew na płytkach Petriego

Za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) przenieść 1 ml próbki i/lub odpowiednie rozcieńczenie dziesiętne na płytkę (4.2.4). Należy zbadać co najmniej dwa rozcieńczenia. Przygotować dwie płytki z każdego wybranego rozcieńczenia zgodnie z (8.1).

7.6. Aplikowanie pożywki

Wlać około 15—18 ml pożywki (7.1) na każdą płytkę z posiewem.

Wymieszać bezpośrednio po wlewie poprzez obracanie płytką Petriego tak, aby uzyskać równomierne rozprowadzenie kolonii po inkubacji.

Odstęp czasu między zakończeniem przygotowania próbki mleka a mieszaniem, rozcieńczeniem z pożywką, nie przekracza 15 minut.

Pozostawić do zestalenia się na czystej i chłodnej płaskiej powierzchni.

- 7.7. **Inkubacja płytek Petriego**
Przenieść płytki do inkubatora (4.1.3b)). Inkubować odwrócone płytki. Nie ustawiać więcej niż sześciu płytek na sobie. Płytki w stosie powinny być oddzielone jedna od drugiej; należy je również oddzielić od ścian bocznych i górnej inkubatora.
Inkubować przez 25 godzin w temperaturze 21 ± 1 °C.
- 7.8. **Zliczanie kolonii**
Zliczyć kolonie na płytkach Petriego zawierających nie więcej niż 300 kolonii.
Zbadać płytki w przytłumionym świetle. W celu ułatwienia obliczania można posłużyć się odpowiednią soczewką (4.1.6) i/lub licznikiem sumującym (4.1.8). Unikać pomyłkowego zaliczania cząsteczek strąconej substancji na płytkach jako kolonii. Jeśli potrzeba, zbadać dokładnie wątpliwe obiekty przy użyciu soczewki o większym powiększeniu (4.1.7), aby odróżnić kolonie od ciała obcego.
Rozrastające się kolonie uważa się za kolonie pojedyncze. Jeśli mniej niż jedna czwarta płytki jest porośnięta koloniami rozrastającymi się, należy zliczyć kolonie na pozostałej części płytki oraz odpowiednio wyliczyć ich liczbę dla całej płytki. Jeśli więcej niż jedna czwarta płytki porośnięta jest koloniami rozrastającymi się, należy odrzucić płytkę.
8. **Obliczanie i formułowanie wyników**
- 8.1. Wykorzystać obliczenia z wszystkich płytek zawierających 10-300 kolonii (patrz 8.3 oraz 8.4).
- 8.2. Liczbę mikroorganizmów na 1 ml mleka pasteryzowanego oblicza się według wzoru:

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

gdzie:

ΣC to suma zliczonych kolonii zgodnie z 8.1.1;

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ jest równe objętości posianej próbki, przy czym:

n_1 to liczba płytek zliczanych dla pierwszego rozcieńczenia;

n_2 to liczba płytek zliczanych dla drugiego rozcieńczenia;

d to współczynnik rozcieńczenia, z którego uzyskano pierwsze obliczenie;

Liczba podana jest z dokładnością do dwóch cyfr znaczących. Jeśli cyfrą zaokrąglaną jest pięć, należy zaokrąglić obliczenie tak, aby sąsiednia cyfra po lewej stronie była parzysta.

Przykład:

Rozcieńczenie 10^{-2} : 278 i 290 kolonii

Rozcieńczenie 10^{-3} : 33 i 28 kolonii

$$\begin{aligned} \text{Liczba/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28590 \\ &= 29000 \\ &= 2,9 \times 10^4 \end{aligned}$$

- 8.3. Jeśli występują jedynie liczby mniejsze od 10, należy podać w sprawozdaniu liczbę mikroorganizmów na mililitr jako „mniej niż $10 \times d$ na l”, przy „d” będącym odwrotnością najniższego współczynnika rozcieńczenia.
- 8.4. Jeśli występują jedynie liczby większe niż 300 kolonii, ale ich zliczenie jest możliwe, należy obliczyć przybliżoną liczbę i pomnożyć przez odwrotność współczynnika rozcieńczenia. Podać w sprawozdaniu wynik jako „przybliżona liczba mikroorganizmów na ml”.

9. Dokładność

Brak jest dotąd zaakceptowanych wyników międzynarodowych badań zespołowych.

VI. WYLICZANIE BAKTERII Z GRUPY COLI — LICZBA KOLONII W TEMPERATURZE 30 °C**1. Przedmiot i obszar stosowania**

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę wyliczania drobnoustrojów bakterii z grupy coli w mleku pasteryzowanym za pomocą techniki zliczania kolonii w temperaturze 30 °C.

2. Definicja

Określenie „bakterie z grupy coli” oznacza bakterie, które w opisanych warunkach w temperaturze 30 °C tworzą typowe lub nietypowe kolonie fermentujące laktozę przy równoczesnym wydzielaniu gazu, zgodnie z opisanymi warunkami.

3. Zasada

Określoną objętość próbki mleka miesza się na płytkach Petriego z pożywką hodowlaną i inkubuje przez 24 godziny w cieplarni w temperaturze 30 °C. Zlicza się kolonie typowe; w razie potrzeby potwierdza się tożsamość kolonii nietypowych za pomocą badania ich na zdolność do fermentacji laktozy. Następnie zlicza się ilość bakterii coli na 1 ml mleka pasteryzowanego.

4. Aparatura i szkło laboratoryjne

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

4.1. Przyrządy

4.1.1. Piec z gorącym powietrzem, umożliwiający pracę w temperaturze 170—175 °C.

4.1.2. Autoklaw umożliwiający pracę w temperaturze 121 ± 1 °C.

4.1.3. Ciepłarnia umożliwiająca utrzymanie w każdym miejscu wewnątrz temperatury 30 ± 1 °C.

4.1.4. pH-metr, z kompensacją temperatury i dokładnością do $\pm 0,1$ jednostki pH.

4.1.5. Łaźnia wodna umożliwiająca pracę w temperaturze 45 ± 1 °C.

4.1.6. Igła wykonana z drutu platynowo-irydowego lub niklowo-chromowego.

4.2. Szkło laboratoryjne

4.2.1. Probówki z odpowiednim zamknięciem oraz o pojemności 20 ml, aby pomieścić pożywkę do badania potwierdzającego (5.2); oraz probówki typu Durham'a o odpowiednich wymiarach, aby można je było używać wraz z probówkami.

4.2.2. Kolby o pojemności od 150 do 250 ml lub probówki do trzymania stałej pożywki selektywnej (5.1).

4.2.3. Pipety (zatykane watą) ze szkła lub sterylne materiały syntetyczne z nieuszkodzoną końcówką, o nominalnej pojemności 1—10 ml i posiadające wylot o średnicy 1,75—3 mm.

4.2.4. Płytki Petriego z czystego, bezbarwnego szkła lub sterylne materiały syntetyczne, dolna płytka o średnicy wewnętrznej około 90—100 mm. Wewnętrzna głębokość powinna wynosić minimum 10 mm. Dno nie ma żadnych nieregularności, które utrudniałyby zliczanie kolonii.

4.2.5. Sterylizacja szkła laboratoryjnego:

Szkło laboratoryjne sterylizowane w jeden z podanych niżej sposobów:

a) poprzez utrzymywanie co najmniej przez godzinę w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1) w temperaturze od 170 do 175 °C.

b) poprzez utrzymywanie co najmniej przez 20 minut w autoklawie (4.1.2) w temperaturze 121 ± 1 °C.

W przypadku autoklawu należy zapewnić właściwą penetrację pary, np. jeśli sprzęt sterylizuje się w pojemnikach, nie należy ich szczelnie zamykać, kolby powinny mieć luźno umocowane pokrywy.

Szkło sterylizowane w autoklawie suszone jest poprzez odparowanie.

Pipety sterylizować w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1).

