

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 14 февруари 1991 година

относно определяне на някои методи за анализ и изследване на суровото и топлинно обработеното мляко

(91/180/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 85/397/ЕИО на Съвета от 5 август 1985 г. относно здравните и ветеринарно-санитарните проблеми, засягащи търговията в Общността с топлинно обработено мляко¹, последно изменена с Директива 89/662/ЕИО², и по-специално член 10, параграф 2 от нея,

като има предвид, че член 10, параграф 2 предвижда Комисията да определи методи за анализ и изследване с цел контрол на съответствието със стандартите, отнасящи се до суровото и топлинно обработеното мляко;

като има предвид необходимостта да бъдат установени по-специално методи за определяне на общия брой на микроорганизмите, броя на соматичните клетки, точката на замръзване и наличието на антибиотици;

като има предвид необходимостта от установяване по-специално на методи за доказване на липсата на патогенни организми, определяне броя на колиформите и общия брой на микроорганизмите, отсъствието на фосфатаза, наличието на пероксидаза и липсата на антибиотици и определяне точката на замръзване за пастеризираното мляко;

като има предвид необходимостта от регламентирането по-специално на методи за определяне общия брой на микроорганизмите и отсъствието на антибиотици за стерилизираното и произведеното по УНТ (свръхвисока температура) технология мляко;

като има предвид, че по технически причини е подходящо като първа мярка да се определят референтни методи за анализ и изследване, гарантиращи съответствие с определени стандарти; като има предвид по-специално необходимостта от по-нататъшно проучване на условията, при които трябва да се прилагат рутинните методи за анализ и изследване; като има предвид, че в очакване на резултатите от проучването, държавите-членки са отговорни за прилагането на съответните рутинни методи, гарантиращи съответствие с изискванията, определени в Директива 85/397/ЕИО;

¹ ОВ L 226, 24.8.1985 г., стр. 13.

² ОВ L 395, 30.12.1989 г., стр. 13.

като има предвид, че установяването на референтни методи за анализ и изследване включва определянето на аналитичните процедури, които да се прилагат, и формулирането на критерии за точност, осигуряващи еднаквата интерпретация на резултатите;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящото решение са в съответствие със становището на Постоянния ветеринарен комитет,

РЕШИ:

Член 1

Определят се следните референтни процедури за анализ и изследване на суровото мляко:

- определяне точката на замръзване,
- изброяване на микроорганизмите – брой на микроорганизмите при температура 30 °C,
- изброяване на соматичните клетки,
- доказване на антибиотици и сулфонамиди.

Член 2

Определят се следните референтни процедури за анализ и изследване на пастеризираното мляко:

- определяне точката на замръзване;
- определяне на фосфатазната активност;
- определяне на пероксидазната активност;
- изброяване на микроорганизмите - брой на микроорганизмите при температура 30 °C;
- изброяване на микроорганизмите - брой на микроорганизмите при температура 21 °C;
- изброяване на колиформите - брой колонии при температура 30 °C;
- доказване на антибиотици и сулфонамиди;
- доказване на патогенни организми.

Член 3

Определят се следните референтни процедури за анализ и изследване на стерилизираното и произведеното по УНТ технология мляко:

- изброяване на микроорганизмите - брой на микроорганизмите при температура 30 °C;
- определяне точката на замръзване;
- доказване на антибиотици и сулфонамиди.

Член 4

Прилагането на така определените референтни процедури за анализ и изследване, определянето на критериите за точност и вземането и събирането на проби трябва да се извършват в съответствие с правилата, предвидени в приложение 1.

Член 5

Посочените в членове 1, 2 и 3 референтни процедури за анализ и изследване се определят в приложение 2.

Член 6

Настоящото решение подлежи на преразглеждане преди 31 декември 1992 г. с оглед отразяването на последните достижения на научно-техническото познание.

Член 7

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 14 февруари 1991 година.

За Комисията:

Ray MAC SHARRY

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ I

СЪДЪРЖАНИЕ

Страница

I. Общи разпоредби 4

II. Вземане на проби от сурово и топлинно обработено мляко 6

I. ОБЩИ РАЗПОРЕДБИ

1. Въведение

Определят се общите разпоредби по отношение на реактивите, апаратурата, изчисляването на резултатите, точността на определяне и протоколите от изследваните проби. Компетентните органи на държавите-членки и контролните лаборатории, отговорни за вземане на пробите и изследването на млякото, се задължават да ги съблюдават.

2. Реактиви

2.1. Вода

2.1.1. Освен ако не е предвидено друго, под вода, която се използва за разтвор, разреждане или промиване се разбира дестилирана, дейонизирана или деминерализирана вода с най-малко равностойна чистота. За целите на микробиологичния анализ се използва вода, свободна от вещества, които могат да засегнат или повлияят на растежа на микроорганизмите в условията на изследване.

2.1.2. Под „разтвор“ или „разреждане“, за които няма допълнителни указания, се разбира „разтвор във вода“ или „разреждане с вода“.

2.2. Химикали

Освен ако не е предвидено друго, използваните химикали са чисти за анализ субстанции (ч.з.а).

3. Апаратура

3.1. Списък на апаратурата

Апаратурата, описана за прилагането на отделните референтни методи, съдържа единствено части, предназначени за специализирана употреба, и части, които са обект на конкретна спецификация.

3.2. Аналитични везни

Под „аналитична везни“ се разбира везни със стойност на едно деление от скалата 0,1 mg.

4. Изчисляване на резултатите

4.1. Резултати

Освен ако не е предвидено друго, резултатите, обявени в протокола от анализа, се изчисляват като средната аритметична стойност, получена от две изследвания, които отговарят на критерия за повторяемост (вж. точка 5.1), определен за съответния метод. В случай че критерият за повторяемост не е изпълнен, изследването се повтаря или резултатът се обявява за невалиден.

4.2. Изчисляване на процентното съдържание

Освен ако не е предвидено друго, резултатите от изследванията се изчисляват като проценти от масата на пробата.

5. Критерии за точност: повторяемост и възпроизводимост

5.1. Критериите за точност за всеки отделен метод са, както следва:

5.1.1. *Повторяемост (r)*: стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени чрез прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал при еднакви условия на провеждане (лице, което провежда изследването, апаратура, лаборатория и през кратък интервал от време).

5.1.2. *Възпроизводимост (R)*: стойността, под която се отчита абсолютната разлика между резултатите от две отделни изследвания, получени при прилагането на една и съща процедура върху идентичен тест-материал, но в различни условия (различни лица, провеждащи изпитанието, апаратура, лаборатории и време на провеждане).

5.1.3. Освен ако не е предвидено друго за всеки отделен метод, стойностите за изпълнение на критериите за повторяемост и възпроизводимост за всяка процедура са в доверителен интервал 95 %, определен в стандарт ISO 5725 (второ издание, 1986 г.). Те се изчисляват от резултатите, получени вследствие на признати съвместни опити за оценка на процедурата. За някои процедури обаче такива опити не са провеждани. В тези случаи стойностите на повторяемостта и възпроизводимостта се изчисляват приблизително.

5.1.4. Съвместните опити и проучвания, определени в 5.1.3. се планират и провеждат в съответствие с международно признатите насоки.

6. Протокол от изследването

В протокола от изследването се посочва използваният метод на анализ и получените от изследването резултати. Допълнително се вписва подробна информация за приложената неспецифична или незадължителна за метода на анализа процедура, както и всички останали обстоятелства, които биха могли да повлияят на получените резултати. Протоколът съдържа всички необходими данни за пълната идентификация на пробата.

II. ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ ОТ СУРОВО И ТОПЛИННО ОБРАБОТЕНО МЛЯКО

1. Цел и приложение

Процедурата определя референтния метод за вземане на проби от сурово и топлинно обработено мляко. Процедурите за вземане на проби, тяхното транспортиране и съхранение се прилагат за суровото мляко от производител, както и за суровото и топлинно обработеното мляко в танкове за съхранение и транспорт.

Процедурите, описани в точка 2, 4.4., 5 и 6, се отнасят до вземането на проби от топлинно обработено мляко, предназначено за пряка консумация.

2. Общи правила за вземане на проби

Взимането на проби от сурово и топлинно обработено мляко от бидони, танкове и др. се извършва от квалифициран персонал, преминал през необходимото за целта обучение преди вземането на пробата.

По преценка на компетентните органи или контролните лаборатории персоналят, се обучава на специални техники и начини за вземане на пробите, гарантиращи представителността и съответствието на пробата с цялата партида мляко.

По преценка на компетентните органи или контролните лаборатории, персоналят се обучава на начините за маркиране на пробите, гарантиращи еднозначното идентифициране на пробите.

3. Прибори и апаратура за вземане на проби

3.1. Общи изисквания

За вземане на проби се използват прибори и апаратура от неръждаема стомана или друг подходящ материал с необходимата якост, конструирани за съответната цел (смесване, вземане на проби и т.н.). Буталата и бъркалките, използвани за разбъркване на течности в контейнери трябва да имат достатъчна площ, осигуряваща правилното разбъркване на продукта, без да предизвикват гранясал вкус мирис. Лъжиците трябва да имат достатъчно дълга и здрава дръжка, която да позволява взимането на млечна проба на всяка дълбочина на контейнера. Вместимостта на лъжицата е не по-малко от 50 ml.

Контейнерите, в които се поставят пробите, и запушалките следва да са от стъкло или подходящ метал и пластмаса.

Материалът, от който са направени приборите и апаратурата за взимане на проби (включително и контейнерите и запушалките), не трябва да предизвиква промени в пробата, които биха могли да повлияят на резултатите от изследването. Всички повърхности на използваната апаратура за вземане на проби и на контейнерите са чисти и сухи, гладки, без пукнатини и със заоблени ръбове.

3.2. Прибори и апаратура за вземане на проби за микробиологично изследване

Освен че трябва да отговарят на изискванията в точка 3.1, приборите и апаратурата в това число и контейнерите, в които се поставя пробата, трябва да бъдат стерилни.

Ако се използват за следващо взимане на проби, приборите и апаратурата се измиват и стерилизират в съответствие с инструкциите или изискванията на контролната

лаборатория или националния компетентен орган, с което да се осигури интегралността на поредните проби.

4. Техники за вземане на проби

4.1. Общи изисквания

Независимо от характера на изследванията, които се провеждат, преди взимането на проба млякото трябва да бъде добре разбъркано чрез ръчни или механични средства.

Пробата се взема непосредствено след разбъркване на млякото преди течността да е достигнала състояние на покой.

При едновременното вземане на проби от танкове за различни изследвания първо се взема пробата за микробиологично изследване.

Обемът на пробата съответства на изискванията за изследване. Контейнерите, в които се поставят пробите, имат вместимост, която позволява те да бъдат почти изцяло напълнени с пробата, като така се осигурява добро смесване на съдържанието преди изследването, но се възпрепятства отделянето на мазнини при транспортиране.

4.2. Ръчно вземане на проби

4. 2.1.Вземане на проби от гюмове и бидони

Размесването на млякото се извършва чрез бързо движение нагоре и надолу на буталото в бидона или гюма, като в същото време то осигурява добро разбъркване и не позволява по гърлото на съда да се отложи сметана. Получаването на представителна за цялата партида проба се извършва в съответствие с точка 4.2.4.

4.2.2. Вземане на проби от охладени танкове или вани от стопанствата

Млякото се размесва механично или ръчно до постигане на необходимата хомогенност.

Ако количеството млякото не позволява работата на механичната бъркалка, манипулацията се извършва ръчно.

4.2.3. Вземане на проби от мерителен съд

Важно е при изсипването му в мерителен съд млякото да бъде правилно разбъркано, при което може да се наложи допълнително ръчно или механично размесване, осигуряващо равномерното разпределение на мазнината в него. В случай че обемът на партидата, от която се взема пробата, е по-голям от вместимостта на мерителния съд, се прави представителна за цялата пратка проба съгласно изискванията по точка 4.2.4.

4.2.4. Вземане на проби от партида мляко в различни контейнери

В случай че млякото, от което ще се взема проба, е поставено в повече от един контейнер, от всеки контейнер се взема представително количество, като се отчита

неговото качество. Части от представителните количества се смесват пропорционално на количеството мляко, съдържащо се в контейнера, от който е взета пробата, освен ако млечните проби от всеки контейнер не се изследват поотделно. Проби от съответните пропорционални количества мляко в контейнерите се взимат след разбъркване.

4.2.5. Взимане на проби от големи съдове - танкове, предназначени за съхранение, железопътен и автомобилен транспорт на млякото

4.2.5.1. Преди вземане на пробите млякото се разбърква, като се прилага съответната за целта процедура.

За смесване на съдържанието в големи съдове, предназначени за съхранение, железопътен или автомобилен транспорт на млякото, се препоръчва механично разбъркване (вж.точка 4.2.5.2).

Степента на разбъркване трябва да съответства на времето, в което млякото е било в покой. Ефективността на разбъркването за всеки отделен случай се определя като адекватна в зависимост от целите на предвидения анализ; критерият за ефективност на разбъркването на млякото влияе по-специално на сходността на резултатите от изследването на проби, взети от различни части на пратката, или от отвора на танка през различни интервали при изпразването на съда. Разбъркването на млякото се счита за ефективно, ако разликата в масленото съдържание на две проби, взети при тези условия, е по-малка от 0,1 %.

В големи съдове с долно изпускане е възможно събирането на малко количество мляко при отвора, което не е представително за цялото съдържание на съда дори и след разбъркване. Затова се препоръчва взимането на пробите да става посредством ревизионен отвор. За да се осигури представителността на проба, взета от отвора за източване, се изпуска достатъчно количество мляко.

4.2.5.2. Разбъркването в големи съдове, предназначени за съхранение, железопътен или автомобилен превоз на млякото, се осъществява чрез:

- механична бъркалка, вградена в танка и задвижвана от електромотор;
- перка или бъркалка, потопена в млякото, задвижвана от електромотор и монтирана на ревизионния люк;
- за танкове за железопътен и автомобилен превоз на млякото – чрез рецикулация на млякото през маркуча за прехвърляне на течността, прикрепен към източващите помпи на танка, въведен през ревизионния отвор;
- чрез чист филтриран въздух под налягане, като в случая се използват минимално въздушно налягане и обем, за да се избегне създаването на гранясал мирис.

4.3. Автоматично или полуавтоматично вземане на проби

Автоматичните и полуавтоматични уреди за вземане на проби от сурово мляко от производител се използват в съответствие с указанията на контролната лаборатория или друг компетентен орган.

Преди и периодически по време на използването им уредите се подлагат на съответните проверки, установени от отговорния орган. Приложимостта на процедурите за взимане на проби се проверява с цел да се определи:

- минималния обем събрано мляко, от което могат да се вземат правилно проби;
- задържаното количество (свързано с минималния обем на пробата);
- възможността за получаване на представителна проба след правилното разбъркване на цялото количество.

При използването на автоматични или полуавтоматични уреди компетентният национален орган може да разпорежи:

- минималния обем мляко, от което се взима пробата;
- минималния обем на пробата;
- максималното задържано количество;
- вида на анализа, който може да се извърши, и необходимите предпазни мерки.

4.4. Вземане на проби от топлинно обработено мляко, предназначено за пряка консумация, в разфасовки на дребно

Пробите от топлинно обработено мляко в разфасовки на дребно, предназначено за пряка консумация, се представят в цели запечатани опаковки. При възможност пробите трябва да се взимат директно от опаковъчната машина или охладителната зала на предприятието непосредствено след преработката, а за пастьоризираното мляко в деня на преработката.

Вземат се проби от всеки отделен вид топлинно обработено мляко (пастьоризирано, произведено по УНТ технология или стерилизирано), в брой, съответстващ на предстоящите изследвания, съгласно указанията на контролната лаборатория или друг компетентен орган.