5. **Pożywka hodowlana — agar do badania liczby płytek mleka**

5.1. *Laktozowo—żółciowy agar z fioletem i czerwieni (agar VRBL). Stała pożywka selektywna.*

Skład:

Pepton	7 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Laktoza ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10,0 g
Chlorek sodu (NaCl)	5,0 g
Sole żółciowe	1,5 g
Czerwień obojętna	0,03 g
Fiolet krystaliczny	0,002 g
Agar	10—15 g (zależnie od właściwości żelujących użytego agaru)
Woda	1 000 ml

Przygotowanie:

Utworzyć zawiesinę i rozpuścić w wodzie składniki; pozostawić na kilka minut, po czym energicznie wymieszać.

Za pomocą pH-metru (4.1.4) sprawdzić pH; w miarę potrzeby, stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,4 \pm 0,1$ w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Szybko doprowadzić do wrzenia, poruszając od czasu do czasu, a następnie natychmiast rozdzielić na porcje 100—150 ml do sterylnych kolb (4.2.2). Opuścić pożywkę w łaźni wodnej (4.1.5) w temperaturze $45 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

W czasie użycia należy sprawdzić sterylność pożywki (patrz 6.4).

Użyć pożywkę w ciągu trzech godzin od jej przygotowania.

5.2. *Agar bulionowy z zielenią brylantową, żółcią i laktozą. Pożywka do badania potwierdzającego.*

Skład:

Pepton	10 g
Laktoza ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Odwodniona żółć wołowa	20 g
Zieleń brylantowa	0,0133 g
Woda	1 000 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki w wodzie, przez zagotowanie.

Za pomocą pH-metru (4.1.4) sprawdzić pH i w razie potrzeby, stosując roztwór (co najmniej 0,1 mol/l) wodorotlenku sodu lub kwasu solnego, dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,2 \pm 0,1$ w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Podzielić pożywkę na porcje po 10 ml w probówce (4.2.1) zawierające próbówki typu Durham'a. Zakorkować próbówki.

Sterylizować w autoklawie (4.1.2) przez 15 minut w temperaturze $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po sterylizacji probówek typu Durham'a nie zawierają pęcherzyków powietrza.

Sprawdzić pH pożywki.

Jeśli pożywka nie jest przeznaczona do natychmiastowego użytku, przechowywać ją nie dłużej niż miesiąc po przygotowaniu, w ciemnym miejscu w temperaturze $0\text{—}5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. *Handlowa odwodniona pożywka hodowlana*

Pożywki hodowlane (5.1, 5.2) można przygotować z odwodnionych pożywek dostępnych w handlu. Należy kierować się wskazówkami producenta. Uregulować pH, po czym rozdzielić, zagotować lub sterylizować oraz przechowywać pożywki w sposób opisany w 5.1 i 5.2.

6. **Procedura**

6.1. *Pożywka*

Zastosować pożywkę agar VRBL jak opisano w 5.1.

6.2. *Przygotowanie próbki mleka*

Szybko odwracając pojemnik z próbką 25 razy, wymieszać dokładnie próbkę mleka tak, aby w miarę możliwości równomiernie rozprowadzić mikroorganizmy. Należy unikać tworzenia się piany lub pozostawić pianę do rozproszenia się. Odstęp czasu między mieszaniem a pobraniem porcji do badania nie powinien przekraczać trzech minut.

6.3. *Posiew na płytkach Petriego*

Posiew na 3 ml próbki mleka (6.2) wykonuje się przez przeniesienie za pomocą sterylnej pipety (4.2.3) 1 ml próbki mleka na każdą z trzech płytek (4.2.4).

6.4. *Aplikowanie pożywki*

Wlać agar VRBL (6.1) w ilości około 12 l na każdą płytkę z posiewem.

Wymieszać bezpośrednio po wleciu poprzez obracanie płytką Petriego tak, aby uzyskać równomierne rozprowadzenie kolonii po inkubacji.

Odstęp czasu między zakończeniem przygotowania próbki mleka a mieszaniem porcji badanej z pożywką nie przekracza 15 minut.

Jako próbę kontrolną do celów ustalenia sterylności przygotować płytkę bez posiewu, używając 12 ml agaru VRBL używanego do płytek z posiewem.

Pozostawić do zestalenia się na czystej i chłodnej płaskiej powierzchni.

Po całkowitym zestaleniu się na powierzchnię posianej pożywki wlać co najmniej 4 ml agaru VRBL (6.1).

Pozostawić do zestalenia się.

6.5. *Inkubacja płytek Petriego*

Przenieść płytki do inkubatora (4.1.3). Inkubować odwrócone płytki. Nie ustawiać więcej niż sześciu płytek na sobie. Płytki w stosie powinny być oddzielone jedna od drugiej; należy je również oddzielić od ścian bocznych i górnej inkubatora.

Inkubować przez 24 ± 2 godziny w temperaturze 30 ± 1 °C.

6.6. *Zliczanie kolonii*

6.6.1. Zliczyć kolonie na płytkach Petriego zawierających nie więcej niż 150 kolonii. Zliczać kolonie o zabarwieniu ciemnoczerwonym posiadające średnicę co najmniej 0,5 mm z charakterystycznym dla coli otaczającym osadem lub bez takiego osadu.

6.6.2. Jeśli wszystkie lub niektóre kolonie mają wygląd nietypowy (np. różnią się od typowych kolonii zabarwieniem, wielkością lub tworzeniem osadu), przeprowadza się test potwierdzający (6.7).

6.7. *Test potwierdzający*

Zgodnie ze wskazaniami 6.6.2 wykonać test potwierdzający na odpowiedniej liczbie (np. od trzech do pięciu) nietypowych kolonii, poprzez posiew do probówek, za pomocą igły z drutu (4.1.6), bulionowej pożywki z zielenią brylantową, żółcią i laktozą (5.2). Inkubować probówki w cieplarni przez 24 ± 2 godziny w temperaturze 30 ± 1 °C.

Kolonie wytwarzające gaz w probówkach typu Durham'a należy traktować jak potwierdzone kolonie bakterii z grupy coli.

7. **Obliczanie i formułowanie wyników**

7.1. Wykorzystać (patrz 7.4) obliczenia z płytek zawierających nie więcej niż 150 kolonii.

7.2. Przy stosowaniu badania potwierdzającego obliczyć liczbę kolonii coli w oparciu o procent potwierdzonych kolonii coli.

7.3. Liczbę bakterii z grupy coli na 1 ml mleka pasteryzowanego oblicza się według wzoru:

$$\frac{\sum C}{n}$$

gdzie:

ΣC to łączna liczba kolonii coli (7.1 w związku z 7.2) wykrytych podczas badania próbki mleka (3 ml);

n to ilość mililitrów badanej próbki (6.3) (3 ml).

Liczba podana jest z dokładnością do dwóch cyfr znaczących. Jeśli cyfrą zaokrąglaną jest pięć, należy zaokrąglić obliczenie tak, aby sąsiednia cyfra po lewej stronie była parzysta.

Jeśli występują jedynie liczby większe niż 150 kolonii, należy podać w sprawozdaniu wynik jako „przybliżona liczba form coli na 1 ml”.

8. **Dokładność**

Brak jest dotąd zaakceptowanych wyników międzynarodowych badań zespołowych.

VII. WYLICZANIE KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Niniejsza procedura precyzuje dwie wzorcowe procedury postępowania w celu wyliczenia komórek somatycznych:

- A. Metodę mikroskopową
- B. Metodę fluorooptoelektroniczną

A. *Metoda mikroskopowa*

1. **Przedmiot i obszar stosowania**

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę wyliczania komórek somatycznych w mleku surowym.

Niniejsza procedura precyzuje procedurę wyliczania liczby komórek w próbce mleka w celu wzorcowania i sprawdzania dokładności procedury fluorooptoelektronicznej (patrz B.1).

2. **Definicja**

Do celów niniejszej procedury komórki somatyczne to takie komórki, np. leukocyty lub komórki nabłonkowe, których jądra mogą być wyraźnie oznaczone za pomocą błękitu metylenowego.

3. **Zasada**

0,01 ml mleka rozprowadza się na powierzchni 1 cm² szkiełka podstawowego. Warstwę suszy się i zabarwia. Zliczanie wykonuje się za pomocą mikroskopu. Aby uzyskać liczbę komórek/ml, należy liczbę wykrytych na określonej powierzchni komórek somatycznych pomnożyć przez współczynnik roboczy.

4. **Odczynniki**

Stosować chemikalia klasy analitycznej.

Roztwór barwiący:

Skład:

Błękit metylenowy	0,6 g
Alkohol etylowy 99 %	54 ml
1,1,1-trichloroetan lub tetrachloroetan	40 ml
Kwas octowy lodowaty	6 ml

Ostrzeżenie

Tetrachloroetan jest toksyczny. Jeśli jest używany, przygotowywać go i stosować pod wyciągiem laboratoryjnym.

Przygotowanie:

Zmieszać w butelce alkohol etylowy i 1,1,1-trichloroetan lub tetrachloroetan; podgrzać w łaźni wodnej do temperatury 60–70 °C. Dodać błękit metylenowy, dokładnie wymieszać, schłodzić do 4 °C w lodówce przez 12–24 godziny, następnie dodać kwas octowy lodowaty. Przefiltrować używając filtru o porach średnicy 10–12 mikrona lub mniejszych; przechowywać roztwór barwiący w hermetycznie zamkniętej butelce. Jeśli tworzą się cząsteczki lub osad, przed użyciem ponownie przefiltrować.

5. **Aparatura i szkło laboratoryjne**

- 5.1. Mikroskop, z powiększeniem od × 500 do × 1 000.
- 5.2. Mikrostrzykawka, 0,01 ml o dokładności ± 2 % lub lepszej.

- 5.3. Szkiełko podstawowe, o zaznaczonej powierzchni warstwy 20 mm × 5 mm, bądź szkiełko standardowe oraz wzornik dla warstwy 20 mm × 5 mm.
- 5.4. Poziomowana płyta grzejna (30—50 °C) do suszenia szkiełek.
- 5.5. Wentylator (suszarka do włosów), do suszenia warstw.
- 5.6. Łaźnia wodna, umożliwiająca pracę w temperaturze 30—40 °C, do ogrzewania próbki mleka.
- 5.7. Szkiełko mikrometryczne, z podziałką co 0,01 mm.

6. Procedura

6.1. Próbkę mleka

Próbkę mleka należy przebadać w ciągu sześciu godzin od pobrania. Podczas przechowywania temperatura próbki nie może przekroczyć 6 °C. Należy unikać zamrażania.

6.2. Przygotowanie próbki w laboratorium

Podgrzać próbkę w łaźni wodnej (5.6) do temperatury 30—40 °C. Następnie starannie wymieszać. Schłodzić do temperatury, na jaką jest wzorcowana mikrostrzykawka (5.2), np. 20 °C.

6.3. Wstępna obróbka szkiełek

Oczyścić szkiełka (5.3) np. alkoholem etylowym, osuszyć bezpyłowym papierem, wykonać oczyszczanie płomieniowe oraz ostudzić. Aby chronić przed zakurzeniem, przechowywać w pudełku.

6.4. Przygotowanie warstwy

Za pomocą mikrostrzykawki (5.2) usunąć 0,01 ml mleka z próbki przygotowanej w sposób opisany wyżej. Dokładnie oczyścić stykającą się z mlekiem, zewnętrzną część strzykawki. Umieścić strzykawkę na szkiełku (5.3), rysując najpierw zarys kształtu (20 mm × 5 mm). Następnie wypełnić powierzchnię możliwie jak najbardziej równomiernie. Umieścić warstwę na poziomej płycie grzejnej (5.4) aż do jej całkowitego osuszenia.

Należy przygotować i zbadać co najmniej dwie warstwy z każdej próbki mleka.

6.5. Barwienie warstwy

Zanurzyć na dziesięć minut w roztworze barwiącym (4). Osuszyć, ewentualnie za pomocą wentylatora (5.5). Zanurzyć warstwy w wodzie wodociągowej, aby zmyć cały nadmiar barwnika. Następnie ponownie osuszyć i przechowywać, zabezpieczając przed zakurzeniem.

6.6. Wzorcowanie pola mikroskopu

W zależności od wybranego powiększenia (od × 500 — do × 1 000) określić za pomocą szkiełka mikrometrycznego (5.7) średnicę pola mikroskopu.

7. Zliczanie i obliczenia

7.1. Zliczanie komórek

Używać mikroskopu (5.1). Zamiast komórek liczone są jedyne jądra komórkowe. Są one łatwo rozpoznawalne i w celu zliczenia co najmniej połowa powinna być widoczna w polu mikroskopu. Policzyć pasy i pola znajdujące się w środkowej jednej trzeciej części warstwy unikając liczenia pasów i pól wybieranych wyłącznie z peryferyjnych obszarów warstwy. Dokładność przygotowania warstw, a co za tym idzie — wiarygodność wyników, musi być sprawdzana przynajmniej raz w miesiącu przez liczenie różnych części warstwy. Liczenie takie można wykonywać również poprzez liczenie pól mikroskopowych rozmieszczonych w taki sposób, że wszystkie części warstwy są jednakowo reprezentowane.

7.2. Minimalna zliczana liczba komórek

Ponieważ zliczania komórek somatycznych za pomocą mikroskopu można używać również do wzorcowania automatycznych i mechanicznych procedur liczenia, współczynnik wariacji przy liczeniu identycznych próbek nie może być wyższy niż współczynnik dla przyrządów elektronicznych. Współczynnik wariacji dla próbki mleka zawierającej do 400 000 do 600 000 komórek/ml nie powinien przekraczać 5 %.

Zliczana liczba komórek somatycznych dla każdej próbki, zgodnie z rozkładem Poissona, wynosi co najmniej 400, w celu spełnienia wymogów powtarzalności.

Rozkład Poissona zakłada, że:

$$M = V = s^2,$$

gdzie:

M to wartość średnia;

V to wariancja;

oraz

s to odchylenie standardowe.

Współczynnik wariacji wynosi:

$$CV = \frac{s \times 100 \%}{M} \text{ lub } CV = \frac{100 \%}{s} \text{ lub } CV = \frac{100 \%}{\sqrt{M}}$$

M (wartość średnia) wskazuje liczbę cząsteczek (komórek) zliczonych (tzn. 400 dla CV = 5 %).

7.3. Obliczanie współczynnika roboczego

Współczynnik roboczy oblicza się zgodnie z 7.3.1 lub 7.3.2, posługując się 0,01 ml mleka.

7.3.1. Obliczanie poprzecznych pasów na warstwie

Długość pasów do zliczania wynosi 5 mm każdy. Szerokość pasa odpowiada średnicy pola mikroskopu, ustalonej za pomocą szkiełka z podziałką mikrometryczną (5.7).

$$\text{Współczynnik roboczy} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

gdzie:

d to średnica pola mikroskopu w mm, ustalona za pomocą szkiełka z podziałką mikrometryczną (5.7);

b to liczba pasów całkowicie liczonych.

7.3.2. Obliczanie pól mikroskopowych w środkowej jednej trzeciej części warstwy lub z użyciem kratki:

$$\text{Współczynnik roboczy} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12732}{d^2 \times s}$$

gdzie:

d to średnica pola mikroskopu w mm, ustalona za pomocą szkiełka z podziałką mikrometryczną (5.7);

s to ilość liczonych pól.

7.4. Zliczanie zawartości komórek

Aby uzyskać ilość komórek na ml mleka, należy pomnożyć liczbę zliczonych (7.1 oraz 7.2) komórek somatycznych przez współczynnik roboczy (7.3).

7.5. Dokładność

Współczynnik wariacji (patrz 7.2) nie może przekraczać 5 %.

Brak jest dotąd zaakceptowanych wyników międzynarodowych badań zespołowych

B. Metoda fluoroopoelektroniczna

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę, którą, po właściwym wzorcowaniu (patrz A.1), można stosować do zliczania komórek somatycznych w mleku surowym bez konserwacji chemicznej lub z konserwacją chemiczną.

2. Definicja

Do celów niniejszej procedury komórki somatyczne są to cząsteczki, które pod wpływem zabarwienia DNA w swoim jądrze wykazują minimalny poziom fluorescencji.