5. Идентификация на пробата

Пробата се маркира с идентификационен код, който при използване указанията на контролната лаборатория или друг компетентен орган, позволява тя да бъде лесно и бързо идентифицирана (вж. точка 2).

6. Транспортиране и съхранение на пробите

Контролната лаборатория изготвя инструкции относно условията за транспортиране, съхранение и времето между взимането на пробата и анализа на млякото в зависимост от вида мляко и методиката на последващия анализ. Инструкциите трябва да включват следните изисквания:

- по време на транспорта и съхранението се вземат предпазни мерки с цел пробите да не се излагат на влиянието на вредни миризми и на пряка слънчева светлина. Ако контейнерът, в който е поставена пробата, е прозрачен, той се съхранява на тъмно.

- пробите от сурово мляко за микробиологичен анализ се транспортират и съхраняват при температура между 0 °C и 4 °C. Времето между взимането на пробата и изследването ѝ е възможно най-кратко, но в никакъв случай повече от 36 часа. Компетентните органи могат да допуснат млякото да бъде съхранявано и при температура от 0 °C до 6 °C, ако времето между взимането на пробата и анализа е не повече от 24 часа;
- пробите от пастьоризирано мляко за микробиологичен анализ се транспортират и съхраняват при температура от 0 °C до 4 °C. Времето между взимането на пробата и изследването ѝ е възможно най-кратко, и в никакъв случай повече от 24 часа;
- пробите за микробиологичен анализ от мляко, различно от суровото и пастьоризираното, се съхраняват при лабораторни условия в хладилник, а времето между взимането им и анализа е възможно най-кратко.

За някои от анализите се изискват специални предпазни мерки при различните процедури.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

СЪДЪРЖАНИЕ

Страница

*****[Please insert the numbers of pages from original]*****

I. Определяне точката на замръзване

II. Определяне на фосфатазната активност

III. Определяне на пероксидазната активност

IV. Изброяване на микроорганизмите - общ брой на микроорганизмите при температура 30 °C

V. Изброяване на микроорганизмите - общ брой на микроорганизмите при температура 21 °C

VI. Изброяване на колиформите - брой на колонииите при температура 30 °C

VII. Изброяване на соматичните клетки

VIII. Доказване на антибиотици и сулфонамиди

IX. Доказване на патогенни микроорганизми

I. ОПРЕДЕЛЯНЕ ТОЧКАТА НА ЗАМРЪЗВАНЕ

1. Цел и приложение

Настоящата процедура определя референтния метод за определяне точката на замръзване на суровото, пастьоризираното, произведеното по УНТ технология и

стерилизирано пълномаслено, частично и напълно обезмаслено мляко посредством уред (термисторен криоскоп), в който термостатично регулираната баня се охлажда чрез електрическо изстудяване, а живачният термометър е заменен от термисторна сонда.

Достъпни са два вида уреди. Единият проследява достигането на максималната точка на замръзване върху „платото“ на кривата на замръзване, а другият по търговски съображения, е конструиран да отчита стойностите през точно определени интервали след началото на замръзването. Предвид разликите между кривите на замръзване както на различните видове мляко, така и на млякото и стандартните разтвори, референтният метод налага използването на уредите, проследяващи достигането на плато от кривата. Уредите с определен интервал на отчитане могат да бъдат използвани за рутинни контролни измервания.

Точката на замръзване може да бъде използвана за определяне количеството примеси на вода в млякото, ако киселинността на пробата не надвишава 0,18 g млечна киселина в 100 ml (вж. точка 7.4).

2. Дефиниция

Точка на замръзване на млякото: стойността, получена вследствие на измервания, проведени съгласно описания метод и изразена в градуси по Целзий (°C).

3. Принцип

Определена тест-порция от млякото се преохлажда до съответната температура в зависимост от уреда и чрез механична вибрация, която кара температурата да се покачи бързо до определено плато, съответстващо на точката на замръзване на пробата, се предизвиква кристализация.

Уредът се калибрира чрез настройка за получаване на точни резултати за два стандартни разтвора въз основа на същата процедура, използвана и за пробата мляко. При тези условия платото съответства на точката на замръзване на млякото в градуси по Целзий.

4. Апаратура и лабораторна стъклария

4.1. Криоскоп

Криоскопът се състои от термостатично регулирана охлаждаща баня, термисторна сонда (полупроводников резисторен термометър) със свързана с нея електрическа верига и галванометър или отчитащо устройство, бъркалка за проби, уред за инициране на замръзване, епруветки за проби.

4.1.1. Охлаждаща баня

Използват се два вида охлаждащи бани.

4.1.1.1. Имерсионен вид

Добре изолирана баня с подходяща охлаждаща течност, която се разбърква така че температурната разлика между всеки две точки от обема на течността да не е по-

голяма от 0,2 °C. Температурата на течността не може да варира с повече от 0,5 °C от обявената от производителя стойност.

Важно е течността в охлаждащата баня да се поддържа на постоянно ниво. покрива Цялата повърхност на епруветката с пробата, намираща се под обемната мярка на стъклото, се покрива от охлаждащата течност.

4.1.1.2. Циркуляционен вид

Осигурява се постоянен приток на подходяща охлаждаща течност, циркулираща около епруветката. Температурата на течността не може да варира с повече от 0,5 °C от обявената от производителя стойност.

Подходяща охлаждаща течност е 33 % (v/v) воден разтвор на етан 1,2 диол (етилен гликол).

4.1.2. Термистор и придружаваща го електрическа верига

Термисторът е от типа на стъклената сонда с диаметър, не по-голям от $1,80 \pm 0,2$ mm и определящ диаметър, не по-голям от 0,31 mm. Времовата константа на термистора е по-малка от 2 секунди, а стойността на β (вж. бележката) е висока. Постоянното работно напрежение, стойността на тока и топлинното разсейване трябва да бъдат такива, че температурата на термистора да не се повишава с повече от 0,0005 °C от тази на заобикалящата го среда, -0,512 °C. Максимално допустимото отклонение в съпротивлението е ± 5 %.

Когато сондата е в работно положение в криоскопа, стъкленият ѝ връх лежи по вертикалната ос на епруветката на разстояние $44,6 \pm 0,1$ mm под отвора на съда (вж. фигурана стр. 15). За поставянето на сондата в това положение се използва шаблон.

Бележка:

β определя характеристиките на температурно съпротивление на термистора по формулата:

[Please insert formula from original]

където:

T е температурата по Келвин;

R е съпротивлението в омове при температура T;

[Please insert formula from original] е температурният коефициент,

β константа, чиято стойност зависи от материала, от който е направен термисторът. В сега съществуващата практика се препоръчва стойност, по-голяма от 3 000.

4.1.3. Устройство за измерване и отчитане

4.1.3.1. Принцип на измерване

Използваният уред работи на принципа на отчитане достигането на първото „плато“ от кривата на замръзване. Платото е този сектор от кривата, в който температурата остава постоянна в интервал от $\pm 0,002$ °C в продължение на минимум 20 секунди.

4.1.3.2. Ръчна операция

Съпротивлението на термистора се стабилизира посредством уитстонов мост или друго подобно устройство, за което се използват устойчиви резистори с най-високо качество с допустимо отклонение не по-голямо от ± 10 % и температурен коефициент, не по-висок от 2×10^{-5} °C.

Променливият (стабилизиращ) резистор не може да се отклонява от линейността на тока по целия обхват на веригата с повече от 0,3 % от максималната му стойност.

Необходимо е да се предвиди средство за коригиране и настройка на резисторите за целите на калибрирането.

Измервателната скала се градуира на интервали, не по-големи от 0,001 °C.

4.1.3.3. Автоматична операция

Отчитащото устройство осигурява точност, позволяваща отчитането на разлики от поне 0,001 °C в температурния интервал от 0 до -1 °C.

Точността на отчитащото устройство и свързаната с него електрическа верига е такава, че разликата между последователните индикации на една и съща температура да не е по-голяма от 0,001 °C.

Линейността на тока по веригата е такава, че при правилна работа с уреда в нито една точка от интервала $-0,400$ °C до $-0,600$ °C допустимата грешка да не е по-голяма от $\pm 0,001$.

4.1.4. Бъркалка

За разбъркването на тест-порция се използва бъркалка от неутрален към съставките на млякото метал, с диаметър 1- 1,5 mm.

Бъркалната се настройва за амплитудата на вибрации и се потапя вертикално, като долният ѝ край се изравнява със стъкления връх на термисторната сонда. Допуска се отклонение от 1,5 mm над и под това ниво.

Бъркалната вибрира странично с амплитуда съгласно указанията на производителя (не по-малка от $\pm 1,5$ mm), за да се осигури еднаква и равномерна температура на тест-порцията по време на определянето. В нито един момент от нормалното разбъркване на пробата не се допуска контакт на бъркалната със сондата или стената на епруветката.

4.1.5. Устройство за предизвикване на замръзването

Това може да бъде всяко устройство, което, приведено в работен режим, предизвиква незабавно замръзване на пробата, така че температурата на тест-порцията нараства към точката на замръзване. За тази цел може да се използва

бъркалката - един от начините е да се увеличи амплитудата на вибрации за около една до две секунди, така че бъркалката да влезе в контакт със стената на епруветката с пробата.

4.1.6. Епруветки за пробата

Епруветки за пробата (вж. фигура 1), стъклени, с дължина $50,8 \pm 0,1$ mm, външен диаметър $16,0 \pm 0,1$ mm и вътрешен диаметър $13,5 \pm 0,1$ mm. Допустимата разлика в дебелината на стените е не повече от 0,1 mm.

Епруветките са означени с обемна мярка от 29,8 mm под края (21 mm над основата на съда) за обозначаване обем на пробата от $2,5 \pm 0,1$ ml.

4.1.7. Електрическо захранване

Напрежението на захранващия източник се стабилизира в уреда или чрез външен стабилизатор така че флукуацията да не превишава ± 1 % от номиналната стойност при променливост на тока в мрежата от ± 6 %.

4.2. Аналитични везни

4.3. *Мерителна колба с единична обемна марка* и вместимост 1 000 ml, клас А.

4.4. *Сушилня* с добра вентилация, поддържаща температура от 130 ± 1 °C

или

електрическа пещ с вентилация, поддържаща температура от 300 ± 25 °C.

4.5. Ексикатор

5. Реактиви

5.1. *Дестилирана в боросиликатно стъкло вода*, нагрята до кипене и охладена до температура 20 ± 2 °C, поставена в колба, снабдена с епруветка за абсорбиране на въглеродния двуокис.

5.2. *Натриев хлорид*, ч.з.а, фино смлян и изсушен в пещ при температура 300 ± 25 °C в продължение на 5 часа или в сушилня при температура 130 ± 1 °C за не по-малко от 24 часа и охладен до стайна температура в ефективен ексикатор.

5.3. Приготвяне на стандартни разтвори

Съответното количество сух натриев хлорид (точка 5.2) (вж. таблица 1) се претегля в тегловно стъкло. Разтваря се в дестилирана вода (точка 5.1) и се прехвърля количествено в мерителна колба от 1 000 ml с единична обемна марка, след което се разрежда с водата до обемната марка при температура 20 ± 2 °C.

Така полученият разтвор се съхранява при температура от около 5 °C в добре затворени полиетиленови бутилки с вместимост не повече от 250 ml в продължение на не повече от два месеца.

Точка на замръзване на разтворите на натриев хлорид при температура 20 °C

g NaCl/l	°C
[Please insert table content from original]	

Преди употреба полиетиленовата бутилка със стандартния разтвор се обръща внимателно и се разклаща неколkokратно с кръгообразни движения до хомогенното смесване на съдържанието. В нито един момент разтворът не трябва да се разбърква енергично, тъй като това води до образуването на мехурчета и поемане на въздух.

Пробите със стандартния разтвор се прехвърлят от бутилката чрез преливане в чиста и суха бехерова чаша, т.е. забранява се прехвърлянето на разтвора посредством пипети.

Не се допуска използването на разтвори, съхранявани в бутилки, напълнени в обем, по-малък от една четвърт, както и употребата на разтвори, престояли повече от два месеца, ако не са били третирани с фунгициден препарат (например разтвор на тиомерзал, 10 g/l).

6. Калибриране на криоскопа

Криоскопът трябва да бъде така конструиран, така че да не позволява отклонение на температурата на заобикалящата атмосфера от температурата на калибриране, по-голямо от 1 °C. Криоскопът не трябва да се излага на слънчева светлина, течение или стайна температура, по-висока от 26- 27 °C.

Извършва се проверка на работното състояние на криоскопа за съответствие с указанията на производителя; преди започването на калибрирането уредът се включва към захранващото устройство най-малко за 12 часа. Проверява се положението на сондата, амплитудата на трептенията на бъркалката и температурата на охлаждащия агент.

Избират се двата стандартни разтвора (вж. таблица 1 по-горе) с най-точно приближение до очакваната точка на замръзване на пробите мляко, определени за изследване. Препоръчително е разликата между точките на замръзване на разтворите да не е по-малка от -0,100 °C.

(В някои от сега предлаганите модели криоскопи свързаната с термистора верига е конструирана така че се уравновесява при определена специфична стойност на точката на замръзване в обхвата на измерване на уреда. В този случай използването на стандартен разтвор с точка на замръзване като тази на калибриращите разтвори улеснява самото калибриране, като производителят задължително обявява посочената стойност.)

2,5 ± 0,1 ml от даден стандартен разтвор се отпипетира в чиста и суха епруветка с пробата за изследване, след което се измерва с криоскопа.

Бележка

Епруветките с пробите за калибриране следва да бъдат от същото стъкло, изплакнати и промити с деминерализирана вода едновременно със стъклата за изследване на

пробите мляко. Температурата на стандартните разтвори трябва да е сходна с тази на пробите мляко.

Калибрационните контроли се настройват съгласно указанията на производителя, докато отчетените от криоскопа резултати се изравнят с точката на замръзване на стандартния разтвор. Процедурата продължава със следващия стандартен разтвор и се продължава чрез редуване на разтворите, докато две последователни отчитания за всеки стандартен разтвор отчетат точната стойност на точката му на замръзване без допълнителна корекция на контролите. Криоскопът е приведен в работен режим и е подготвен да отчита директно точката на замръзване на пробата с мляко без допълнителни корекции.

7. Подготовка на пробите за изследване

7.1. При необходимост пробите се съхраняват при температура от 0 до 5 °C.

7.2. При необходимост от пробата се отстраняват всички видими чужди тела или твърди маслени образувания, чрез филтриране в чист и сух съд, след което съдържанието се разбърква внимателно. Използваният филтър трябва да бъде от неутрален към млякото материал, за работа при лабораторна температура.

7.3. Млякото може да бъде изследвано при температурата, при която се съхранява (0-5 °C) или след уеднаквяване с лабораторната температура непосредствено преди началото на анализа. Необходимо е обаче температурата на стандартните разтвори и тази на пробите мляко да бъдат еднакви.

7.4. Титруемата киселинност на млякото се определя по възможност едновременно с определяне точката на замръзване. Проби, чиято киселинност превишава 0,18 g млечна киселина на 100 ml, не могат да бъдат изследвани.

7.5. Произведеното по УНТ технология мляко и стерилизираното мляко трябва да престоят в отворен контейнер поне 20 минути преди началото на анализа.

8. Процедура

8.1. Предварителни проверки

Проверява се дали нивото и температурата на охлаждащия агент съответстват на указанията на производителя и ако е необходимо, дали сондата на термистора е в празна епруветка във ваната за проби. Криоскопът се включва, проверява се дали охлаждащата течност се разбърква или циркулира правилно. След като уредът е работил най-малко 12 часа, се проверява температурата на охлаждащата течност и положението и амплитудата на вибрации на бъркалката.