3. Zasada

Część próbki (np. 0,2 ml) wymieszać dokładnie z roztworem buforowym oraz roztworem fluorescencyjnym. Część tej mieszaniny przenieść następnie w postaci cienkiej warstwy na talerz obrotowy, który służy jako płaszczyzna przedmiotowa dla mikroskopu.

Każda komórka wytwarza impuls elektryczny, który jest wzmacniany i rejestrowany. Liczba komórek somatycznych zostaje wydrukowana w tysiącach na ml.

4. Odczynniki

O ile nie stwierdzi się inaczej, należy stosować odczynniki chemiczne klasy analitycznej. Woda powinna być destylowana, dejonizowana lub inna o równorzędnej czystości.

4.1. Roztwór buforowy

Skład:

Wodoroftalan potasowy	51,0 g
Wodorotlenek potasowy	13,75 g
Polietylenoglikolo-mono-p-(1,1,3, 3-tetrametylobutylo)-fenyloeter (np. Triton X-100), 1 % objętościowo	10 ml
pH 5,7—5,9. Dopełnić wodą do 10 000 ml.	

Przygotowanie:

Zmieszać poszczególne składniki. Przechowywać nie dłużej niż siedem dni w hermetycznym pojemniku.

4.2. Roztwór fluorescencyjny (roztwór podstawowy)

Skład:

Bromek etydyny	1,0 g
Dopełnić wodą do 1 000 ml.	

Przygotowanie:

Bromek etydyny rozpuścić w wodzie. Przechowywanie w światłoszczelnej i hermetycznie zamkniętej butelce nie powinno przekraczać dwóch miesięcy.

4.3. Roztwór fluorescencyjny (roztwór roboczy)

20 ml roztworu podstawowego (4.2) zmieszać z roztworem buforowym (4.1) tak, by otrzymać 1 000 ml. Roztwór roboczy nie powinien być używany dłużej niż siedem dni.

4.4. Roztwór czyszczący

Skład:

Roztwór buforowy (4.1)	10 ml
Polietylenoglikolo-mono-p-(1,1,3, 3-tetrametylobutylo)-fenyloeter (np. Triton X-100), 1 % objętościowo	10 ml
Amoniak, 25 % objętościowo	25 ml
Dopełnić wodą do 10 000 ml.	

Przygotowanie:

Zmieszać poszczególne składniki. Przechowywać nie dłużej niż 30 dni.

5. Aparatura i szkło laboratoryjne

5.1. Przyrząd do liczenia, działający na zasadzie fluorescencyjno-optycznej.

Uwaga

Przed użyciem przyrząd musi być wzorcowany. W ten sposób ustala się stosunek między objętością cząsteczek liczonych a poziomem progowym, powyżej którego dokonywane jest obliczanie. Wzorcowanie przyrządu wykonuje się zgodnie z instrukcjami producenta przy użyciu próbek mleka, w których oznaczono liczbę komórek procedurą mikroskopową (A).

5.2. Łażnia wodna, z cyrkulacją, o temperaturze 40 ± 1 °C.

5.3. Probówka, z odpowiednim zamknięciem, około 15 ml.

6. **Próbka mleka**

6.1. Próbkę należy przechowywać w probówce (5.3) w niskiej temperaturze. Jeśli próbka nie jest konserwowana chemicznie, nie powinna być poddawana zliczaniu w ciągu pierwszych 24 godzin po udoju, ponieważ obliczenia są wtedy zbyt niskie. Temperatura przechowywania nie może przekraczać 6 °C.

6.2. **Konserwacja**

Konserwacja chemiczna musi być przeprowadzona w ciągu 24 godzin. Konserwacja musi być przeprowadzona jak najszybciej po pobraniu próbek.

6.2.1. Konserwację chemiczną próbki można wykonać poprzez dodanie jednego z następujących konserwantów:

— kwas (orto)borowy:

końcowe stężenie kwasu (orto)borowego w próbce nie może przekraczać 0,6 g/100 ml. Tak zakonserwowaną próbkę można przechowywać w temperaturze 6—12 °C najdłużej przez kolejne 24 godziny.

— dichromian potasowy:

końcowe stężenie dichromianu potasowego w próbce nie może przekraczać 0,2 g/100 ml. Tak zakonserwowaną próbkę można przechowywać w temperaturze 6—12 °C najdłużej przez kolejne 72 godziny.

— azydek sodowy:

próbka może być konserwowana końcowym stężeniem azydku sodowego pod warunkiem, że próbka jest schłodzona do temperatury 6—12 °C niezwłocznie po jej pobraniu i zliczona w ciągu 48 godzin po pobraniu próbki.

— bronopol:

próbka może być konserwowana końcowym stężeniem bronopolu pod warunkiem, że próbka jest schłodzona do temperatury 6—12 °C niezwłocznie po pobraniu i zliczona w ciągu 72 godzin po pobraniu próbki.

6.2.2. Próbkę zakonserwowaną uprzednio kwasem (orto)borowym można zakonserwować na kolejne 48 godzin za pomocą dichromianu potasowego.

Uwaga

W przypadku próbek zakonserwowanych za pomocą dichromianu potasowego należy obserwować miejscowe warunki dotyczące występowania odcieków.

7. **Procedura**

7.1. **Wstępna obróbka próbki**

Badane mleko przechowywać co najmniej przez 24 godziny od udoju, w temperaturze 2-6 °C. Nie zaleca się obliczania w dniu udoju próbek bez obróbki wstępnej, ponieważ wyniki mogą być zbyt niskie. Jeśli konieczne jest obliczenie takiej próbki, poddać ją wstępnej obróbce co najmniej przez trzy godziny za pomocą dichromianu potasowego (patrz 6.2.1).

7.2. **Przygotowanie**

Wstępnie obrobioną próbkę (patrz 7.1) lub próbkę bez obróbki wstępnej co najmniej po jednodniowym przechowywaniu, ogrzewa się w łaźni wodnej (5.2) do temperatury około 40 °C. Następnie, aż do momentu obliczania, przechowuje się próbkę w temperaturze pokojowej.

7.3. **Obliczanie komórek**

Obliczanie przeprowadza się za pomocą przyrządu do liczenia (5.1) w ciągu 15 minut na końcu ogrzewania (patrz 7.2). Bezpośrednio przed obliczaniem próbkę dokładnie wymieszać w celu uzyskania możliwie najbardziej jednorodnego rozprowadzenia komórek somatycznych.

Dalsze rozcieńczanie i przygotowanie próbki wykonywać automatycznie w przyrządzie.

8. Dokładność

Brak jest dotąd zaakceptowanych wyników międzynarodowych badań zespołowych w zakresie powtarzalności (r) i odtwarzalności (R). W przyszłości ustalone zostaną szczegółowe dane dotyczące dokładności.

Dane dostępne na szczeblu krajowym umożliwiają następujące wyliczenia szacunkowe:

1) Liczba komórek na poziomie od 400 000 do 500 000/ml

— odchylenie standardowe dla powtarzalności:

$$s_r = 20\,000 \text{ komórek/ml}$$

(równoważne współczynnikowi wariacji 5—4 %)

— odchylenie standardowe dla odtwarzalności:

$$s_R = 40\,000 \text{ komórek/ml}$$

(równoważne współczynnikowi wariacji 10—8 %).

9. Kontrola dokładności

Kontrolę dokładności wykonuje się przy użyciu próbek o znanej liczbie komórek ustalonej drogą zliczania mikroskopowego w krajowym laboratorium wzorcowym.

VIII. WYKRYWANIE OBECNOŚCI ANTIBIOTYKÓW I SULFONAMIDÓW

ZAKRES I OBSZAR ZASTOSOWANIA

Niniejsza procedura precyzuje wzorcową procedurę wykrywania antybiotyków i sulfonamidów w mleku surowym i po obróbce termicznej.

Procedura wzorcowa obejmuje:

A. Metodę jakościową

Opis dotyczy wstępnej procedury, w ramach której selekcjonuje się próbki mleka zawierające antybiotyki łącznie z sulfonamidami. Jest to szereg podobnych procedur, z których wszystkie w zasadzie wykorzystują *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, ATTC 10 149, jako szczep testowy. Wybrano niniejszą procedurę jako reprezentatywną dla tych testów.