8.2. Рутинна проверка на калибрирането

Преди всяко изследване се измерва точката на замръзване на стандартния разтвор на натриев хлорид (например разтвор с точка на замръзване $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$), докато разликата между две последователни определяния стане не по-голяма от $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ако усреднената стойност се различава с повече от $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$ от точката на замръзване на стандартния разтвор, криоскопът се калибрира отново, както е описано в точка 6.

Ако уредът е бил в продължителна употреба, се извършва рутинна проверка на калибрирането най-малко един път месечно при спазване указанията на производителя.

8.3. *Определяне точката на замръзване на млякото*

Стъклото с пробата мляко се обръща внимателно и се разклаща с кръгообразни движения до хомогенното смесване на съдържанието. В нито един момент то не трябва да бъде енергично разбърквано, за да не се образуват мехурчета.

Прехвърлят се $2,5 \pm 0,1$ ml мляко в чиста и суха епруветка с пипета; отстранява се излишното количество с пипета. Проверява се дали сондата и бъркалката са чисти и сухи, а при необходимост се забърсват отдолу нагоре с мека и чиста кърпа, която не оставя влакна.

Епруветката с пробата мляко се поставя в калибрирания криоскоп, като се спазват указанията на производителя. Млякото се охлажда и замръзването започва при температура, определена от производителя с разлика от $0,1$ °C.

(На някои автоматични уреди тази температура се отчита на дигиталното четящо устройство; необходимата прецизност на ръчните уреди се постига след проверка, че замръзването започва, когато стрелката или визирната линия на галванометъра съвпадне със съответното обозначение.)

Ако по някаква причина замръзването започне след или преди достигането на определените температурни граници, изследването се прекратява и се повтаря с нова тест-порция. Ако и при повторната проба млякото замръзне преди определената температура, загрява се допълнителна тест-порция до 45 °C в продължение на пет минути до разтопяване на кристализиралата мазнина.

Охлажда се отново до температурата на изследване и се изследва. След предизвикване на замръзването температурата на млякото се повишава бързо до временно константна величина, след което отново спада. Температурата на замръзване съответства на най-високата температура, постигната през това време; тази стойност се регистрира.

Бележка

Времето, през което температурата остава константна, и времето между предизвикването на замръзването и достигането на най-високата температура е различно за различните проби и значително по-кратко за водата и стандартните разтвори на натриев хлорид в сравнение с млякото. Важно е да се запише най-високата температура.

След успешното провеждане на измерването епруветката се изважда, изплаква с вода, а термисторната сонда и бъркалката се изсушават отдолу нагоре с мека и чиста кърпа, която не оставя власинки; след това се извършва паралелно определяне върху друга част от пробата с мляко.

Ако разликата между получените точки на замръзване е по-голяма от стойността на повтораемост ($0,004$ °C), прави се паралелно определяне върху друга част от

пробата. Ако съответствието между двете определяния е с точност до 0,004 °C, съответните стойности се записват и използват за изчисление на крайния резултат.

8.4. Охлаждане на сондата

След използване на уреда в отвора за епруветки се поставя празна епруветка и главата на термистора се сваля за поддържане на сондата охладена. (В някои модели криоскопи тази операция е невъзможна; в такива случаи е необходимо сондата да е правилно охладена преди извършване на измерванията, например чрез неколкостепенни празни определяния до регистрирането на стабилни отчитания.)

9. Представяне на резултатите

9.1. Изчисляване

Ако след рутинната проверка калибрирането бъде потвърдено, изчислява се средната стойност на получените допустими точки на замръзване и се закръглява до третия десетичен знак.

Ако сумата от две допустими паралелни определяния е нечетно число, средната стойност се закръглява до най-близкото четно число, както е показано в примера по-долу:

Точка на замръзване (°C)

Паралелни стойности	Средна стойност
[Please insert table content from original]	

9.2. Точност

9.2.1. Повторяемост (r): 0,004 °C.

9.2.2. Възпроизводимост (R): 0,006 °C.

Фигура 1

Термисторен криоскоп (точка 4.1) (положение на епруветката с пробата мляко спрямо стъкления край на термисторната сонда и бъркалката)

***[Please insert image from original and replace text as follows:

Mandrel – Държател (мандрел)

Sample tube - Епруветка

Stir wire - Бъркалка

Thermistor bead - Термисторна сонда

Всички размери са дадени в mm]***

II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ФОСФАТАЗНАТА АКТИВНОСТ

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне на фосфатазната активност в пастьоризираното мляко.

2. Дефиниция

2.1. *Фосфатазната активност* се определя от количеството на намиращата се в продукта активна алкална фосфатаза, изразена като количество фенол в микрограмове, освободено при описаните условия след влизане в реакция с 1 ml пастьоризирано мляко.

2.2. Мляко с фосфатазна активност под 4 $\mu\text{g/ml}$ се определя като фосфатазно отрицателно.

3. Принцип

Фосфатазната активност се определя от количеството фенол, освободен от динатриевия фенилфосфат, добавен към пробата. Освободеният фенол влиза в реакция с дибромохинон хлоримид и дава дибромоиндофенол (синкав на цвят), който се измерва колометрично при дължина на вълната 610 nm. Прави се сравнение с пробата, съдържаща разрушения фосфатазен ензим.

4. Реактиви

4.1. Буфер - бариева основа - борна киселина

4.1.1. Разтварят се 50,0 g бариева основа $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ във вода и разтворът се допълва до обем 1 000 ml.

4.1.2. Разтварят се 22,0 g борна киселина $[\text{H}_3\text{BO}_3]$ във вода и разтворът се допълва до обем 1 000 ml.

4.1.3. Загриват се 500 ml от всеки разтвор до 50 °C, след което разтворите се смесват добре, разбъркват се, и бързо се охлаждат до 20 °C; при необходимост рН се коригира до $10,6 \pm 0,1$ чрез добавянето на още разтвор (точка 4.1.1. или 4.1.2). Филтрира се и се съхранява в плътно затворен контейнер.

4.1.4. Преди употреба разтворът се разрежда с равен обем вода.

4.2. Буфер за проявяване на оцветяването

Разтварят се 6,0 g натриев метаборат (NaBO_2) или 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) с 20,0 g натриев хлорид (NaCl) във вода и разтворът се допълва до обем 1 000 ml.

4.3. Буфер за разреждане на оцветяването

Разреждат се 10 ml от буфера за проявяване на оцветяването (точка 4.2) се разрежда с вода до 100 ml.

4.4. Буферен субстрат

Разтваря се 0,1 g обезводнен, свободен от фенол динатриев фенилфосфат в 100 ml буфер (точка 4.1.3) или 0,5 g динатриев фенилфосфат се разтваря в 4,5 ml буфер за проявяване на оцветяването (точка 4.2), прибавят се две капки дибромхинон хлоримид (точка 4.6 - BQC-разтвор) и се оставя да престои на стайна температура 30 мин. Полученото оцветяване се екстрахира с 2,5 ml бутан-1-ол и се оставя да престои до отделянето на бутан-1-ол, след което последният се декантира и изхвърля. При необходимост екстракцията се повтаря.

Разтворът може да се съхранява в хладилник за няколко дни; преди употреба оцветяването се проявява и екстрахира отново. Буферният субстрат се приготвя непосредствено преди употреба, като 1 ml от този разтвор се разрежда с буферния разтвор (точка 4.1.3) до 100 ml.

4.5. Цинково-меден утаителен агент

Разтварят се 3,0 g цинков сулфат ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,6 g меден (II) сулфат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) във вода и разтворът се допълва до обем от 100 ml.

4.6. 2,6-дибромхинон хлоримид (BQC – разтвор)

Разтварят се 40 ± 1 mg 2,6-дибромхинон хлоримид (BQC) ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) в 10 ml етанол 96 % (o/o).

Разтворът се съхранява в тъмно стъкло в хладилник. При промяна в цвета или престой от един месец се изхвърля.

4.7. Разтвор на меден сулфат (II)

Разтварят се 0,05 g меден (II) сулфат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) във вода и разтворът се допълва до обем от 100 ml.

4.8. Стандартен фенолов разтвор

4.8.1. Претеглят се 200 ± 2 mg чист безводен фенол и се прехвърля в мерителна колба от 100 ml, разтваря се с вода, смесва се и се допълва до марката. Съхраняван в хладилник, този основен разтвор е годен за употреба в продължение на няколко месеца.

4.8.2. Разреждат се 10 ml от основния разтвор с вода до 100 ml. Разтворът се смесва добре. 1 ml съдържа 200 μg фенол.

5. Апаратура и лабораторна стъклария

Бележки:

а) Лабораторната стъклария, запушалките и приборите за вземане на проби трябва да бъдат внимателно почистени. Препоръчва се да се изплакнат с прясно преварена дестилирана вода или да се третират с пара.

б) Някои пластмасови запушалки могат да причинят замърсяване с фенол, поради което не се разрешава използването им.

Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:

5.1. *Аналитични везни*

5.2. *Водна баня* с контролирана температура на 37 ± 1 °C

5.3. *Спектрофотометър* с възможност за отчитане при дължина на вълната от 610 nm

5.4. *Епруветки* с размери 16 или 18 mm x 150 mm, градуирани за предпочитане на 5 и 10 ml

5.5. *Пипети*

5.6. *Стъклени фунии* с подходяща големина и диаметър 5 cm

5.7. *Нагънати филтри* с диаметър не по-малък от 9 cm за средна скорост на филтрация.

5.8. *Мерителни колби* за подготовка на стандартни разтвори.

6. Процедура

Бележки:

а) Да се избягва влиянието на пряката слънчева светлина по време на определянето.

б) Да се избягва замърсяването със следи от слюнка или пот, тъй като това води до неточни положителни резултати. Специално внимание да се обърне на пипетирането.

6.1. Подготовка на пробата за изследване

6.1.1. Анализът се извършва веднага след взимане на пробата. В противен случай пробата се съхранява в хладилник.

6.2. Тест-порция

С помощта на пипета се поставя по 1 ml от пробата за изследване в две епруветки (точка 5.4), една от които служи за провеждане на контролата или празната проба.

6.3. Определяне

6.3.1. Празната проба се нагрива в кипяща вода за две минути; епруетката и бежеровата чаша с кипяща вода се покриват с алуминиево фолио, така че да се загрее цялата епруетката. Охлажда се бързо до стайна температура.

6.3.2. До края на процедурата празната проба и пробата за изследване се третира по един и същи начин. Прибавя се по 10 ml от буферния субстрат (точка 4.4) и съдържанието се размесва добре.

6.3.3. Пробите се поставят незабавно във водна баня (точка 5.2) за 60 минути, като съдържанието им се разбърква периодично (не по-малко от четири пъти).

6.3.4. Епруветките се нагряват на кипяща вода за две минути, както е описано в точка 6.3.1, след което се охлаждат бързо до стайна температура.

6.3.5. Към всяка епруветка се прибавя по 1 ml от цинково-медния утайтел (точка 4.5) и съдържанието се разбърква добре.

6.3.6. Филтрира се през суха филтърна хартия. Първите 2 ml се изхвърлят; при необходимост се филтрира отново до пълното избистряне на филтрата, след което 5 ml от бистрия филтрат се поставят в епруветка.

6.3.7. Прибавят се 5 ml от буфера за проявяване на оцветяването (точка 4.2).

6.3.8. Добавя се 0,1 ml от ВQC-разтвора (точка 4.6), съдържанието се смесва добре и се оставя на стайна температура в продължение на 30 мин., за да се прояви оцветяването..

6.3.9. Оптическата плътност се измерва чрез сравнение с контролната или празната проба в спектрофотометър (точка 5.3) при дължина на вълната 610 nm.

6.3.10. Определянето се повтаря с подходящо разреждане на пробата, ако измерената съгласно точка 6.3.9 оптическа плътност е по-висока от тази на еталона, съдържащ 20 µg фенол във всяка епруветка, определен в съответствие с точка 6.4.4. Разреждането се приготвя чрез смесването на един обем от пробата за изследване с подходящ обем на част от същата проба, внимателно нагрята до кипене за дезактивиране на фосфатазата.

6.4. Построяване на стандартна крива

6.4.1. Приготвя се подходяща серия от разредени стандартни разтвори, като се започва от стандартния фенолов разтвор (4.8.2), съдържащ 0 (контрола или празна проба), 2, 5, 10 и 20 µg фенол на милилитър, след което в пет епруветки се отмерват съответно по 1 ml вода и 1 ml от четирите стандартни фенолови разтвора.

6.4.2. Към всяка епруветка се добавят 1 ml разтвор на меден (II) сулфат (точка 4.7), 5 ml от буфера за оцветяване на разреждането (точка 4.3), 3 ml вода и 0,1 ml ВQC-разтвор (точка 4.6), след което съдържанието се смесва.

6.4.3. Оставя се на стайна температура за 30 минути, за да се прояви оцветяването.

6.4.4. Оптическата плътност се измерва чрез сравнение с контролната или празната проба в спектрофотометър при дължина на вълната 610 nm (точка 5.3).

6.4.5. Изчислява се получената регресия чрез най-малкия корен квадратен въз основа на получените за всяко добавено количество фенол (точка 6.4.1) стойности на оптическата плътност (точка 6.4.4).

7. Изчисляване на резултатите

7.1. Изчисления и формули

7.1.1. Количеството фенол се изчислява въз основа на стойността на оптическата плътност (точка 6.3.9), като се използва получената регресия (точка 6.4.5).

7.1.2. Фосфатазната активност на пастьоризираното мляко, изразена в микрограмовете фенол на милилитър, се изчислява по формулата:

$$\text{Фосфатазна активност} = 2,4 \times A \times D,$$

където:

A количеството фенол в микрограмовете, получено по точка 7.1.1;

D фактор на разреждане на разтворите по точка 6.3.10 (при неразредени проби D = 1);

Факторът 2,4 е факторът на разреждане (5/12 от 1 ml проба за изследване). Вж. точка 6.2 във връзка с точки 6.3.2, 6.3.5 и 6.3.6.

7.2. Точност на определянето

7.2.1. Повторяемост (r): 2 µg фенол/ml.

7.2.2. Възпроизводимост (R): 3 (предварително) µg фенол/ml.

7.2.3. Ако разреждането се извършва съгласно точка 6.3.10 пределната стойност, определена в точка 7.2.1 и 7.2.2, се отнася към резултатите, получени при използването на разреждана проба.

III. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПЕРОКСИДАЗНАТА АКТИВНОСТ

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне наличието или липсата на ензима пероксидаза като критерий за ефективността на пастьоризацията.

2. Определение

Положителна реакция на пероксидаза:

Ако млякото е правилно пастьоризирано, след разбъркване в продължение на 30 секунди се появява синьо оцветяване.

Отрицателна реакция на пероксидаза:

След разбъркване в продължение на 30 секунди цветът на изследваната проба не се променя.

3. Принцип

Ензимът пероксидаза разлага въглеродния прекис. Освободеният кислород окислява безцветния 1,4-фенилендиамин в пурпурен индофенол (тест на Щорх). Интензивността на цвета е пропорционална на концентрацията на ензима.

4. Реактиви

4.1. Разтвор на 1,4-фенилендиамин

Разтварят се 2 g 1,4-фенилендиамин ($C_6H_8N_2$) в топла вода (50 °C) и разтворът се допълва до обем 100 ml. Съхранява се в кафява стъклена бутилка със стъклена запушалка на тъмно и хладно място. След като бъде приготвен, разтворът на 1,4-фенилендиамин образува седимент в рамките на ден или два, който се отстранява.