B. Metodę ilościową

Procedura musi być stosowana do potwierdzania wyników procedury jakościowej, aby zidentyfikować penicylinę i określić jej stężenie.

A. Procedura jakościowa

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje jakościowe wykrywanie antybiotyków i sulfonamidów w mleku surowym i po obróbce termicznej, przekraczających limity ustanowione w tabeli:

Wykrywalne stężenia różnych antybiotyków i sulfonamidów ⁽¹⁾

	Czułość na badanie	
	Wszystkie próby negatywne	Wszystkie próby pozytywne
Penicylina benzylowa	0,002	0,006
Ampicylina	0,002	0,005
Kloksacylina	0,015	0,035
Nafcylina	0,006	0,011
Tetracyklina	0,10	0,40
Oksytetracyklina	0,20	0,45
Chlorotetracyklina	0,15	0,50
Chloramfenikol	7	15
Dihydrostreptomycyna	4	13
Neomycyna	1	22
Kanamycyna	9	28
Bacytracyna	0,06	0,14
Erytromycyna	1	2,25
Rifamycyna	0,01	0,14
Diafenylosulfon	0,01	0,1
Sulfametazyna (Sulfadimidyna)	0,5	1

⁽¹⁾ Penicylina benzylowa i bacytracyna są wyrażone w IU/ml, wszystkie inne antybiotyki w µg/ml.

2. Definicja

Mleko zawiera antybiotyki lub sulfonamidy, jeśli zabarwienie pożywki nie ulega zmianie (patrz 7.1).

3. Zasada

Próbkę mleka wraz ze substancjami odżywczymi dodaje się do żelu agarowego zawierającego wskaźnik pH i przetrwalniki *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10 149 (patrz 5.4.1), który charakteryzuje się dobrą ogólną wrażliwością, w szczególności jest wrażliwy na hamowanie przez penicylinę. Inkubacja skutkująca normalnym wzrostem organizmu oraz wytwarzaniem kwasu powoduje zmianę koloru wskaźnika pH z purpurowego na żółty. Obecność w mleku substancji opóźniających rozwój organizmu powoduje, że kolor wskaźnika pH pozostaje purpurowy.

4. Sprzęt i szkło laboratoryjne

Podstawowy sprzęt laboratoryjny, w szczególności:

4.1. Przyrządy

- 4.1.1. Inkubator, pozwalający utrzymać temperaturę 64 ± 1 °C.
- 4.1.2. Łażnia wodna pozwalająca na pracę w temperaturze 64 ± 1 °C.
- 4.1.3. Stojak do probówek i ampułek.
- 4.1.4. Pipeta z jednorazowymi końcówkami do pobierania próbek i dozowania, 0,1 ml.
- 4.1.5. Pinceta lub szczypczyki.
- 4.1.6. Piec z gorącym powietrzem, pozwalający na utrzymanie temperatury 170—175 °C.
- 4.1.7. Autoklaw pozwalający na pracę w temperaturze 121 ± 1 °C.
- 4.1.8. pH-metr.

4.2. Szkło laboratoryjne

- 4.2.1. Butelki do próbek z odpowiednim zamknięciem.

Uwaga

Niektóre korki gumowe mogą powodować osadzanie się substancji hamujących na szyjce butelki.

- 4.2.2. Płytki Petriego, wykonane z czystego, bezbarwnego szkła lub sterylnego materiału syntetycznego, z płaskim dnem równej grubości, minimalna średnica wewnętrzna około 140 mm.
- 4.2.3. Butelki o pojemności 250 ml.
- 4.2.4. Pipety (zatykane watą), wykonane ze szkła lub sterylnego materiału syntetycznego o nominalnej pojemności 1 ml i 10 ml.
- 4.2.5. Szpatułki szklane
- 4.2.6. Probówki lub ampułki o średnicy wewnętrznej około 8 mm, z zamknięciami lub korkami.
- 4.2.7. Sterylizacja szkła laboratoryjnego

Szkło laboratoryjne powinno być sterylizowane w jeden z podanych niżej sposobów:

- a) poprzez utrzymywanie co najmniej przez godzinę w piecu z gorącym powietrzem (4.1.6), w temperaturze 170—175 °C;
- b) poprzez utrzymywanie co najmniej przez 20 minut w autoklawie (4.1.7), w temperaturze 121 ± 1 °C.

W przypadku autoklaw należy zapewnić właściwą penetrację pary, np. jeśli sprzęt sterylizuje się w pojemnikach, nie należy ich szczelnie zamykać, kolby powinny mieć luźno umocowane pokrywy.

Szkło sterylizowane w autoklawie należy osuszyć poprzez odparowanie.

Pipety należy sterylizować w piecu z gorącym powietrzem (4.1.1).

5. Pożywki, roztwory, szczep testowy

Składniki pożywek muszą nadawać się do celów bakteriologicznych. Używana woda musi być destylowana na szkle lub demineralizowana co najmniej równorzędnej czystości. Nie może ona zawierać substancji hamujących rozwój szczepu testowego.

5.1. Pożywki

5.1.1. Pożywka agarowa

Skład:

Ekstrakt drożdżowy	2 g
Pepton	5 g
Ekstrakt mięsny	1 g
Chlorek sodu	5 g
Agar	10-15 g
Woda	1 000 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki w wodzie. Doprowadzić do wrzenia, mieszając od czasu do czasu. Dostosować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,4 \pm 0,1$ przy temperaturze 25 °C.

Rozdzielić do probówek na 10 ml porcje agaru skośnego lub na 100 ml porcje do butelek.

Sterylizować przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C.

5.1.2. Pożywka agarowa

Skład:

Chlorek sodu (NaCl)	2 g
Agar	15 g
Woda	1 000 ml
Roztwór trimetoprimu lub tetroksoprimu (patrz 5.1.3) ⁽¹⁾	10 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki w wodzie, oprócz roztworów trimetoprim lub tetroksoprim. Doprowadzić do wrzenia, mieszając od czasu do czasu. Dodać trimetoprim lub tetroksoprim i sterylizować przez 15 minut w temperaturze 121 ± 1 °C; skorygować pH tak, aby po sterylizacji wynosiło $7,0 \pm 0,1$ przy temperaturze 25 °C.

5.1.3. Roztwór trimetoprimu lub tetroksoprimu

Skład:

Trimetoprim	5 g
lub tetroksoprim	30 mg
alkohol etylowy 96 %	5 ml/30 ml
Woda do:	1 000 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić trimetoprim lub tetroksoprim w alkoholu etylowym (5 lub 30 ml) i rozcieńczyć wodą.

5.1.4. Pożywka

Skład:

Ekstrakt drożdżowy	0,75 mg
Glukoza	5,0 mg
Skrobia rozpuszczalna	8,0 mg
Purpura bromokrezolowa	0,025 g
Woda do:	50 ml

Przygotowanie:

Rozpuścić składniki odżywcze i wskaźnik barwny w wodzie, w razie potrzeby podgrzewając, sterylizować poprzez filtrowanie. Pożywka jest dostępna w handlu w postaci tabletek.

5.2. Wzorcowe roztwory penicyliny

5.2.1. Przygotować roztwór penicyliny z 60 µg/ml (= 100 IU/ml), rozpuszczając krystaliczną sodową lub potasową penicylinę benzylową w sterylnej destylowanej wodzie w odpowiedniej sterylnej butelce z korkiem.

5.2.2. Przygotować roztwór roboczy penicyliny, uzupełniając 1,25 ml roztworu penicyliny (5.2.1) do 1 000 ml sterylną wodą destylowaną. Ten roztwór roboczy zawiera 0,75 µg (= 0,125 IU/ml) penicyliny.

5.2.3. Przygotować wzorcowy roztwór penicyliny zawierający 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml), dodając 71 ml mleka niezawierającego substancji hamujących (5.3) do 4 ml roztworu roboczego penicyliny (5.2.2) i mieszając zawartość.

⁽¹⁾ Należy przestrzegać przepisów prawa patentowego dotyczących stosowania pożywek hodowlanych zawierających substancje antyfolanowe.