4.2. Разтвор на въглероден прекис

Разреждат се с вода 9 ml въглероден прекис (30 %) и се допълва до обем 100 ml. Разтворът се стабилизира, като се добавя 1 ml концентрирана сярна киселина на литър разтвор.

Разтворът на въглеродния прекис е годен за употреба в продължение на 1 месец, ако се съхранява на тъмно и хладно място в бутилка със стъклена запушалка, предотвратяваща какъвто и да било контакт с органични вещества.

5. Процедура

5.1. Поставят се 5 ml от изследваното мляко в чиста епруветка с подходяща запушалка.

5.2. Прибавя се 5 ml 1,4-фенилендиамин (точка 4.1).

5.3. Добавят се две капки въглероден прекис (точка 4.2).

5.4. След разбъркване се следи за появата на оцветяване в продължение на 30 секунди. Ако синьото оцветяване се появи 30 секунди след добавянето на реактивите, реакцията се определя като неспецифична.

IV. ИЗБРОЯВАНЕ НА МИКРООРГАНИЗМИТЕ - ОБЩ БРОЙ МИКРООРГАНИЗМИ СЛЕД КУЛТИВИРАНЕ ПРИ ТЕМПЕРАТУРА 30 °C

1. Приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за изброяване на микроорганизмите чрез метода за преброяване на колонии при температура 30 °C. Прилага се за суровото и пастьоризирано мляко, както и за произведеното по УНТ технология и стерилизирано мляко, предварително инкубирано при температура 30 °C в продължение на 15 дни.

2. Определение

Под обозначението „микроорганизми“ се разбират организми, способни да образуват броими колонии при аеробно култивиране при описаните условия.

3. Принцип

Определен обем от пробата с мляко за изследване се смесва с хранителна среда в петриеви панички и се инкубира при температура 30 °C в продължение на 72 часа. Определя се броят на колонии и се изчислява общият брой на микроорганизмите в 1 ml сурово или пастьоризирано мляко или в 0,1 ml предварително инкубирано мляко, произведено по УНТ технология или стерилизирано мляко.

4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:

4.1. Апаратура

4.1.1. Стерилизатор с горещ въздух за работа при температура от 170- 175 °С.

4.1.2. Автоклав за работа при температура 121 ± 1 °С.

4.1.3. Инкубатор, поддържащ температура от 30 ± 1 °С в цялото работно пространство.

4.1.4. рН-метър с компенсация на температурата и точност $\pm 0,1$ рН.

4.1.5. Водна баня с регулатор на температурата за работа при 45 ± 1 °С.

4.1.6. Лупа с увеличение 2- 4х.

4.1.7. Лупа с увеличение 8- 10х.

4.1.8. Броителна камера

4.1.9. Миксер за разбъркване на 1 ml от пробата или десетократно разреждане с 9 ml разредител, работещ на принципа на ексцентричната ротация.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки с подходящи запушалки и пространство за разбъркване и достатъчна вместимост за 10 ml основно разреждане или други десетократни разреждания.

4.2.2. Колби с вместимост от 150- 250 ml или епруветки с приблизителна вместимост от 20 ml за посяване на хранителната среда.

4.2.3. Пипети (с памучни запушалки) от стъкло или стерилен синтетичен материал със здрав край, с номинална вместимост от 1 ml и отвор с диаметър 1,75- 3 mm.

4.2.4. Петриеви панички от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал, с вътрешен диаметър на долната паничка от около 90- 100 mm и дълбочина минимум 10 mm. По дъното не се допускат неравности, които биха попречили на точното преброяването на колонии.

4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария

Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в сушилня с горещ въздух (точка 4.1.1) при температура от 170- 175 °С за не по-малко от един час;

б) в автоклав (точка 4.1.2) при температура 121 ± 1 °С за не по-малко от 20 минути.

При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да бъдат плътно затворени, а колбите трябва да са с отворени капаци.

Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата.

Пипетите се стерилизират в сушилня с горещ въздух (точка 4.1.1).

5. Хранителна среда - агар за изброяване на микроорганизмите

5.1. Състав:

Дрождев екстракт 2,5 g

Триптон 5,0 g

Глюкоза D (+) или декстроза 1,0 g

Обезмаслено мляко на прах 1,0 g

Агар 10- 15 g в зависимост от желиращите свойства на използвания агар

Вода 1 000 ml

Обезмасленото мляко на прах не може да съдържа от инхибиторни вещества. Това се установява чрез сравнителни изследвания, като се използва обезмаслено мляко на прах, за което се знае, че е свободно от инхибитори.

Приготвяне

Съставките се суспендират и разтварят във водата в следната последователност: дрождев екстракт, триптон, глюкоза и накрая обезмасленото мляко на прах. Нагриването на суспенсията улеснява манипулацията. Прибавя се агарът и се нагрива до кипене, като непрекъснато се разбърква до пълното му разтваряне или се разтваря на пара в продължение на 30 минути.

При необходимост се филтрира през филтърна хартия.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява рН на средата; при необходимост се коригира, така че след стерилизацията да е равна на $6,9 \pm 0,1$ при температура 25°C , като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина.

5.2. Разпределение, стерилизация и съхранение на хранителната среда

Средата (точка 5.1) се разлива в количества от 100- 150 ml в колби или 12- 15 ml в епруветки (точка 4.2.2), след което съдовете се затварят със запушалки.

Стерилизират се в автоклав (точка 4.1.2) при температура $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ за 15 минути.

Проверява се рН на средата.

Ако не бъде използвана веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура 1- 5 °C за не повече от месец, след като е била приготвена.

5.3. Готова суха хранителна среда, предлагана на пазара

Хранителната среда (точка 5.1) може да бъде приготвена и от готова суха среда, предлагана на пазара, като се спазват указанията на производителя. Ако средата не съдържа в състава си обезмаслено мляко на прах, то се прибавя непосредствено преди разтварянето.

Коригира се рН на $6,9 \pm 0,1$ при температура 25 °C, както е описано в точка 5.1, след което средата се разпределя в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указания в точка 5.2 начини.

6. Разредители

6.1. Пептон-солов разтвор

Състав:

Пептон 1,0 g;

Натриев хлорид (NaCl) 8,5 g;

Вода 1 000 ml.

Приготвяне

Съставките се разтварят във вода; при необходимост разтворът се нагрява.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява рН на средата; при необходимост се коригира, като се използва разтвор (не по-малко от 0,1 mol/l) на натриева основа или солна киселина, така че след стерилизацията да е равна на $7,0 \pm 0,1$ при температура 25 °C.

6.2. Разпределение, стерилизация и съхранение на разредителя

Разредителят (точка 6.1) се разделя в епруветки (точка 4.2.1) в такива количества, че след стерилизацията обемът на разредителя да е равен на $9,0 \pm 0,2$ ml, след което епруветките се затварят със запушалки.

Стерилизират се в автоклав (точка 4.1.2) в продължение на 15 минути при температура 121 ± 1 °C.

Проверява се рН на разредителя.

Ако не бъде използван веднага, разредителят се съхранява на тъмно при температура 1- 5 °C за не повече от месец, след като е бил приготвен.

6.3. Готов сух разредител

Разредителят (точка 6.1) може да бъде приготвен и от готови таблетки или прах, предлагани на пазара, като се спазват указанията на производителя. Коригира се рН

на разредителя, както е описано в точка 6.1; поставя се в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указания в точка 6.2 начини.

7. Процедура

7.1. Разтапяне на хранителната среда

Преди началото на микробиологичното изследване необходимото количество среда се разтапя бързо и temperира до 45 ± 1 °C на водна баня (точка 4.1.5).

7.2. Подготовка на пробата мляко

Пробата мляко се размесва добре, така че да се осигури възможно най-равномерно разпределение на микроорганизмите чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата. Избягва се образуването на пяна или ако има такава, тя се оставя да се диспергира. Времето между смесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не трябва да превишава три минути.

7.3. Приготвяне на основно разреждане (10⁻¹) (сурово и пастьоризирано мляко)

С помощта на стерилна пипета (точка 4.2.3) 1 ml от пробата със сурово или пастьоризирано мляко (точка 7.2) се прехвърля със в 9 ml разредител (точка 6.1), като се внимава пипетата и разредителят да не влязат в контакт. Температурата на разредителя е приблизително равна на температурата на пробата с мляко. Това основно разреждане се смесва внимателно с миксер (точка 4.1.9) за около 5- 10 секунди.

По този начин се получава основно разреждане 10⁻¹.

7.4. Приготвяне на следващи десетократни разреждания (сурово и пастьоризирано мляко)

Прехвърля се 1 ml от основното разреждане (точка 7.3) посредством стерилна пипета (точка 4.2.3) в 9 ml от разредителя (точка 6.1), като се спазват указанията, дадени в точка 7.3.

По този начин се получава разреждане 10⁻².

Приготвянето на допълнителни десетократни разреждания се извършва чрез повторение на същите манипулации до получаване на съответния очакван брой микроорганизми (точка 8.1.1).

7.5. Инокулиране на петриевите панички

7.5.1. Сурово мляко: 1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане се прехвърлят в петриева паничка (точка 4.2.4) със стерилна пипета (точка 4.2.3). На изследване подлежат най-малко две разреждания. Приготвя се по едно петри от всяко десетократно разреждане (точка 8.1.1).

7.5.2. Пастьоризирано мляко: 1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане се прехвърлят в петриева паничка (точка 4.2.4) със стерилна пипета

(точка 4.2.3). На изследване подлежат най-малко две разреждания. Приготвя се по едно петри от всяко десетократно разреждане (точка 8.1.1).

7.5.3. Произведено по УНТ технология и стерилизирано мляко (изследва се след култивиране в продължение на 15 дни при температура 30 °C (Директива 85/397/ЕИО, приложение А, Глава VII, точка 5):

1 ml от пробата с мляко (точка 7.2) се прехвърля в петриева паничка (точка 4.2.4) със стерилна пипета (точка 4.2.3). Приготвят се две петрита.

7.6. Разливане в петриevi панички

Върху посевките във всяка петриева паничка се разливат от 15 до 18 ml от средата (точка 7.1).

Непосредствено след разливането ѝ хранителната среда се размесва в петрито чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на колонииите след инкубация.

Времето между окончателното приготвяне на пробата мляко и смесването със средата - в зависимост от вида мляко, тест-порцията или разреждането, не трябва да превишава 15 минути.

Петритата се поставят на чиста, хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на съдържанието.

7.7. Инкубиране на петриевите панички

Петритата се поставят в инкубатор (точка 4.1.3). Култивират се обърнати, не повече от шест една върху друга, разделени помежду им и от стените и тавана на инкубатора.

Инкубира се при температура 30 ± 1 °C в продължение на 72 ± 2 часа.

7.8. Изброяване на колонииите

Изброяват се колонииите в петритата, съдържащи не повече от 300 колонии.

Петритата се изследват на непряка светлина. За улесняване на изброяването може да се ползва лупа (точка 4.1.6) и/или броителна камера (точка 4.1.8). Да се внимава частиците от утаечни вещества в петритата да не се бъркат с точковидни колонии. За различаване на колонииите от чуждите тела съмнителните обекти се изследват внимателно при необходимост с помощта на лупа с по-голямо увеличение (точка 4.1.7).

Разрастващи се колонии се броят като единични колонии. Ако разрастването е обхванало по-малко от една четвърт от петриевата паничка, изброява се броят на колонииите в незасегнатата повърхност на петрито, след което се изчислява съответното число за цялото петри. Ако е покрита по-голяма част от една четвърт на петрито, то се отстранява.

8. Изчисляване и изразяване на резултатите

8.1. Прясно и пастъоризирано мляко

8.1.1. Използват се резултатите от всички петриевы панички, съдържащи 10- 300 колонии (вж. точка 8.1.3 и 8.1.4).

8.1.2. Броят на микроорганизмите на 1 ml сурово или пастъоризирано мляко се определя по формулата:

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

където:

$\sum C$ сумата от колонииите, изброени съгласно точка 8.1.1;

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ обемът на посятата проба, в която:

n_1 броят на петритата, отчетени от първото разреждане;

n_2 броят на петритата, отчетени от второто разреждане;

d факторът на разреждане, от който са получени първите резултати;

Резултатът се дава с точност до две значими числа. Ако числото, което трябва да се закръгли, е 5, закръглява се така че вляво от 5 да се получи четно число.

Пример (пастъоризирано мляко):

Разреждане 10^{-2} : 278 и 290 колонии

Разреждане 10^{-3} : 33 и 28 колонии

Брой/ml

*****[Please insert figures from original]*****

8.1.3. Ако резултатите показват само брой на колонииите, по-малък от 10, броят на микроорганизмите на милилитър се отчита като „по-малко от $10 \times d$ на ml“, като d е реципрочната стойност на най-ниския фактор на разреждане.

8.1.4. Ако резултатите отчитат само брой на колонииите, по-голям от 300, при които изброяването е все пак възможно, се изчислява приблизителният брой и се умножава по реципрочната стойност на фактора за разреждане. Резултатът се записва като „отчетен брой микроорганизми на милилитър“.

8.2. Произведено по УНТ мляко и стерилизирано мляко

Приема се, че посеви с повече от 10 колонии при 0,1 ml не отговарят на изискванията на Директива 85/397/ЕИО.

9. Точност

За момента няма данни за получени резултати от международно приети съвместни опити.

V. ИЗБРОЯВАНЕ НА МИКРООРГАНИЗМИ - ОБЩ БРОЙ НА МИКРООРГАНИЗМИТЕ ПРИ ТЕМПЕРАТУРА 21 °C

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за изброяване на микроорганизмите чрез метода за преброяване на колонии при температура 21 °C за пастъризираният мляко след 5-дневна култивация при температура 6 °C с цел определяне степента на замърсяване на пастъризираният мляко с психотрофни микроорганизми, способни да се размножават при температура 6 °C.

2. Определение

Под обозначението „микроорганизми“ се разбира организми, способни да образуват изброими колонии при аеробно култивиране при описаните условия.

3. Принцип

Пастъризираният мляко се инкубира при температура 6 °C в продължение на пет дни. Определен обем от пробата с мляко за изследване се смесва с хранителна среда в петриеви панички и се инкубира при температура 21 °C в продължение на 25 часа. Определя се броят на колонии и се изчислява общият брой на микроорганизмите в 1 ml пастъризирано мляко.

4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:

4.1. Апаратура

4.1.1. Стерилизатор с горещ въздух за работа при температура 170- 175 °C.

4.1.2. Автоклав за работа при температура 121 ± 1 °C.

4.1.3. Инкубатор, поддържащ температура:

а) $6 \pm 0,2$ °C;

б) 21 ± 1 °C

в цялото работно пространство.

4.1.4. pH-метър с компенсация на температурата и точност $\pm 0,1$ pH.

4.1.5. Водна баня с регулатор на температурата при 45 ± 1 °C.

4.1.6. Лупа с увеличение 2- 4х.

4.1.7. Лупа с увеличение 8- 10х.

4.1.8. Броителна камера

4.1.9. Миксер за разбъркване на 1 ml от пробата или десетократно разреждане с 9 ml разредител, работещ на принципа на ексцентричната ротация.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки - с подходящи запушалки и пространство за разбъркване на съдържанието, и достатъчна вместимост за 10 ml основно разреждане или други десетократни разреждания.

4.2.4. Колби с вместимост 150 - 250 ml или епруветки с приблизителна вместимост от 20 ml за хранителната среда.

4.2.3. Пипети (с памучни запушалки) от стъкло или стерилен синтетичен материал със здрав край, с номинална вместимост от 1 ml и отвор с диаметър 1,75- 3 mm.

4.2.4. Петрита от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал, с вътрешен диаметър на долната паничка от около 90- 100 mm и дълбочина минимум 10 mm. По дъното не се допускат неравности, които биха попречили на точното преброяването на колонии.