- 5.2.4. Roztwory penicyliny wymienione w 5.2.1—5.2.3 muszą być przygotowane w dniu, w którym ma być wykonana próba.
- 5.3. *Mleko niezawierające substancji hamujących*
- Przygotować jako próbę kontrolną mleko niezawierające substancji hamujących poprzez rozpuszczenie w sterylnej wodzie destylowanej odtuszczonego mleka w proszku (10 % m/v) poprzednio zbadanego, w którym nie wykryto substancji hamujących. Ewentualnie, odpowiednią ilość świeżego mleka ze zbiorników, które zostało przebadane i w którym nie wykryto substancji hamujących, rozdzielić w butelki, podgrzewać przez godzinę w temperaturze 100 °C, a następnie przechowywać najdłużej przez tydzień w lodówce w temperaturze 0—6 °C.
- 5.4. *Szczep testowy*
- 5.4.1. Jako szczep testowy stosowany jest *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus* ATCC 10 149. Szczep ten jest identyczny z C 953.
- 5.4.2. Przygotować kulturę podstawową służącą do utrzymywania kultury próbnej. Kulturę próbną hodzi się na skośnej pożywce agarowej (5.1.1). Wykonuje się posiew pasmowy powierzchni agarem skośnym przy użyciu kultury próbnej, po czym inkubuje się ją tlenowo przez 48 godzin w temperaturze 63 ± 1 °C. Po inkubacji probówkę uszczelnia się za pomocą sterylnego korka gumowego. W ten sposób otrzymaną kulturę podstawową można przechowywać przez kilka miesięcy w lodówce w temperaturze 0—5 °C.
- 5.5. *Kultura próbna (zawiesina przetrwalników)*
- 5.5.1. Przenieść aseptycznie 20 ml pożywki agarowej (5.1.1) na sterylną płytkę Petriego (4.2.2) i schłodzić do temperatury pokojowej.
- 5.5.2. Za pomocą sterylnej pipety (4.2.4) przenieść 5 ml sterylnej wody destylowanej do probówki z kulturą podstawową (5.4.2) i posługując się sterylną ezą, zmyć przetrwalniki ze skosu agarowego. Tę zawiesinę przetrwalników przechowywać w temperaturze od 0 do 5 °C, zużyć w ciągu 36 godzin.
- 5.5.3. Za pomocą sterylnej pipety (4.2.4) przenieść 0,5 ml zawiesiny przetrwalnikowej (5.5.2) na płytkę z kulturą (5.5.1) i posługując się zgietym precikiem szklanym, dokładnie rozsmarować materiał inokulacyjny po całej powierzchni. Inkubować przez 16-18 godzin w temperaturze 63 ± 1 °C (4.1.1).
- Używając kultury podstawowej (5.4.2) lub kultury starszej 36 godzin, należy przeprowadzić procedurę hodowli pochodnej przynajmniej dwukrotnie z odstępami między hodowaniem nieprzekraczającymi 36 godzin.
- 5.5.4. Za pomocą sterylnej pipety (4.2.4) przenieść 10 ml wody destylowanej na płytkę z kulturą (5.5.3) i posługując się precikiem szklanym, usunąć przetrwalniki z powierzchni do zawiesiny. Przenieść zawiesinę z przetrwalnikami do butelki (4.2.3) zawierającej 250 ml sterylnej wody destylowanej. Zamknąć butelkę i dokładnie potrząsnąć. Kultury nieprzeznaczone do posiewu pochodnego należy natychmiast umieścić na przechowanie w lodówce w temperaturze 0—6 °C.
- 5.5.5. Zawiesina przetrwalników na płytce z pożywką agarową, inkubowana przez 16—18 godzin w temperaturze 63 ± 1 °C, ma liczbę żyjących kolonii wynoszącą od 5 do 10 milionów na ml. Zawiesina przetrwalników musi być jednolicie zmętniała, a jeśli występują w niej kłaczki lub osady, należy ją odrzucić i przygotować z kultury podstawowej (5.4.2) nową zawiesinę.
- 5.6. *Przygotowanie probówek/ampulek*
- 5.6.1. Stopić pożywkę agarową (5.1.2) i ochłodzić do 55 °C.
- 5.6.2. W probówce lub butelce dodać jedną część świeżej zawiesiny z przetrwalnikami (5.5.4) do pięciu części pożywki agarowej (5.6.1) i dokładnie wymieszać.
- 5.6.3. W sterylnej probówce lub ampulce (4.2.6) umieścić 0,3 ml inokulowanej pożywki (5.6.2), w ilości obliczonej na 5 mm warstwę; zamknąć zatyczką lub korkiem albo zatopić końcówkę. Pozostawić probówkę/ampułki w położeniu pionowym do schłodzenia, pozostawić pożywkę do zestalenia się, a następnie zostawić w tym samym położeniu co najmniej na 12 godzin.
- 5.6.4. Probówek/ampulek można używać w tym samym dniu, ale mogą być również przechowywane przez kilka miesięcy, o ile bezpośrednio po przygotowaniu zostaną schłodzone i będą przechowywane w temperaturze 0—6 °C.
6. **Procedura**
- 6.1. Próbkę należy badać możliwie jak najszybciej, najlepiej w ciągu 24 godzin od pobrania, utrzymując je w międzyczasie w temperaturze 0—5 °C. Jeśli niemożliwe jest przebadanie próbek w ciągu 24 godzin, należy utrzymywać je w bardzo niskiej temperaturze (jeśli głęboko — 30 do — 15 °C), aby zminimalizować inaktywację penicyliny.

- 6.2. Oznaczyć każdą probówkę/ampułkę w sposób czytelny i trwały. Usunąć pokrywę lub korek. Umieścić wymaganą ilość próbek i prób kontrolnych (5.2 i 5.3) do badania w odpowiednim stojaku (4.1.3).
- 6.3. Do każdej próbki/ampułki dodać 50 mikrolitrów pożywki wymienionej w 5.1.4.
- 6.4. Wymieszać dokładnie próbkę mleka i za pomocą strzykawki (4.1.4) przenieść 0,1 ml do odpowiednio oznaczonej próbki/ampułki. Do przenoszenia poszczególnych próbek używać czystej końcówki jednorazowej.
- 6.5. Dwukrotnie powtórzyć czynność opisaną w 6.4, przenosząc zamiast próbki mleka wzorcowy roztwór penicyliny zawierający 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml) penicyliny (5.2.3).
- 6.6. Dwukrotnie powtórzyć czynności opisane w 6.4, przenosząc zamiast próbki mleka próbkę kontrolną mleka wolnego od substancji hamujących (5.3).
- 6.7. Zamknąć próbki/ampułki i umieścić je wraz ze stojakiem co najmniej na 2½ — 2¾ godziny w łaźni wodnej o temperaturze 63 ± 1 °C (4.1.2).
- 6.8. Wyjąć stojak z próbkami/ampułkami z łaźni wodnej.
- 6.9. Obserwować barwę pożywki próbnej (patrz 7).

7. Interpretacja wyników

- 7.1. Purpurowe zabarwienie pożywki próbnej w którejkolwiek próbce/ampułce z próbkami mleka lub próbami kontrolnymi wskazuje na obecność antybiotyków lub sulfonamidów w próbce w ilości przybliżonej lub równej poziomowi podanemu w tabeli na stronie 60. Zabarwienie próbki/ampułki z wzorcowym roztworem penicyliny (6.5) pozostaje purpurowy, by udowodnić, że badana pożywka jest wystarczająco wrażliwa.
- 7.2. Purpurowe zabarwienie jedynie części pożywki próbnej albo nieregularne zabarwienie w którejkolwiek próbce/ampułce z próbką mleka wskazuje na obecność substancji hamujących w ilościach między poziomami podanymi w tabeli na stronie 62.
- 7.3. Żółte zabarwienie pożywki próbnej w którejkolwiek próbce mleka lub kontrolnych próbek/ampulek wskazuje na nieobecność substancji hamujących rozwój szczepu testowego.
- 7.4. Purpurowe zabarwienie we wszystkich badanych próbkach/ampułkach łącznie z kontrolą negatywną wskazuje na to, że próbki/ampułki nie zawierają żywotnych przetrwalników oraz że próbki należy przebadać ponownie, posługując się świeżo przygotowanymi materiałami badawczymi.

8. Potwierdzenie wyników

- 8.1. Potwierdzić wszystkie próbki za pomocą reakcji opisanych w 7.1 i 7.2, zgodnie z „Metodą B”.
Jeśli konieczne jest przechowanie próbek mleka przed potwierdzeniem, należy przechowywać je głęboko zamrożone, aby uniknąć degradacji antybiotyków.

B. Procedura potwierdzająca obecność penicylin oraz oznaczanie stężenia

1. Przedmiot i obszar stosowania

Niniejsza procedura precyzuje badanie potwierdzające obecność penicylin lub innych antybiotyków ponad to penicylin oraz procedury oznaczenia stężenia penicyliny w próbkach mleka wykazujących reakcję pozytywną (A.7.1) lub reakcją wątpliwą (A.7.2).

Wrażliwość poszczególnych antybiotyków w procedurze

patrz A.1.

2. Definicja

- 2.1. Próbką mleka zawiera antybiotyki łącznie z sulfonamidami, jeśli w opisanej procedurze wykazuje wokół krążka czystą, co najmniej 2 mm strefę hamowania.

2.2. Jeśli próbka zawierająca antybiotyki łącznie z sulfonamidami (2.1), do której dodano penicylinazę (betalaktamazę), nie wykazuje czystej strefy lub wykazuje czystą strefę o mniejszej średnicy niż bez dodatku penicylinazy—*substancją hamującą jest albo penicylina albo penicylina wraz z innym antybiotykiem lub sulfonamidem*.

2.3. Jeśli strefa nie ulega dezaktywacji pod wpływem penicylinazy (2.2), substancją hamującą w próbce mleka *nie jest penicylina*, ale może nią być *inna pozostałość* (patrz dyrektywa 85/397/EWG załącznik A, rozdział VI, A.1.f i 2b).

Niektóre półsyntetyczne penicyliny, np. kloksacylina sodowa, nie są lub są tylko częściowo dezaktywowane przez penicylinazę bądź wykazują całkowitą odporność, dlatego nie są identyfikowane jako penicylina (patrz 7.3).

3. Zasada

Krażek z bibuły nasączony badanym mlekiem umieszcza się na powierzchni pożywki agarowej zaszczonej *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Inkubacja skutkująca normalnym rozwojem organizmu powoduje zmętnienie agaru. Na obecność w mleku substancji hamujących rozwój organizmu wskazuje czysta strefa wokół. Rozmiar czystej strefy zależy, między innymi, od stężenia i rodzaju substancji hamujących w mleku.

4. Przyrządy, szkło laboratoryjne i sprzęt

4.1. Przyrządy

4.1.1. Patrz A.4.1.

4.1.2. Łaźnia wodna pozwalająca na pracę w temperaturze $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Szkło laboratoryjne

Patrz A.4.2.

4.3. Krążki bibułowe, niezawierające inhibitorów, średnica 9—13 mm, umożliwiające wchłonięcie około 130 mg mleka (najlepiej przechowywane w eksykatorze).

5. Pożywki, roztwory wzorcowe, roztwór penicylinazy, odczynniki, szczep testowy

Składniki pożywek muszą nadawać się do celów bakteriologicznych. Należy używać wody destylowanej na szkło, demineralizowanej lub o równorzędnej czystości. Nie może ona zawierać substancji hamujących rozwój szczepu testowego.

5.1. Pożywki

5.1.1. Pożywka agarowa (A.5.1.1)

5.1.2. Pożywka próbna do wykrywania substancji hamujących

Skład

Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Trypton	5 g
Glukoza	1 g
Roztwór trimetoprimu lub tetroksoprimu (A.5.1.3)	10 ml
Agar	10—15 g (w zależności od właściwości żelujących)
Woda	1 000 ml

Przygotowanie

Składniki stałe rozpuścić całkowicie w wodzie, przez ogrzewanie i mieszanie, po czym dodać roztwór trimetoprimu lub tetroksoprimu. Po dodaniu roztworu trimetoprimu lub tetroksoprimu musi zostać dostosowane pH tak, aby po sterylizacji wynosił $8,0 \pm 0,1$ w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pożywkę sterylizuje się przez 15 minut w temperaturze $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2. Wzorcowe roztwory penicyliny w mleku

patrz A.5.2.

Do ilościowego oznaczenia substancji hamujących (8) wykonać wzorcowe roztwory penicyliny w mleku niezawierającym inhibitorów (A.5.3), o następujących stężeniach:

- a) 0,004 µg/ml (0,0067 IU/ml)
- b) 0,006 µg/ml (0,01 IU/ml)
- c) 0,03 µg/ml (0,05 IU/ml)
- d) 0,06 µg/ml (0,1 IU/ml)

5.3. *Roztwór penicyliny*

- 5.3.1. Rozpuścić dostateczną ilość penicyliny (betalaktamazy) w sterylnej wodzie destylowanej, tak aby otrzymać stężenie 1 000 U/ml. Roztwór ten, najlepiej rozdzielony na małe porcje, można przechowywać do czterech tygodni w temperaturze 0—5 °C.

Uwaga

Brak jest jednolitego międzynarodowego wzorca dla penicyliny. Do celów tej procedury przyjmuje się, że 10 jednostek penicyliny ilością wystarczającą do inaktywacji będzie 0,6 µg (= 1 IU) penicyliny. Przy dostawach penicyliny o nieznanym natężeniu konieczna jest weryfikacja tego założenia. W przeciwnym razie konieczna jest odpowiednia zmiana natężenia roztworu penicyliny.

- 5.3.2. Zamiast roztworu penicyliny można używać dostępnych w handlu krążków nasączonych penicyliną, o ile procedura kontrolna wykaze, że zawierają one odpowiednią ilość penicyliny.

5.4. *Szczep testowy*

Patrz A.5.4.

5.5. *Kultura próbna (zawiesina przetrwalników)*

Patrz A.5.5.

5.6. *Przygotowanie płytek do badań*

- 5.6.1. Stopić pożywkę próbną do wykrywania substancji hamujących (5.1.2) i schłodzić do 55 °C.
- 5.6.2. W butelce dodać jedną część świeżej zawiesiny przetrwalników (5.5) do tylu części pożywki próbnej do wykrywania substancji hamujących (5.1.2), aby zapewnić odpowiednie zagęszczenie kolonii w zaszczipionej pożywce próbnej oraz starannie wymieszać.
- 5.6.3. Przenieść na uprzednio podgrzaną do 55 °C, sterylną płytkę Petriego (A.4.2.2) inokulowaną pożywkę próbną (5.6.2), tworząc warstwę grubości od 0,6 do 0,8 mm. Aby uzyskać grubość 0,8 mm w wypadku płytki Petriego o średnicy wewnętrznej 140 mm, konieczne jest zastosowanie około 15 ml pożywki próbnej.
- 5.6.4. Przenieść płytkę Petriego na chłodną, płaską powierzchnię sprawdzoną uprzednio za pomocą poziomnicy alkoholowej; zdjąć pokrywę i pozostawić pożywkę agarową do zestalenia się. Po zestaleniu umieścić ponownie nakrywkę na płytkach, a następnie odwrócić, aby zminimalizować stężenie na powierzchni pożywki agarowej.
- 5.6.5. Przygotowane w ten sposób płytki najlepiej jest zużyć tego samego dnia, można jednak je przechowywać przez okres do dwóch tygodni pod warunkiem, że bezpośrednio po przygotowaniu zostaną zapakowane w szczelny worek polietylenowy i trzymane są w temperaturze 5 °C.
- 5.6.6. W celu identyfikacji próbek należy oznaczyć spód płytek próbnych.

6. **Procedura**

6.1. *Przygotowanie próbki*

- 6.1.1. Próbki dające w „Metodzie A” (A.7.1 i A.7.2) wyniki pozytywne lub wątpliwe należy ponownie przebadać, zidentyfikować i określić ilościowo penicylinę.
- 6.1.2. Aby uniknąć wpływu termicznie nietrwałych, niespecyficznych inhibitorów próbki mleka należy wstępnie ogrzewać przez 10 minut w temperaturze 80 ± 1 °C.
- 6.1.3. Po dokładnym wymieszaniu przenieść około 10 ml ogrzanego mleka próbnego do odpowiedniej, sterylnej butelki z szerokim otworem. Do mleka dodać około 0,4 ml roztworu penicyliny (5.3) i dokładnie wymieszać.