4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария

Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в сушилня на горещ въздух при температура 170- 175 °C за не по-малко от един час (точка 4.1.1);

б) в автоклав (точка 4.1.2) при температура 121 ± 1 °C за не по-малко от 20 минути.

При стерилизация в автоклав следва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да бъдат плътно затворени, а колбите трябва да са с отворени капаци.

Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата.

Пипетите се стерилизират в сушилня на горещ въздух (точка 4.1.1).

5. Хранителна среда- агар за изброяване на микроорганизмите

5.1. Състав:

Дрождев екстракт 2,5 g

Триптон 5,0 g

Глюкоза D (+) или декстроза 1,0 g

Обезмаслено мляко на прах 1,0 g

Агар 10- 15 g в зависимост от желиращите свойства на използвания агар

Вода 1 000 ml

Обезмасленото мляко на прах не може да съдържа инхибиторни (потискащи) вещества, което се установява чрез сравнителни изследвания, като се ползва обезмаслено мляко на прах, за което се знае, че е свободно от инхибитори.

Приготвяне

Съставките се суспендират и разтварят във водата в следната последователност: дрождев екстракт, триптон, глюкоза и накрая обезмасленото мляко на прах. Нагриването на суспензията улеснява манипулацията. Прибавя се агарът и се нагрива до кипене, като непрекъснато се разбърква до пълното му разтваряне или се разтваря на пара в продължение на 30 минути.

При необходимост се филтрира през филтърна хартия.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява активната киселинност на средата и при необходимост се коригира, така че след стерилизацията тя да е равна на $6,9 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, като се използва разтвор (не по-малко от $0,1\text{ mol/l}$) на натриева основа или солна киселина.

5.2. Разпределяне, стерилизация и съхранение на хранителната среда

Средата (точка 5.1) се разпределя в количества по 100- 150 ml в колби или 12- 15 ml в епруветки (точка 4.2.2), след което съдовете се затварят със запушалки.

Стерилизират се в автоклав (точка 4.1.2) при температура $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 15 минути.

Проверява се рН на средата.

Ако не бъде използвана веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура $1-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ за не повече от месец, след като е била приготвена.

5.3. Готова суха хранителна среда, предлагана на пазара

Хранителната среда (точка 5.1) може да бъде приготвена и от готова суха среда, предлагана на пазара, като се спазват указанията на производителя. Ако средата не съдържа в състава си обезмаслено мляко на прах, то се прибавя непосредствено преди разтварянето.

Коригира се рН на $6,9 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, както е описано в точка 5.1, след което средата се разпределя в съответните съдове, стерилизира се и се съхранява по указанияте в точка 5.2 начини.

6. Разредители

6.1. Пептон-солов разтвор

Състав:

Пептон 1,0 g

Натриев хлорид (NaCl) 8,5 g

Вода 1 000 ml

Приготвяне:

Съставките се разтварят във вода, като при необходимост разтворът се нагрива.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява активната киселинност на средата и при необходимост се коригира така че след стерилизацията да е равна на $7,0 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, като се използва разтвор (не по-малко от $0,1\text{ mol/l}$) на натриева основа или солна киселина.

6.2. Разпределяне, стерилизация и съхранение на разредителя

Разредителят (точка 6.1) се пресипва в епруветки (точка 4.2.1) в такива количества, че след стерилизация обемът му да е равен на $9,0 \pm 0,2\text{ ml}$, след което епруветките се затварят със запушалки.

Стерилизират се в автоклав (точка 4.1.2) при температура $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 15 минути. Проверва се рН на разредителя.

Ако не бъде използван веднага, разредителят се съхранява на тъмно при температура $1\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ за не повече от месец, след като е бил приготвен.

6.3. Готов сух разредител

Разредителят (точка 6.1) може да бъде приготвен и от готови таблетки или прах, предлагани на пазара, при спазване указанията на производителя. Коририра се рН на разредителя, както е описано в точка 6.1; разпределя се в съдове, стерилизира се и се съхранява по указанияте в точка 6.2 начини.

7. Процедура

7.1. Разтапяне на хранителната среда

Преди началото на микробиологичното изследване необходимото количество среда се разтапя бързо и се темперира до $45 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ на водна баня (точка 4.1.5).

7.2. Подготовка на пробата мляко

7.2.1. Инкубира се неотворена опаковка пастьоризирано мляко или ако това е невъзможно, се инкубира представителна проба, съдържаща не по-малко от 100 ml мляко, в продължение на $120 \pm 2\text{ h}$ при температура $6 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в термостат (точка 4.1.3, а).

7.2.2. След инкубацията пробата мляко се размесва добре, така че да се осигури възможно най-равномерно разпределение на микроорганизмите чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата, като се избягва образуването на пяна или ако има такава, тя се оставя да се диспергира. Времето между смесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не трябва да превишава три минути.

7.3. Приготвяне на основното разреждане (10^{-1})

С помощта на стерилна пипета 1 ml от пробата (точка 7.2.2) се прехвърля (точка 4.2.3) в 9 ml разредител (точка 6.1), като се внимава пипетата и разредителят да не влязат в контакт. Температурата на разредителя трябва да бъде приблизително равна на температурата на пробата с мляко. Това основно разреждане се размесва внимателно с миксер (точка 4.1.9) за около 5- 10 секунди.

По този начин се получава основно разреждане 10^{-1} .

7.4. Приготвяне на следващи десетократни разреждания

За получаването на десетократни разреждания 1 ml от основното разреждане (точка 7.3) се прехвърля посредством стерилна пипета (точка 4.2.3) в 9 ml от разредителя (точка 6.1), като се спазват указанията, дадени в точка 7.3.

По този начин се получава разреждане 10^{-2} .

Приготвянето на допълнителни десетократни разреждания се извършва чрез повторение на същите манипулации до получаването на съответния очакван брой микроорганизми (точка 8.1.).

7.5. Инокулиране на петриевите панички

Прехвърля се 1 ml от пробата и/или съответното десетократно разреждане в петриева паничка (точка 4.2.4) със стерилна пипета (точка 4.2.3). На изследване подлежат най-малко две разреждания. Приготвят се две петрита от всяко десетократно разреждане (точка 8.1).

7.6. Разливане в петриеви панички

Върху посевките във всяка петриева паничка се разливат от 15 до 18 ml от средата (точка 7.1).

Непосредствено след разливането ѝ хранителната среда се размесва в петрито чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на колонии след инкубация.

Времето между окончателното приготвяне на пробата мляко и смесването на разредителя със средата не трябва да превишава 15 минути.

Петритата се поставят на чиста, хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на съдържанието.

7.7. Инкубиране на петриевите панички

Петритата се поставят в инкубатор (точка 4.1.3, б). Култивират се обърнати, не повече от шест една върху друга, разделени помежду си и от стените и тавана на инкубатора.

Инкубира се при температура 21 ± 1 °C в продължение на 25 часа.

7.8. Изброяване на колонии

Изброяват се колонииите в петритата, съдържащи не повече от 300 колонии.

Петритата се изследват на непряка светлина. За улесняване на изброяването може да се ползва лупа (точка 4.1.6) и/или броителна камера (точка 4.1.8). Да се внимава частиците от утаечни вещества в петритата да не се бъркат с точковидни колонии. За различаване на колонииите от чуждите тела съмнителните обекти се изследват внимателно при необходимост с помощта на лупа с по-голямо увеличение (точка 4.1.7).

Разрастващи се колонии се броят като една. Ако разрастването е обхванало по-малко от една четвърт от петриевата паничка, изброява се броят на колонииите в незасегнатата повърхност на петрито, след което се изчислява съответното число за цялото петри. Ако е покрита по-голяма част от една четвърт от повърхността на петрито, броенето не се извършва.

8. Изчисляване и изразяване на резултатите

8.1. Използват се резултатите от всички петриеви панички, съдържащи между 10-300 колонии (вж. точка 8.3 и 8.4).

8.2. Броят на колонообразуващите единици на микроорганизмите на 1 ml пастьоризирано мляко се определя по формулата:

*****[Please insert formula from original]*****

където:

ΣC сумата от колонииите, изброени съгласно точка 8.1;

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ обемът на посятата проба, в която:

n_1 броят на петритата, отчетени от първото разреждане;

n_2 броят на петритата, отчетени от второто разреждане;

d факторът на разреждане, от който са получени първите резултати;

Резултатът се дава с точност до две значими числа. Ако числото, което трябва да се закръгли, е 5, закръглява се така че вляво от 5 да се получи четно число.

Пример:

Разреждане 10^{-2} : 278 и 290 колонии

Разреждане 10^{-3} : 33 и 28 колонии

Брой/ml = *****[Please insert figures from original]*****

8.3. Ако резултатите показват само брой на колонииите, по-малък от 10, броят на микроорганизмите на милилитър се отчита като „по-малко от $10 \times d$ на ml“, като d е реципрочната стойност на най-ниския фактор на разреждане.

8.4. Ако резултатите отчитат само брой на колонииите, по-голям от 300, при които изброяването е все пак възможно, се изчислява приблизителният брой и се умножава

по реципрочната стойност на фактора за разреждане. Резултатът се записва като „Отчетен брой микроорганизми на милилитър“.

9. Точност

За момента няма данни за получени резултати от международно приети съвместни опити.

VI. ИЗБРОЯВАНЕ НА КОЛИФОРМИ - БРОЙ КОЛИФОРМИ СЛЕД КУЛТИВИРАНЕ ПРИ ТЕМПЕРАТУРА 30 °C

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за изброяване на колиформите в пастьоризираното мляко посредством изброяване на колонии след култивиране при температура 30 °C.

2. Определение

Под обозначението „колиформи“ се разбират бактерии, които при температура 30 °C образуват характерни или нехарактерни колонии, ферментиращи лактозата с отделяне на газ при описаните условия на изследване.

3. Принципи

Определен обем от пробата с мляко се смесва с хранителната среда в петриеви блюда и се култивира при температура 30 °C в продължение на 24 часа. Изброяват се характерните колонии и при необходимост наличието на нехарактерни колонии се потвърждава чрез изследване на способността им да ферментират лактозата. Изчислява се броят на колиформите в 1 ml пастьоризирано мляко.

4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:

4.1. Апаратура

4.1.1. Стерилизатор с горещ въздух за работа при температура 170- 175 °C.

4.1.2. Автоклав за работа при температура 121 ± 1 °C.

4.1.3. Инкубатор, поддържащ температура от 30 ± 1 °C в целия работен обем.

4.1.4. pH-метър с компенсатор на температурата и точност до $\pm 0,1$ pH единици.

4.1.5. Водна баня за работа при температура 45 ± 1 °C.

4.1.6. Йозе, платино-иридиево или хром-никелово.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Епруветки с подходящи запушалки и вместимост 20 ml за побиране на средата за потвърждаване (точка 5.2) и ферментационни епруветки на Дърхам с подходящи размери.

4.2.2. Колби с вместимост 150- 250 ml за твърдата селективна среда (точка 5.1).

4.2.3. Пипети (запушени с памук) от стъкло и стерилен синтетичен материал, със здрав край с номинален обем 1- 10 ml и диаметър на изходния отвор 1,75 до 3 mm.

4.2.4. Петрита от безцветно прозрачно стъкло или стерилен синтетичен материал, с вътрешен диаметър на долното блюдо от около 90- 100 mm и дълбочина минимум 10 mm. По дъното не се допускат неравности, които биха попречили на точното изброяване на колонии.

4.2.5. Стерилизация на лабораторната стъклария

Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в стерилизатор с горещ въздух при температура от 170- 175 °C за не по-малко от един час (точка 4.1.1);

б) в автоклав (точка 4.2.1) при температура 121 ± 1 °C за не по-малко от 20 минути.

При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията. Така например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, те не трябва да бъдат плътно затворени, а колбите трябва да са с отворени капаци.

Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата.

Пипетите се стерилизират в сушилня на горещ въздух (точка 4.1.1).

5. Хранителна среда

5.1. *Виолетово-червен лактозо-жлъчен агар (ВЧЛЖ-агар) - твърда селективна среда*

Състав:

Пептон 7 g

Дрождев екстракт 3 g

Лактоза ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) 10 g

Натриев хлорид (NaCl) 5 g

Жлъчни соли 1,5 g

Неутрално червено 0,03 g

Кристалвиолет 0,002 g

Агар 10 до 15 g в зависимост от желиращите качества на използвания агар

Вода 1 000 ml

Приготвяне:

Съставките се суспендират и се разтварят във водата и се оставят за няколко минути, след което енергично се разбъркват.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява рН на средата и при необходимост се коригира така че след кипене да е равна на $7,4 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, като се използва разтвор (с концентрация не по-малка от $0,1\text{ mol/l}$) на натриева основа или солна киселина.

Средата се нагрява бързо до кипене, като периодично се разклаща, след което незабавно се разпределя на порции от 100 до 150 ml в стерилни колби (точка 4.2.2) и се темперира на водна баня (точка 4.1.5) при температура от $45 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Стерилността на средата се проверява по време на употребата ѝ (вж. точка 6.4).

Средата е годна за употреба до три часа след приготвянето ѝ.

5.2. *Лактозо-жлъчен бульон с брилянтгрюн* . Среда за потвърждаване

Състав:

Пептон 10 g

Лактоза ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 10 g

Суша говежда жлъчка 20 g

Брилянтгрюн 0,0133 g

Вода 1 000 ml

Приготвяне:

Съставките се разтварят във водата чрез нагряване до кипене.

С рН-метър (точка 4.1.4) се проверява рН на средата и при необходимост се коригира така че след стерилизацията да е равна на $7,2 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, като се използва разтвор (с концентрация не по-малка от $0,1\text{ mol/l}$) на натриева основа или солна киселина.

Средата се разпределя на порции от 10 ml в епруветки (точка 4.2.1), в които има поставени ферментационни епруветки на Дърхам и се затварят със запушалки.

Стерилизират се в автоклав (точка 4.1.2) при температура $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 15 минути.

След стерилизацията във ферментационните епруветки на Дурхам не бива да има мехурчета.

Проверява се рН на средата.

Ако не бъде използвана веднага, хранителната среда се съхранява на тъмно при температура 0- 5 °С за не повече от месец след приготвянето ѝ.

5.3. *Готова суха хранителна среда*

Хранителната среда (точка 5.1 и 5.2) може да бъде приготвена и от готова суха среда, предлагана на пазара, като се спазват указанията на производителя. Проверява се рН, след което се разпределя в съответните съдове, нагрява се до кипене или се стерилизира и съхранява по описаните в точка 5.1 и 5.2 начини.

6. Процедура

6.1. *Хранителна среда*

Средата (ВЧЛЖ-агар) се използва съгласно указанията в точка 5.1 начини.

6.2. *Подготовка на пробата с мляко за изследване*

Пробата с мляко се размесва добре чрез бързо 25-кратно обръщане на контейнера с пробата, за да се осигури възможно най-равномерно разпределение на микроорганизмите. Избягва се образуване на пяна или при наличието на такава тя се оставя да се диспергира. Времето между размесването на пробата и отпипетирането на тест-порцията не бива да превишава 3 минути.

6.3. *Инокулиране на петриевите блюда*

Посяват се 3 ml от пробата с мляко (6.2) чрез прехвърлянето на 1 ml във всяко от трите блюда (4.2.4) посредством стерилна пипета (4.2.3).

6.4. *Разливане*

Във всяко от инокулираните петрита се разлива около 12 ml хранителна среда ВЧЛЖ- агар (точка 6.1).

Непосредствено след разливането ѝ хранителната среда се размесва в петрито чрез кръгообразни движения, за да се получи равномерно разсейване на колонии след инкубация.