6.2. Wykrywanie inhibitorów

- 6.2.1. Posługując się czystą, suchą pincetą, zanurzyć krążek bibułowy (4.3) w próbce mleka (6.1.2). Usunąć nadmiar mleka, dotykając krążkiem ścianki butelki z próbką. Umieścić krążek płasko na powierzchni płytki próbnej (5.6) i delikatnie docisnąć pincetą.
- 6.2.2. Krążki nasączone mlekiem z różnych próbek muszą znajdować się w odległości co najmniej 20 mm od siebie oraz co najmniej 10 mm od krawędzi.
- 6.2.3. Aby sprawdzić wrażliwość, krążki (4.3) zanurzone we wzorcowym roztworze penicyliny (5.2) muszą one zostać losowo rozmieszczone między krążkami z próbkami mleka w ilości co najmniej 2 % liczby krążków z próbkami mleka; przy czym podczas każdego badania należy używać co najmniej pięciu krążków wzorcowych.
- 6.2.4. Po losowym umieszczeniu wszystkich krążków na pożywce agarowej i ich identyfikacji odwrócić płytki i inkubować przez od 2½ do pięciu godzin w cieplarni w temperaturze 63 ± 1 °C.
- 6.2.5. Po inkubacji ustawić płytki przed odpowiednim źródłem światła i badać na obecność przezroczystych stref hamowania wokół bibułowych krążków. Dokonać pomiaru przezroczystych stref.
- 6.2.6. Strefy wokół krążków zawierających wzorcowy roztwór penicyliny (6.2.3) muszą mieć co najmniej 2 mm.
- 6.2.7. Czyste strefy wokół krążków zawierających próbki mleka o rozmiarach równych lub większych niż podane w 6.2.6 wskazują na obecność substancji hamujących rozwój szczepu testowego.

6.3. Identyfikacja i oznaczenie ilościowe substancji hamujących

- 6.3.1. Procedurę 6.2.1 wykonuje się dwukrotnie na ogrzanej próbce mleka (6.1.2) oraz na próbce podanej działaniu penicylinazy (6.1.3). Zamiast dodawania penicylinazy do 10 ml próbki mleka można zanurzyć w tej próbce przygotowany krążek z penicylinazą (5.3.2), a następnie umieścić go na płytce.
- 6.3.2. Procedurę 6.2.1 wykonuje się dwukrotnie dla każdego wzorcowego roztworu penicyliny wymienionego w 5.2. a)—d).
- 6.3.3. Należy ustalić średnią średnicę czystych stref hamowania dla próbki mleka oraz dla kontrolnej penicyliny, jak również dla wzorcowych roztworów penicyliny.

7. Interpretacja wyników (patrz 2)

- 7.1. Jeśli brak jest czystej strefy wokół krążka zawierającego kontrolną penicylinazę, ale taka strefa występuje wokół krążka zawierającego próbkę mleka i jest ona równa lub większa od strefy wokół krążka z wzorcowym roztworem penicyliny (5.2a)), to substancja hamująca w próbce mleka odpowiada penicylinie benzylowej sodu (potasu) o stężeniu co najmniej 0,004 µg/ml.
- 7.2. Jeśli średnia średnica czystej strefy wokół krążka zawierającego penicylinazę jest równa średniej średnicy tej strefy wokół krążka z próbką mleka, to mleko zawiera substancje hamujące, których nie można dezaktywować za pomocą używanych w ramach tej procedury stężeń penicylinazy.
- 7.3. Jeśli średnia średnica czystej strefy wokół krążka zawierającego penicylinazę jest mniejsza niż średnia średnica tej strefy wokół krążka z próbką mleka ogrzaną zgodnie z 6.1.2, to próbka mleka zawiera penicylinę wraz z innymi antybiotykami łącznie z sulfonamidami, oprócz penicyliny lub penicyliny półsyntetycznej, której nie można zidentyfikować za pomocą używanego w tej procedurze stężenia penicylinazy. Penicyliny syntetyczne, takie jak kloksacylina sodowa, mogą nie być dezaktywowane przez penicylinazę w warunkach badania i dlatego mogą być klasyfikowane jako inhibitory inne niż penicylina.

Uwaga

Substancje hamujące inne niż penicylina mogą — jeśli trzeba — być identyfikowane za pomocą odpowiednich procedur.

8. Oznaczanie zawartości penicyliny

- 8.1. Oznaczanie zawartości penicyliny należy wykonać na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej lub przez obliczenie na podstawie rozmiarów stref uzyskanych przy wzorcowych roztworach penicyliny w mleku (5.2.a)—d)).

8.2. *Sporządzanie krzywej wzorcowej*

Ponieważ istnieje liniowa korelacja między $\log_{10}$ stężenia penicyliny a średnicą stref hamowania, można sporządzić krzywą wzorcową na papierze półlogarytmicznym, odkładając logarytmy stężenia penicyliny na osi rzędnych, a średnice stref hamowania na osi odciętych. Średnicę strefy hamowania oblicza się jako średnią z dwukrotnie przeprowadzonych badań. Dla poszczególnych stężeń nanosi się średnice stref hamujących, po czym kreśli się krzywą wzorcową.

8.3. *Obliczanie*

Stężenia penicyliny w próbce mleka może być obliczana na podstawie ich średnicy stref za pomocą równania lub krzywej wzorcowej. Dla dokładności szacowania promień stref hamowania powinien być co najmniej dwa razy, a co najwyżej pięć razy większy od promienia krążków.

9. **Formułowanie wyników**

9.1. Wyniki wyrażane są jako zawartość penicyliny równa lub wyższa niż 0,004 $\mu\text{g/ml}$ (lub przez wskazanie ustalonego stężenia) bądź jako zawartość inhibitorów innych niż penicylina.

9.2. *Powtarzalność (r) i odtwarzalność (R)*

Oдноśne wartości nie są dostępne ani istotne, ponieważ podano wzorzec do celów porównywania.

IX. WYKRYWANIE MIKROORGANIZMÓW CHOROBOTWÓRCZYCH**1. Zakres i obszar zastosowania**

Zgodnie z wymogami dyrektywy 85/397/EWG, załącznik A, rozdział VII pkt 2 procedura ta podaje instrukcje, których należy przestrzegać podczas badania mleka pasteryzowanego na obecność drobnoustrojów chorobotwórczych.

2. Definicja

Badanie należy przeprowadzić pod kątem gatunków bakterii występujących najczęściej w przypadku chorób przenoszonych drogą pokarmową.

Pasteryzacja jest rodzajem obróbki, która zabezpiecza mleko przed obecnością termicznie nietrwałych patogenów. Jeśli spełnione są normy ustanowione w załączniku A, rozdział VII pkt 2 dyrektywy dla liczby kolonii w temperaturze 30 °C i 21 °C, a także wymogi dotyczące bakterii z grupy coli i aktywności fosfatazy, specyficzne badanie na obecność patogenów jest konieczne jedynie w przypadku, gdy istnieje podejrzenie, że wystąpienie zatruc pokarmowych ma związek z mlekiem.

3. Procedura

Procedura i częstotliwość badań muszą zostać przewidziane przez organ krajowy, w taki sposób, aby umożliwiać wystawianie certyfikatów sanitarnych w odniesieniu do mleka poddanego obróbce termicznej, przeznaczonego do handlu wewnątrz Wspólnoty. W celu wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych należy stosować zatwierdzone kryteria i procedury międzynarodowe, o ile są dostępne.

4. Sprawozdanie z badania

Wynik badania dla każdego mikroorganizmu chorobotwórczego wyrażany jest następująco:

Liczba na ml mleka bądź „obecność” lub „nieobecność” w objętości mleka pasteryzowanego, wymaganej przez zastosowaną procedurę. Sprawozdanie jasno określa zastosowaną procedurę.