Времето между окончателната подготовка на пробата с мляко и смесването на отпипетираната тест-порция със средата не трябва да превишава 15 минути.

За проверка на стерилността се приготвя контрола от неинокулирано петриево блюдо с 12 mmл ВЧЛЖ- агар, използван за посетите петрита.

Петритата се оставят върху чиста и хладна хоризонтална повърхност до втвърдяване на средата в тях.

След пълното втвърдяване върху повърхността на инокулираната среда се наслоява нов слой от не по-малко от 4 ml ВЧЛЖ- агар (точка 6.1).

Оставя се да се втвърди отново.

6.5. *Инкубиране на петриевите блюда*

Петритата се поставят в инкубатор (точка 4.1.3). Култивират се обърнати с дъното нагоре, не повече от шест на брой едно върху друго, разделени помежду им и от стените и тавана на инкубатора.

Инкубира се при температура 30 ± 1 °C в продължение на 24 ± 2 часа.

6.6. *Изброяване на колонии*

6.6.1. Изброяват се колонии в петритата, чийто брой е по-голям от 150. Резултатът се отчита, като се броят колонии с тъмноресено оцветяване с диаметър не по-малко от 0,5 mm, със или без характерния за колиформните бактерии заобикалящ ги преципитат.

6.6.2. Ако всички или някои колонии покажат нехарактерна реакция (например различават се по цвят, размер или образуването на преципитат от типични колонии), се извършва тест за потвърждаване (точка 6.7).

6.7. *Тест за потвърждаване*

Тестът за потвърждаване се извършва съгласно указанията в точка 6.6.2 върху подходящ брой (напр. три или пет) нехарактерни колонии чрез посяване с йозе (точка 4.1.6) в епруветки на лактозо-жлъчен бульон с брилянтгрюн (точка 5.2). Епруветките се култивират при температура 30 ± 1 °C в продължение на 24 ± 2 часа.

Колоните, отделящи газ във ферментационните епруветки на Дърхам се приемат за колиформи.

7. **Изчисляване и изразяване на резултатите**

7.1. Използва се преброяването на посевките (вж. точка 7.4) от петритата, съдържащи повече от 150 колонии.

7.2. При извършване на тест за потвърждаване броят на колиформните колонии се изчислява въз основа на процента на доказаните колиформни колонии.

7.3. Броят на колиформите в 1 ml пастеризирано мляко се определя по формулата:

*****[Please insert formula from original]*****

където:

ΣС общият брой на колонии на колиформните бактерии (вж. точка 7.1 във връзка с точка 7.2), получен при изследване на пробата мляко (3 ml);

n количеството милилитри от изследваната проба (точка 6.3) (3 ml).

Резултатът се изразява до две значими числа при наличието на повече от 100 колонии. Ако числото, което се закръгли, е 5, закръглява се така че вляво от 5 да се получи четно число.

Ако за посевките се отчита само брой на колонииите, по-голям от 150, резултатът се записва като „Отчетен брой на колонииите в 1 ml“.

8. Точност

Няма регистрирани резултати от международно признати съвместни опити.

VII. ИЗБРОЯВАНЕ НА СОМАТИЧНИТЕ КЛЕТКИ

Настоящата процедура установява следните два референтни метода за определяне общия брой на соматичните клетки в суровото мляко:

А. Микроскопски метод

Б. Флуоро-оптиелектронен метод

А. Микроскопски метод

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод за определяне общия брой на соматичните клетки в суровото мляко.

Настоящата процедура установява метода за изброяване на клетките в проба мляко с цел калибриране и проверка на точността на флуоро-оптиелектронния метод (вж. точка Б. 1).

2. Определение

За целите на настоящата процедура соматични клетки са такива клетки като например левкоцитите и епителните клетки, чиито ядра се обособяват отчетливо и ясно при оцветяване с метиленово синьо.

3. Принцип

Поставя се 0,01 ml върху предметно стъкло с размери 1 cm². Натривката се изсушава и оцветява. Изброяването се извършва с микроскоп. За да бъде получен броят на клетъчните елементи в 1 ml, броят на соматичните клетки, отчетен в даден сектор, се умножава по фактора на микроскопа.

4. Реактиви

Използват се реактиви ч.з.а.

Багрило:

Състав:

Метиленово синьо 0,6 g

Етанол (99 %) 54 ml

1,1,1-трихлороетан или тетрахлороетан 40 ml

Ледена оцетна киселина 6 ml

Предупреждение

Тетрахлороетанът е отровен. Ако се използва, приготвянето и употребата му трябва да се извършва в лабораторна камина.

Приготвяне

Разтварят се етанолът и 1,1,1-трихлороетанът или тетрахлороетанът в бутилка; съдържанието се нагрява на водна баня до 60- 70 °С. Добавя се метиленово синьо, внимателно се разбърква и се охлажда в хладилник до 4 °С за 12 до 24 часа, след което се прибавя ледената оцетна киселина. Багрилото се филтрира през филтър с порьозност от 10 до 12 микрона или по-малко; съхранява се в плътно затворена бутилка. При образуването на частици или седимент разтворът се филтрира отново преди употреба.

5. Апаратура и лабораторна стъклария

5.1. *Микроскоп* с увеличение от $\times 500$ до $\times 1\,000$.

5.2. *Микроспринцовка*, 0,01 ml и точност $\pm 2\%$ или по-голяма.

5.3. Индуктивна плака, с маркирана площ 20 mm x 5 mm или шаблон и подложка с маркирана площ за натривката 20 mm x 5 mm.

5.4. *Нивелирана нагревателна плоча* (30- 50 °С) за изсушаване на натривките.

5.5. *Вентилатор* (сешоар), за сушене на натривките

5.6. *Водна баня* за работа при температура 30- 40 °С, за нагряване на пробата с мляко.

5.7. *Обект-микрометър* с деления от 0,01 mm.

6. Процедура

6.1. *Проба*

Пробата с мляко се изследва до шест часа след взимането ѝ. По време на съхранението температурата ѝ не трябва да надвишава 6 °С, като се внимава да не замръзне.

6.2. *Лабораторна подготовка на пробата*

Пробата се нагрява във водна баня (точка 5.6) до температура 30- 40 °С, след което се размесва внимателно и охлажда до температурата, при която е била калибрирана микроспринцовката (точка 5.2) - например 20 °С.

6.3. *Предварителна обработка на предметните стъкла*

Предметните стъкла (точка 5.3) се почистват с етанол, подсушават се с обезпрашена хартия, опламенят се и охлаждат. За да не напращат, стъклата се поставят за съхранение в кутии.

6.4. Подготовка на натривката

Всмуква се 0,01 ml от предварително подготвената проба с микроспринцовка (точка 5.2). Външните стени на спринцовката, които са в контакт с млякото, се почистват старателно. Спринцовката се поставя на предметното стъкло (точка 5.3), като първо се очертава контурът на формата (20 mm x 5 mm). След това се маркираната площ се покрива колкото се може по-равномерно. Натривката се оставя на нивелираната нагревателна (точка 5.4) плоча до пълното ѝ изсушаване.

За всяко проба мляко се подготвят и изследват не по-малко от две натривки.

6.5. Оцветяване на натривките

Натривките се потапят в багрилния разтвор (точка 4) за 10 минути. Изцеждат се и се изсушават, при необходимост с вентилатора (точка 5.5). Потапят се в чешмяна вода до пълното отстраняване на неабсорбираното багрило. След това се изсушават отново и се съхраняват на защитено от прах място.

6.6. Калибриране на зрителното поле на микроскопа

Диаметърът на зрителното поле се определя посредством обект-микрометър (точка 5.7) в зависимост от избраното увеличение на микроскопа (x 500 до x 1 000).

7. Изброяване и изчисляване на резултата

7.1. Изброяване на клетъчните елементи

За целта се използва микроскоп (точка 5.1). Отчита се не броят на клетките, а този на ядрата, които са ясно обособени. За да се извърши преброяването, поне половината от ядрото трябва да бъде видимо в зрителното поле. Изброяват се ивиците или полетата в средната третина от натривката, като се избягва отчитането на ивици или полета, подбрани изключително от периферните сектори на натривката. Надлежната подготовка на натривките, а следователно и надеждността на резултатите, се проверяват чрез отчитане в различните части на натривката поне веднъж месечно. Изброяването може да се извърши и чрез преброяване на зрителните полета, разпрострени в система, в която всички части на натривката са еднакво представителни.

7.2. Минимален брой клетки, подлежащ на изброяване

Тъй като определянето броя на соматични клетки посредством микроскоп може да се използва също така и за стандартизиране на автоматичното и механизирано броене, коефициентът на вариация на резултатите от идентични проби не може да превишава коефициента на вариация на електронните устройства. Коефициентът на вариация за проба с мляко, съдържаща 400 000 - 600 000 клетки/ml, не бива да надвишава 5 %.

За да удовлетвори критерия за повторяемост, броят на соматичните клетки, подлежащ на отчитане за всяка проба мляко, трябва да бъде поне равен на 400 съгласно разпределението на Поасон.

Съгласно разпределението на Поасон:

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

където:

M - средна стойност

V - вариация

s - стандартното отклонение

Коефициент на вариация:

*****[Please insert formula from original and replace or by или]*****

M (средната стойност) обозначава отчетения брой частици (клетки) (точка е. 400 за CV = 5 %).

7.3. *Определяне фактора на микроскопа*

При 0,01 ml мляко факторът на микроскопа се определя съгласно точка 7.3.1. или 7.3.2.

7.3.1 Изброяване на ивици по натривката

Дължината на всяка ивица, подлежаща на отчитане, е 5 mm. Ширината ѝ съответства на диаметъра на зрителното поле, определен с обект-микрометър (точка 5.7).

$$\text{Фактор на микроскопа} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

където:

d - диаметърът на зрителното поле в милиметри, определен с обект-микрометър (точка 5.7)

b - броят на изцяло отчетените ивици.

7.3.2. Изброяване на зрителните полета в средната третина на натривката или с помощта на растер

$$\text{Фактор на микроскопа} = \text{***[Please insert formula from original]***}$$

където:

d - диаметърът на зрителното поле в милиметри, определен с обект-микрометър (точка 5.7).

s - броят на полетата.

7.4. Изчисляване на клетъчното съдържание

Клетъчното съдържание в 1 ml мляко се получава, като отчетеният брой на соматичните клетки (точка 7.1 и 7.2) се умножи по фактора на микроскопа (точка 7.3).

7.5. Точност

Коефициентът на вариация (вж. точка 7.2) не трябва да надвишава 5 %.

Няма данни за резултати, получени от международно признати съвместни опити.

Б. Флуоро-оптиелектронен метод

1. Цел и приложение

Настоящата процедура установява референтния метод, който след съответното калибриране (вж. точка А.1), може да се използва за определяне броя на соматичните клетки в суровото мляко – в третирани или нетретирани с химически консерванти проби.

2. Определение

За целите на настоящия метод соматичните клетки се определят като частици с минимална интензивност на флуоресценция вследствие оцветяването на ДНК в ядрото им.

3. Принцип

Част от пробата (напр. 0,2 ml) се размесва добре с буферен и флуоресциращ разтвор. Част от сместа се наслаява върху въртящ се диск, който служи като обектна равнина на микроскопа.

Всяка клетка произвежда електрически импулс, който се усилва и записва. Броят на соматичните клетки се отчита в хиляди на милилитър.

4. Реактиви

Освен ако няма други указания, реактивите трябва да бъдат ч.з.а химически субстанции. Използваната вода следва да бъде дестилирана или дейонизирана с равностойна чистота.

4.1. Буферен разтвор

Състав:

Калиево-водороден фталат 51,0 g

Калиева основа 13,75 g

Полиетиленгликол-моно-р(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенил-етер (например тритон X-100), 1 % (o/o) 10 ml

pH 5,7 до 5,9. Разрежда се с вода до обем 10 000 ml.

Приготвяне на разтвора

Смесват се отделните съставки. Херметически затворен, разтворът е годен за употреба не повече от седем дни от приготвянето му.

4.2. *Флуоресциращ разтвор (основен разтвор)*

Състав:

Етид-бромид 1,0 g

Разрежда с вода до обем 1 000 ml.

Приготвяне на разтвора

Етид-бромидът се разтваря във вода. Херметически затворен в светлоустойчиво стъкло, разтворът е годен за употреба не повече от два месеца от приготвянето му.

4.3. *Флуоресциращ (работен разтвор)*

20 ml от основния разтвор (точка 4.2) се смесват с буфера (точка 4.1) в обем 1 000 ml. Работният разтвор е годен за употреба до седем дни от приготвянето му.

4.4. *Почистващ разтвор*

Състав:

Буферен разтвор (точка 4.1) 10 ml

Полиетиленгликол-моно- p(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенил-етер (например тритон X-100), 1 % (o/o) 10 ml

Амоняк, 25 % (o/o) 25 ml

Разрежда се с вода в обем 10 000 ml

Приготвяне на разтвора

Отделните съставки се смесват. Разтворът е годен за употреба не повече от 30 дни след приготвянето му.

5. Апаратура и лабораторна стъклария

5.1. *Отчитащо устройство*, работещо на принципа на оптичната флуоресценция.

Бележка:

Преди употреба устройството се калибрира. По този начин се определя корелацията между обема на частиците, подлежащи на изброяване, и граничния праг, над който се извършва отчитането. Калибрирането на апаратурата се осъществява в съответствие с указанията на производителя, като се използват проби от мляко,

чието клетъчно съдържание е предварително установено посредством микроскопския метод (точка А).

5.2. *Водна баня* с циркулация за работа при температура 40 ± 1 °C.

5.3. *Епруетка* с подходяща херметизираща запушалка и приблизителен обем 15 ml.

6. Проба с мляко

6.1. Пробата се съхранява в епруетка (точка 5.3) при ниска температура. Ако не е била предварително третирана с химически консерванти, пробата не се подлага на изследване за броя на соматичните клетки в първите 24 часа от издояването, тъй като получените резултати ще бъдат занижени. Съхранява се при температура, не висока от 6 °C.

6.2. Консервиране

Химическата консервация трябва да се извърши в рамките на 24 часа. Консервацията трябва да се извърши колкото е възможно по-скоро след взимането на пробата.

6.2.1. Консервирането на пробата се осъществява с един от следните химически консерванти:

- ортоборна киселина:

Крайната концентрация на ортоборната киселина в епруетката не трябва да превишава 0,6 g/100 ml. Така консервирана, пробата може да се съхранява в продължение на още 24 часа при температура 6- 12 °C.

- калиев дихромат:

Крайната концентрация на калиевия дихромат в епруетката не трябва да превишава 0,2 g/100 ml. Така консервирана, пробата може да се съхранява в продължение на още 72 часа при температура 6- 12 °C.

- натриев азид:

Пробата може да се консервира с натриев азид до получаването на крайна концентрация от 0,024 g/100 ml, ако непосредствено след взимането ѝ е била охладена до температура 6- 12 °C и подложена на изследване за броя на клетъчните елементи в нея до 48 часа от вземането.

- бронопол:

Пробата може да се консервира с бронопол до получаването на крайна концентрация от 0,05 g/100 ml, ако непосредствено след взимането ѝ е била охладена до температура 6- 12 °C и подложена на изследване за броя на клетъчните елементи до 72 часа от вземането.

6.2.2. Третирана вече с ортоборна киселина, пробата може да бъде допълнително консервирана до 48 часа с калиев дихромат.

Бележка:

За консервираните с калиев дихромат проби трябва да се спазват локално определените условия за изхвърляне на отпадъчните течности.

7. Процедура

7.1. Предварителна обработка на пробите

След издояване млякото, определено за изследване, се съхранява при температура 2-6 °C за не по-малко от 24 часа. Не се препоръчва отчитането на пробите за брой на соматичните клетки в деня на издояване без предварителна обработка, защото това може да доведе до занижаване на резултатите. Ако подобно изследване все пак се налага, пробата предварително се третира с калиев дихромат за не по-малко от три часа (вж. точка 6.2.1).

7.2. Подготовка

Предварително третираната проба (вж. точка 7.1) или необработена все още проба, която е престояла поне един ден, се нагрява във водна баня (точка 5.2) до температура от около 40 °C. Съхранява се при стайна температура до началото на изследването.

7.3. Преброяване

Преброяването се извършва с помощта на отчитащото устройство (точка 5.1) до 15 минути след приключване на нагряването (вж. точка 7.2). Непосредствено преди преброяването пробата се разбърква добре до получаването на максимално хомогенно разпределение на соматичните клетки в нея.

Допълнителното разреждане и подготовка на пробата се извършва автоматично в уреда.

8. Точност

Досега няма числови стойности, удовлетворяващи критериите за повторяемост (r) и възпроизводимост (R), от международно признати съвместни опити. В бъдеще ще се определят данните относно точността на определянето.

Регистрираните на национално ниво данни позволяват следните приблизителни оценки:

1) Брой на соматичните клетки между 400 000 и 500 000/ml

- стандартно отклонение на повторяемостта:

$$s_r = 20\,000 \text{ клетки/ml}$$

(равно на коефициент на вариация от 5- 4 %)

- стандартно отклонение на възпроизводимостта:

$$s_R = 40\,000 \text{ клетки/ml}$$

(равно на коефициент на вариация от 10- 8 %)

9. Контрол на точността на определяне

Точността на определяне се проверява въз основа на проби с известно клетъчно съдържание, определено чрез отчитане броя на соматичните клетки, проведено в национална референтна лаборатория посредством микроскопския метод.

VIII. ДОКАЗВАНЕ НА АНТИБИОТИЦИ И СУЛФОНАМИДИ

ПРИЛОЖЕНИЕ

Настоящата процедура определя референтния метод за доказване на антибиотици и сулфонамиди в суровото и топлинно обработеното мляко.

Референтният метод се подразделя на:

А. Качествен метод

Метод за първоначално селектиране на пробите с мляко, съдържащи антибиотици, включващи сулфонамиди. Това е част от серия сходни методи, използващи *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, щам ATTC 10149 като основен тест-организъм. Методът е избран като представителен за серията от изследвания.

Б. Количествен метод

Методът трябва да се използва за потвърждаване резултатите от качествения метод с цел идентифициране на пеницилина и определяне на концентрацията му.

А. Метод за качествено доказване

1. Цел и приложение

Методът определя качествените методи за доказване на антибиотици и сулфонамиди в суровото и топлинно обработеното мляко, превишаващи нормите, определени в таблицата по-долу.

Доловими концентрации на антибиотици и сулфонамиди¹

	Чувствителност на теста	
	Всички проби отрицателни	Всички проби положителни
Бензилпеницилин	***[Please insert table content from original]***	
Ампицилин		
Клоксацилин		
Нафцилин		
Тетрациклин		
Окситетрациклин		
Хлортетрациклин		

Хлорамфеникол

Дихидрострептомицин

Неомицин

Канамицин

Бацитрацин

Еритромицин

Рифамицин

Диафенилсулфон

Сулфаметазин (Сулфадимидин)

¹ Бензилпеницилинът и бацитрацинът се изразяват в IU/ml, докато всички останали антибиотици се представят в µg/ml.

2. Определение

Млякото съдържа антибиотици или сулфонамиди, когато изследваната по описания метод хранителна среда не промени цвета си (вж. точка 7.1).

3. Принцип

Пробата мляко заедно с хранителните съставки се добавя към агарна хранителна среда, съдържаща рН-индикатор и спори на *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, щам ATCC 10149 (вж. точка 5.4.1), който проявява много добра обща чувствителност и в частност чувствителност към инхибирането от пеницилин. Култивирането на средата, което води до нормален растеж на организмите и образуване на киселина, променя цвета на рН-индикатора от пурпурен в жълт. Наличието в млякото на потискащи растежа на организмите вещества не причинява промяна в пурпурния цвят на индикатора.

4. Апаратура и лабораторна стъклария

Стандартно лабораторно оборудване и по-специално:

4.1. Апаратура

4.1.1. Инкубатор (термостат) за работа при температура 64 ± 1 °C.

4.1.2. Водна баня, поддържаща температура от 64 ± 1 °C.

4.1.3. Статив-решетка за епруветки или ампули

4.1.4. Пипети с краища за еднократна употреба, подходящи за вземане на проби и дозиране на 0,1 ml.

4.1.5. Пинсети или щипци.

4.1.6. Стерилизатор с горещ въздух за работа при температура 170- 175 °C.

4.1.7. Автоклав, поддържащ температура 121 ± 1 °C.

4.1.8. рН-метър.

4.2. Лабораторна стъклария

4.2.1. Стъкла за пробите с подходящи запушалки

Бележка

Използването на някои каучукови запушалки може да доведе до отлагането на инхибиторни вещества по гърлото на стъклото.

4.2.2. Петриеви панички от прозрачно безцветно стъкло или стерилен синтетичен материал с гладки дъна и равномерна дебелина на стъклото, с вътрешен диаметър най-малко 140 mm.

4.2.3. Бутилки с вместимост 250 ml.

4.2.4. Пипети (запушени с памук) от стъкло или стерилен синтетичен материал с номинална вместимост 1 ml и 10 ml.

4.2.5. Стъклени шпатули

4.2.6. Епруветки или ампули с вътрешен диаметър около 8 mm, с капачки или запушалки.

4.2.7. Стерилизация на лабораторната стъклария

Лабораторната стъклария се стерилизира по един от следните начини:

а) в стерилизатор с горещ въздух (точка 4.1.6) при температура 170- 175 °С за не по-малко от час;

б) в автоклав (точка 4.1.7) при температура 121 ± 1 °С за не по-малко от 20 минути.

При стерилизация в автоклав трябва да се осигури добър достъп на парата до стъкларията – например, ако оборудването се стерилизира в контейнери, то не трябва да бъде плътно затворено, а колбите и стъклата трябва да бъдат с отворени капаци.

Стерилизираната в автоклав лабораторна стъклария се изсушава чрез вентилиране на парата.

Пипетите се стерилизират в стерилизатор с горещ въздух.

5. Среди, разтвори, тест-организъм

Съставките на хранителната среда трябва да отговарят на бактериологичните изисквания. Използваната вода трябва да бъде дестилирана в стъкло или деминерализирана с равностойна чистота, която не трябва да съдържа потискащи растежа на тест-организма вещества.

5.1. Среди

5.1.1. Хранителен агар

Състав

Дрождев екстракт 2 g

Пептон 5 g;

Екстракт от месо 1 g

Натриев хлорид 5 g

Агар 10- 15 g

Вода 1 000 ml

Приготвяне:

Съставките се разтварят във вода. Разтворът се нагрява до кипене, като периодично се разклаща. Корижира се рН, така че след стерилизацията да е $7,4 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Средата се разлива в количества от 10 ml в епруветки, за да се приготви впоследствие полегатия агар, или в бутилки – по 100 ml.

Стерилизира се при температура $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 15 минути.

5.1.2. Агарна среда

Състав

Натриев хлорид 2 g

Агар 15 g

Вода 1 000 ml

Разтвор на триметоприм или тетроксоприм (вж. точка 5.1.3)³ 10 ml.

Приготвяне:

Всички съставки с изключение на триметоприма или тетроксоприма се разтварят във вода. Разтворът се нагрява до кипене, като периодично се разклаща. Добавя се триметопримът или тетроксопримът, след което се стерилизира при температура $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в продължение на 15 минути. Корижира се рН, така че след стерилизацията да е $7,0 \pm 0,1$ при температура $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.3. Разтвор на триметоприм или тетроксоприм

³ Трябва да се спазват разпоредбите за патентното право относно използването на хранителни среди, съдържащи антифолатни субстанции

Състав

Триметоприм 5 mg

или тетроксоприм 30 mg

Етанол 96 % 5 ml/30 ml

Вода до обем 1 000 ml

Приготвяне:

Триметопримът или тетроксопримът се разтваря в етанол (5 или 30 ml) и се разрежда с вода.

5.1.4. Хранителна среда

Състав

Дрождев екстракт 0,75 mg

Глюкоза 5,0 mg

Разтворимо нишесте 8,0 mg

Бромкрезол пурпур 0,025 g

Вода до обем 50 ml

Приготвяне на средата

Хранителните вещества и индикаторът се разтварят във вода при необходимост чрез нагриване. Разтворът се стерилизира чрез филтриране. Хранителните вещества се предлагат в готов вид на пазара под формата на таблетки.

5.2. Стандартни пеницилинови разтвори

5.2.1. Приготвя се *разтвор на пеницилин* от 60 µg/ml = (100 IU/ml) чрез разтварянето на натриев или калиев бензил-пеницилин на кристали и стерилна дестилирана вода в стерилно стъкло, снабдено с подходяща запушалка.

5.2.2. Приготвя се *работен разтвор на пеницилин*, като 1,25 ml от стандартния пеницилинов разтвор (точка 5.2.1) се допълва със стерилна дестилирана вода до 1 000 ml. Работният разтвор съдържа 0,075 µg (= 0,125 IU/ml).

5.2.3. Приготвя се стандартен пеницилинов разтвор от 75 ml, съдържащ 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml), чрез добавяне и смесване на 71 ml свободно от инхибиторни вещества мляко (точка 5.3) и 4 ml от работния пеницилинов разтвор (точка 5.2.2).

5.2.4. Пеницилиновите разтвори, посочени в точки 5.2.1- 5.2.3, се приготвят в деня на изследването.

5.3. Свободно от инхибиторни вещества мляко

Приготвя се контролен разтвор на свободно от инхибиторни вещества мляко чрез разтварянето на обезмаслено мляко на прах (10 % m/v), предварително изследвано за отсъствието на инхибитори, в стерилна дестилирана вода. Възможно е също така да се използва достатъчно количество мляко от сборна проба, за което е доказано, че е свободно от инхибиторни вещества. Млякото се разлива в стъкла и се нагрява в продължение на 1 час при температура 100 °C. Съхранява се в хладилник при температура 0- 6 °C в продължение на най-много седмица.

5.4. Тест-организъм

5.4.1. Като тест-организъм се използва *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactus*, щам АТСС 10149, който е идентичен с щам С 953.

5.4.2. За поддържане на тест-културата се приготвя *щамова култура*. Тест-културата се поддържа върху полегат хранителен агар (точка 5.1.1). посят с уxo (йозе) с бактериалната среда и инкубиран аеробно в продължение на 48 часа при температура 63 ± 1 °C. След приключване на култивирането епруветката с полегатия агар се затваря херметически със стерилна каучукова запушалка. Така получената щамова култура може да се съхранява до няколко месеца в хладилник при температура от 0- 5 °C.

5.5. Тест-култура (спорова суспензия)

5.5.1. Прехвърлят се 20 ml от хранителния агар (точка 5.1.1) асептично в стерилно петри (точка 4.2.2), което се охлажда до стайна температура.

5.5.2. Прехвърлят се 5 ml стерилна дестилирана вода със стерилна пипета (точка 4.2.4) в епруветката със щамова култура (точка 5.4.2) и с помощта на стерилно уxo (йозе) се отмиват спорите от наклонения агар. Така получената спорова суспензия се съхранява при температура 0- 5 °C и е годна за употреба до 36 часа от приготвянето ѝ.

5.5.3. Прехвърлят се 0,5 ml от споровата суспензия (точка 5.5.2) със стерилна пипета (точка 4.2.4) върху тест-културата (точка 5.5.1), като посявката се разстила равномерно по цялата повърхност с помощта на стъклено бастунче. Култивира се при температура 63 ± 1 °C (точка 4.1.1) в продължение на 16- 18 часа.

Като се използва щамова култура (точка 5.4.2) или култура, която е престояла повече от 36 часа, опресняването на културата се извършва най-малко два пъти, като интервалът между двете препосивания не трябва да превишава 36 часа.

5.5.4. Прехвърлят се 10 ml дестилирана вода със стерилна пипета (точка 4.2.4) върху културата (точка 5.5.3), като спорите от повърхността се отстраняват в суспензията с помощта на стъклена пръчка.

Споровата суспензия се прехвърля в стъкло (точка 4.2.3) с 250 ml стерилна дестилирана вода. Стъклото се затваря и разклаща старателно. Култури, които не подлежат на незабавно опресняване, се съхраняват в хладилник при температура от 0- 6 °C.

5.5.5. След култивиране на споровата суспензия върху агарна среда при температура 63 ± 1 °C в продължение на 16- 18 часа броят на жизнеспособните микроорганизми в

нея трябва да е между 5 и 10 милиона за милилитър. Мътността на суспензията трябва да бъде еднородна; култури, в които се наблюдават флокули (плуваща влакнеста утайка) или седимент, се изхвърлят и от щамовата култура (точка 5.4.2) се приготвя нова суспензия.

5.6. *Подготовка на епруветките/ампулите*

5.6.1. Агарната среда (точка 5.1.2) се разтапя и охлажда до 55 °C.

5.6.2. Една част от прясно приготвената спорова суспензия (точка 5.5.4) се прибавя към пет части от агарната среда в епруетка или стъкло (точка 5.6.1) и се разбъркват добре.

5.6.3. Прехвърлят се 0,3 ml от инокулираната среда (точка 5.6.2) в стерилна епруетка или ампула (точка 4.2.6) до образуването на слой с дебелина 5 mm, след което последната се затваря със запушалка или капачка или чрез разтапяне на края. Епруетките/ампулите се охлаждат изправени до втвърдяване на средата, след което се оставя да престои за не по-малко от 12 часа.

5.6.4. Епруетките/ампулите могат да се използват още същия ден или да бъдат съхранени в продължение на няколко месеца, ако се охладят непосредствено след приготвянето им при температура 0- 6 °C.

6. Процедура

6.1. Пробите се изследват в най-кратък срок - за предпочитане в рамките на 24 часа от вземането им, като междувременно се съхраняват при температура 0- 5 °C. Ако пробите не могат да бъдат изследвани в рамките на 24 часа, те се съхраняват дълбоко замразени при -30 до -15 °C, за да се сведе до минимум инактивацията на пеницилин.

6.2. Всяка епруетка/ампула (точка 5.6) се маркира четливо и незаличимо. След отстраняване на капачките или запушалките в статива-решетка (точка 4.1.3) се поставят необходимите за пробите и контролите (точки 5.2 и 5.3) епруетки/ампули.

6.3. Към всяка от епруетките/ампулите се добавя по 50 микролитра от хранителната среда (точка 5.1.4).

6.4. Пробата с мляко се размесва добре. Прехвърля се 0,1 ml от нея в съответната маркирана епруетка/ампула с помощта на спринцовка (точка 4.1.4). За всяко прехвърляне се използва крайник за еднократна употреба.

6.5. Манипулациите, описани в точка 6.4, се повтарят, като вместо пробата с мляко (точка 5.2.3) се използва стандартен пеницилинов разтвор, съдържащ 0,004 µg/ml (= 0,0067 IU/ml) пеницилин.

6.6. Манипулациите, описани в точка 6.4, се повтарят, като вместо пробата с мляко се използва контролният разтвор на свободно от инхибиторни вещества мляко (точка 5.3).

6.7. Епруветките/ампулите се затварят и поставят в статива-решетка, който се потапя във водна баня при температура 63 ± 1 °C (точка 4.1.2) за не по-малко от $2\frac{1}{2}$ - $2\frac{3}{4}$ часа.

6.8. Стативът-решетка с епруветките/ампулите се изважда от водната баня.

6.9. Изследва се оцветяването на тест-средата (точка 7).

7. Интерпретация на резултатите

7.1. Пурпурното оцветяване на тест-средата в пробата с мляко или епруветките/ампулите с контролата показва наличието на антибиотици или сулфонамиди на или около ниво „Всички проби положителни“, представено в таблицата на стр. 39. Тест-средата е достатъчно чувствителна, ако пурпурното оцветяване на стандартния пеницилинов разтвор (точка 6.5) в епруветките/ампулите остане стабилно.

7.2. Пурпурното оцветяване само на част от тест-средата или неравномерното оцветяване в която и да било епруетка/ампула с пробата мляко показва наличието на инхибиторни вещества в пробата между нивата, представени в таблицата на стр. 39.

7.3. Оцветяването на тест-средата в пробата мляко или контролата в жълто показва отсъствието на потискащи тест-организма вещества.

7.4. Ако във всички изследвани епруетки/ампули, в т. ч. и отрицателната контрола, се наблюдава пурпурно оцветяване, тест-средата не съдържа жизнеспособни микроорганизми и пробите трябва да се подложат на повторно изследване, като за целта се приготви нов тест-материал.

8. Потвърждаване на резултатите

8.1. Пробите се потвърждават с описаните в точка 7.1 и 7.2 реакции в съответствие с метод Б.

Ако е необходимо съхраняване на пробите преди потвърждаването на резултатите, те се съхраняват дълбоко замразени, за да се избегне разграждането на антибиотиците.

Б. Метод за потвърждаване наличието на пеницилин и определяне на концентрацията му

1. Цел и приложение

Методът определя начините за потвърждаване наличието на пеницилин или различни от пеницилина антибиотици и за определяне концентрацията на пеницилин в проби, показали положителни или съмнителни реакции (А 7.1 и А 7.2).

Чувствителност на различните антибиотици при процедурата

вж. А.1.

2. Определение

2.1. Ако около диска се появи светла зона с размери най-малко 2 mm, пробата мляко съдържа антибиотици и сулфонамиди.

2.2. Ако около диска с добавената към пробата мляко, съдържаща антибиотици, включващи сулфонамид (точка 2.1), с добавена пеницилиназа (беталакматаза) не се появи светла зона, или се наблюдава светла зона с по-малък диаметър от този на пробата без пеницилиназа, *инхибиторното вещество е пеницилин или пеницилин и друг антибиотик, включващ сулфонамиди.*

2.3. Ако зоната около диска не бъде инактивирана от пеницилиназата (точка 2.2), пробата мляко съдържа *различен от пеницилина инхибитор*, който може да представлява *друг остатък* (вж. Директива 85/397/ЕИО, приложение А, глава VI, точка А, 1, буква е) и 2, буква б).

Някои полусинтетични пеницилини като натриевия клоксацилин не се инактивират или само частично се инактивират, или са напълно устойчиви на пеницилиназата и поради това не се идентифицират като пеницилина (точка 7.3).

3. Принцип

Книжен филтърен диск, натопен в изследваното мляко, се поставя върху агарна среда, предварително засята с *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis*. Култивирането, което води до нормален растеж на тест-организма, причинява помътняване на агара. Наличието на потискащи растежа на организма вещества в млякото се доказва с появата на светла зона около диска. Размерът на зоната зависи, наред с други неща, и от концентрацията и вида на инхибитора в млякото.

4. Апаратура, лабораторна стъклария и оборудване

4.1. Апаратура

4.1.1. Вж. А.4.1.

4.1.2. Водна баня за работа при температура 80 ± 1 °C.

4.2. Лабораторна стъклария

Вж. А.4.2.

4.3. *Книжни дискове*, свободни от инхибитори, с диаметър 9- 13 mm, поемащи около 130 mg (препоръчва се да се съхраняват в ексикатор).

5. Среди, стандартни разтвори, разтвор на пеницилиназата, реактиви, тест-организъм и др.

Съставките на средата трябва да отговарят на изискванията за бактериологични изследвания. Използваната вода трябва да бъде дестилирана в стъкло или деминерализирана с равностойна чистота и да не съдържа вещества, потискащи растежа на тест-организма.

5.1. *Среди*

5.1.1. Хранителен агар (А. 5.1.1)

5.1.2. Тест-среда за доказване наличието на инхибиторни вещества

Състав:

Дрождев екстракт 2,5 g

Триптон 5 g

Глюкоза 1 g

Разтвор на триметоприм или тетроксоприм (А.5.1.3) 10 ml

Агар 10- 15 g (в зависимост от желиращите свойства на използвания агар)

Вода 1 000 ml

Приготвяне

Твърдите съставки се разтварят напълно във водата чрез нагряване и разбъркване. Добавя се разтворът на триметоприм или тетроксоприм. Коригира се рН, така че след стерилизацията да бъде равна на $8,0 \pm 0,1$ при температура 25 °С. Средата се стерилизира при температура 121 ± 1 °С в продължение на 15 минути.

5.2. *Стандартни пеницилинови разтвори в мляко*

Вж. А.5.2.

За количественото определяне на инхибиторните вещества (точка 8) се приготвят стандартни пеницилинови разтвори в свободно от потискащи субстанции мляко (А.5.3) в следните концентрации:

а) 0,004 µg/ml (0,0067 IU/ml)

б) 0,006 µg/ml (0,01 IU/ml)

в) 0,03 µg/ml (0,05 IU/ml)

г) 0,06 µg/ml (0,1 IU/ml)

5.3. *Разтвор на пеницилиназа*

5.3.1. Разтваря се достатъчно количество пеницилиназа (беталакматаза) в стерилна дестилирана вода за получаването на концентрация 1 000 единици/ml. Този разтвор, за предпочитане разделен на малки части, може да се съхрани до две седмици при температура 0- 5 °С.

Бележка

Няма установен международен стандарт за активността на пеницилиназата. Затова за целите на метода се приема, че 10 единици пеницилиназа са достатъчни да инактивират 0,6 µg (= 1 IU) пеницилин. При доставка на пеницилиназа с неизвестна активност е необходимо това да бъде проверено и ако не е вярно, да се коригира съответно концентрацията на пеницилиназата.

5.3.2. Вместо разтвор на пеницилиназа могат да се използват предлаганите на пазара готови дискове, напоени с пеницилиназа, ако при проверката се установи, че съдържат необходимото количество пеницилиназа.

5.4. *Тест-организъм*

Вж. А.5.4.

5.5. *Тест-култура (спорова суспензия)*

Вж. А.5.5.

5.6. *Приготвяне на посевките за изследване*

5.6.1. Тест-средата се разтапя за доказване на инхибиторни вещества (точка 5.1.2) и след това се охлажда до температура 55 °C.

5.6.2. В стъкло се прибавя една част от прясно приготвената спорова суспензия (точка 5.5) към толкова части от тест-средата (точка 5.1.2), колкото са необходими за получаване на необходимата плътност на колонии в инокулираната тест-среда, след което съдържанието се размесва добре.

5.6.3. В предварително затоплено до 55 °C стерилно петриево блюдо (А 4.2.2) се прехвърля достатъчно количество от инокулираната тест-среда (точка 5.6.2) за образуването на слой с дебелина 0,6- 0,8 mm. За получаването на слой с дебелина 0,8 mm в петри с вътрешен диаметър 140 mm са необходими около 15 ml от тест-средата.

5.6.4. Петритата се поставят върху студена, хоризонтална повърхност, предварително нивелирана със спиртен нивелир; капците се свалят и се оставя до втвърдяване на агарната среда. След втвърдяването на средата капците се поставят обратни и се обръщат, така че кондензацията на вода по повърхността на средата да се сведе до минимум.

5.6.5. За предпочитане е така приготвените посеви за изследване да бъдат използвани още същия ден. В противен случай те могат да се съхраняват в продължение на не повече от две седмици в полиетиленови пликове, запечатани непосредствено след приготвянето им, при температура 5 °C.

5.6.6. За идентифициране на посевките дъното на петриевите блюда се обозначава.

6. Процедура

6.1. *Подготовка на пробата*

6.1.1. Проби с положителни или съмнителни реакции съгласно „метод А“ (точка А.7.1 и А.7.2) подлежат на повторно изследване с цел идентифицирането и количественото определяне на пеницилина.

6.1.2. Първоначално въпросните проби се нагряват до температура 80 ± 1 °C за 10 минути с цел да се избегне влиянието на термолабилни неспецифични инхибитори.

6.1.3. След като бъде добре размесено, 10 ml от предварително затопленото мляко за изследване се прехвърля в подходящо стъкло с широко гърло. Към млякото се добавят около 0,4 ml разтвор на пеницилиназа (точка 5.3) и се разбърква добре.

6.2. Доказване наличието на инхибиторни вещества

6.2.1. С помощта на чисти, сухи пинсети в пробата мляко (точка 6.1.2) се потапя книжен диск (точка 4.3). Излишното мляко се отстранява чрез притискане на диска към стената на стъклото с пробата. Дискът се поставя хоризонтално върху повърхността на посевката (точка 5.6) и се притиска леко с пинсетите.

6.2.2. Дисковете, потопени в различните проби с мляко, трябва да се поставят на разстояние най-малко 20 mm един от друг и минимум 10 mm от края на посевката.

6.2.3. За проверка на чувствителността дискове (точка 4.3), напоени със стандартен пеницилинов разтвор (точка 5.2), се поставят в случаен ред между дисковете, напоени с млякото за изследване, в количество най-малко 2 % от броя на дисковете, напоени с мляко за изследване. За всяко изследване се използват най-малко пет диска със стандартен разтвор.

6.2.4. След като дисковете се поставят върху агарната среда в случаен ред и се идентифицират, петритата се обръщат и се култивират при температура 63 ± 1 °C в продължение на $2\frac{1}{2}$ до пет часа.

6.2.5. След култивиране посевките се изследват на подходяща светлина за образуване се около книжните дискове на светли зони на инхибиране. Измерват се образуваните се около диска светли зони.

6.2.6. Зоните, образували се около диска, напоен със стандартен пеницилинов разтвор (точка 6.2.3), трябва да са с диаметър не по-малко от 2 mm.

6.2.7. Светлите зони около дискове, напоени с млякото за изследване, с диаметър, поне равен или по-голям от този, предвиден в точка 6.2.6, показва наличието на потискащи растежа на тест-организма вещества.

6.3. Идентифициране и количествено определяне на инхибиторните вещества

6.3.1. Процедурата, описана в точка 6.2.1, се провежда посредством паралелни проби от предварително затопленото мляко за изследване (точка 6.1.2) и третираната с пеницилиназа проба (точка 6.1.3). Вместо разтвора, получен от прибавянето на пеницилиназа към 10 ml от пробата с мляко, може да бъде използван предварително приготвен с разтвор на пеницилиназа диск (точка 5.3.2), напоен с млякото за изследване, и поставен върху посевката.

6.3.2. Процедурата, описана в точка 6.2.1, се провежда с паралелни проби за всеки стандартен пеницилинов разтвор, приготвен съгласно точка 5.2, а) до г).

6.3.3. Определят се средните диаметри на светлите зони на инхибиране, както за пробата с мляко и контролата, съдържаща пеницилиназа, така и за стандартните пеницилинови разтвори.

7. Интерпретация на резултатите (вж. точка 2)

7.1. Ако около диска с контролния разтвор на пеницилиназа не се появи светла зона, но такава се образува около диска с пробата мляко, чийто диаметър е равен или по-голям от този на диска със стандартния пеницилинов разтвор(точка 5.2, а), съдържащият се в пробата инхибитор съответства на концентрация на натриев (калиев)-бензил-пеницилин от най-малко 0,004 µg/ml.

7.2. Ако средният диаметър на светлата зона около диска, напоен с разтвора на пеницилиназа, е равен на средния диаметър на светлата зона около диска, напоен с млякото, млякото съдържа потискащи вещества, които използваните в настоящия метод концентрации на разтвора с пеницилиназа не могат да инактивират.

7.3. Ако средният диаметър на светлата зона около диска, напоен с разтвора на пеницилиназа, е по-малък от средния диаметър на светлата зона около диска, напоен с предварително нагрятата съгласно точка 6.1.2 проба мляко, освен пеницилин или полусинтетичен пеницилин, който не може да бъде идентифициран с използваната в този метод концентрация на пеницилиназата, млякото съдържа пеницилин и други антибиотици, включващи сулфонамиди. Синтетичните пеницилини като натриевия клоксацин например могат да не бъдат инактивирани от пеницилиназата при условията на опита и следователно могат да бъдат класифицирани като инхибитори, различни от пеницилина.

Бележка

При необходимост от доказване наличието на различни от пеницилина инхибитори се използват подходящи за целта методи.

8. Определяне съдържанието на пеницилин

8.1. Съдържанието на пеницилин може да бъде определено чрез построяване на стандартна крива или изчислено въз основа на размерите на зоните, получени от стандартните пеницилинови разтвори в млякото(точка 5.2, а- г).

8.2. Построяване на стандартна крива

Тъй като между $\log_{10}$ на концентрацията на пеницилина и диаметъра на зоните на инхибиране съществува линейна зависимост, стандартната крива може да се построи на милиметрова хартия, като концентрацията на пеницилина се представи по ординатата, а зоните на инхибиране по абсцисата. Зоните на инхибиране се изчисляват като средна стойност от паралелно проведените опити. Диаметрите на зоните се нанасят срещу различните стойности на концентрация на стандартните пеницилинови разтвори. Отделните точки се свързват, за да се получи стандартната крива.

8.3. Изчисляване

Различната концентрация на пеницилин в млякото се изчислява въз основа на диаметрите на зоните посредством подходящо уравнение или стандартната крива. За по-голяма точност на анализа радиусът на зоните на инхибиране трябва да е поне два пъти, но не повече от пет пъти, по-голям от радиусите на дисковете.

9. Представяне на резултатите

9.1. Резултатите се представят като количество пеницилин, равно или надвишаващо 0,004 µg/ml (или чрез посочване на определената концентрация), или количество инхибитори, различни от пеницилина.

9.2. Повторяемост (*r*) и възпроизводимост (*R*)

Няма значими числени стойности, тъй като се използва стандарт за сравнение.

IX. ДОКАЗВАНЕ НА ПАТОГЕННИ МИКРООРГАНИЗМИ

1. Цел и приложение

В съответствие с Директива 85/397/ЕИО, приложение А, глава VII, точка 2, настоящата глава определя указанията за проверка на пастьоризираното мляко за наличието на патогенни микроорганизми.

2. Определение

На изследване подлежат бактериалните видове, най-често срещани при предаваните по хранителен път болести.

Пастьоризацията е вид обработка, която предпазва млякото от наличието на нетермоустойчиви патогени. Ако са изпълнени изискванията, установени в приложение А, глава VII, точка 2 на директивата за броя на микроорганизмите при температура 30 °C и 21 °C, както и за колиформите и фосфатазата, патогенността на микроорганизмите се доказва допълнително чрез специално изследване само при съмнение, че млякото има връзка със случаи на хранително отравяне.

3. Процедура

Методиката и честотата на изследване се определят от компетентния национален орган по начини, които позволяват издаването на здравни сертификати за топлинно обработеното мляко, предназначено за търговия държавите в рамките на Общността. За откриване на патогенни микроорганизми в млякото се прилагат международно приетите критерии и процедури, ако има такива.

4. Протокол от изследването

Резултатите от изследването на всеки отделен патогенен микроорганизъм се записват по следния начин:

Брой в милилитър мляко или „наличие“ или „отсъствие“ на микроорганизми в задължителния за използвания метод обем пастьоризирано мляко. Протоколът трябва да съдържа ясно описание на използвания метод.