

PASZE	N O R M A   B R A N Ż O W A	BN-84
	<b>Pasze</b> <b>Oznaczenie tylozyny w preparatach, koncentraty, premiksach i mieszankach paszowych metodą mikrobiologiczną</b>	9160-27
		Grupa katalogowa 1549

## 1. WSTĘP

**1.1. Przedmiot normy.** Przedmiotem normy jest metoda mikrobiologiczna: płytkowo-studzienkowa oznaczania tylozyny w preparatach, koncentraty, premiksach i mieszankach paszowych.

**1.2. Zakres stosowania normy.** Metoda ma zastosowanie do oznaczania tylozyny w preparacie Tylan, koncentracie KT-1, polfamiksach 3P i 3PW oraz mieszankach PP-prestärter i PP-grower zawierających tylozynę.

## 2. METODA BADANIA

**2.1. Zasada oznaczania** polega na pomiarze średnicy kolistych stref zahamowania wzrostu szczepu testowego *Sarcina lutea* ATCC9341 i obliczeniu na tej podstawie zawartości tylozyny. Czulość metody — 2 mg/kg.

### 2.2. Aparatura i przyrządy

- a) Autoklaw.
- b) Cieplarka.
- c) Aparat Kocha.
- d) Wstrząsarka laboratoryjna.
- e) Wirówka.
- f) Spektrokolorometr.
- g) Pehametr.
- h) Płytki Petriego o średnicy 12 ÷ 15 cm.
- i) Korkobory o średnicy 10 ÷ 13 mm.
- j) Urządzenia projekcyjne lub suwmiarka do pomiaru stref zahamowania wzrostu.

**2.3. Odczynniki, roztwory i materiały.** Podczas analizy, jeżeli nie zaznaczono inaczej, należy stosować wyłącznie odczynniki cz.d.a., oraz wodę destylowaną lub wodę o równoważnej czystości.

a) Substancja standardowa — tylozyna o znanej aktywności.

b) Metanol cz.

c) Sódowy chlorek, roztwór 0,8% (m/V). Roztwór sterylizować 20 min przy ciśnieniu 0,1 MPa (1 atm).

d) Bufor fosforanowy pH — 8,0. Odważyć 0,523 g potasowego fosforanu jednozasadowego (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i 16,730 g potasowego fosforanu dwuzasadowego (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Oba składniki rozpuścić w wodzie. Końco-

wa objętość uzyskanego roztworu wynosi 1 l. Bufor sterylizować 20 min przy ciśnieniu 0,1 MPa (1 atm). Ustalić pH po sterylizacji na 8,0.

e) Bufor fosforanowy pH — 7,0. Odważyć 5,5 g potasowego fosforanu jednozasadowego (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) i 13,6 g potasowego fosforanu dwuzasadowego (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Oba składniki rozpuścić w wodzie. Końcowa objętość uzyskanego roztworu wynosi 1 l. Bufor sterylizować 20 min przy ciśnieniu 0,1 MPa (1 atm). Ustalić pH po sterylizacji na 7,0.

f) Mieszanina buforu i metanolu. Zmieszać bufor o pH 8,0 i metanol w stosunku 60 ÷ 40 (V/V).

g) Papier półlogarytmiczny lub milimetry.

### 2.4. Pożywki, szczepy

**2.4.1. Pożywka do otrzymywania i przechowywania szczepu testowego.**

- a) Glukoza — 1,0 g.
- b) Pepton — 6,0 g.
- c) Trypton — 4,0 g.
- d) Ekstrakt mięsny — 1,5 g.
- e) Ekstrakt drożdżowy — 3,0 g.
- f) Agar — 10 ÷ 20 g.
- g) Woda destylowana do 1000 ml.

Pożywkę sterylizować przez 15 min przy ciśnieniu 0,1 MPa (1 atm). Po sterylizacji pH podłoża ustalić na 7,0. Rozlać do probówek bakteriologicznych po około 3 ml i do butelek Roux po 250 ml pożywki. Butelki Roux ustawić w pozycji poziomej, a probówki w pozycji ukośnej, aż do zastygnięcia podłoża.

**2.4.2. Pożywka do wykonania oznaczania.** Przygotować pożywkę o składzie podanym wg 2.4.1. Po sterylizacji pH ustalić na 8,0.

**2.4.3. Szczep testowy** — *Sarcina lutea* ATTC 9341. Na skos agarowy o pH 7,0 posiać drobnoustrój testowy i inkubować 24 h w temperaturze 35°C. Hodowlę bakteryjną przechowywać w lodówce w temperaturze +4°C i przed upływem 4 tygodni przesiać na nowy skos agarowy.

**2.4.4. Przygotowanie zawiesiny komórek drobnoustroju testowego**

Do dwóch probówek hodowli szczepu testowego na skosie wprowadzić po 2 ml sterylnej, świeżo przygo-

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego  
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 10 lipca 1984 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 stycznia 1985 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 12/1984 poz. 23)

towanego roztworu soli fizjologicznej wg 2.3c) i zmyć hodowlę przy użyciu jałowych perełek szklanych. Uzyskaną zawiesinę przenieść na podłoże w butelce Roux przygotowane wg 2.4.1 i równomiernie rozprowadzić po całej powierzchni podłoża. Inkubować w temperaturze 35°C przez 24 h. Po okresie inkubacji zmyć hodowlę 25 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej wg 2.3c) przy użyciu jałowych szklanych perełek. Uzyskaną zawiesinę przenieść do kolbki stożkowej ze szlifem pojemności 50 ml. Pobrać jałowo 1 ml zawiesiny do kolbki pomiarowej pojemności 50 ml i dodać 24 ml roztworu soli fizjologicznej. Zawartość kolbki wymieszać i zmierzyć gęstość optyczną uzyskanej zawiesiny w spektrokolorymetrze przy długości fali 580 nm i drodze światła 10 mm. Przepuszczalność powinna wynosić  $24 \div 25\%$ . Do oznaczania używać zawiesinę nierozcieńczoną, uzyskaną ze zmycia butelki Roux. Zawiesinę przechowywać w lodówce do 10 dni.

## 2.5. Przygotowanie roztworów standardu

**2.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy.** Odważyć na wadze analitycznej  $10 \div 50$  mg tylozyny o znanej aktywności i rozpuścić w 5 ml metanolu cz. Otrzymany roztwór tak rozcieńczyć za pomocą buforu fosforanowego o pH 7,0, żeby uzyskać aktywność równą 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Roztwór przechowywać w lodówce do dwóch tygodni.

**2.5.2. Roztwory wzorcowe robocze.** Z roztworu podstawowego przyrządzić w dniu oznaczania dalsze rozcieńczenie tylozyny mieszaniną buforu fosforanowego i metanolu czystego wg 2.3f) do uzyskania następujących stężeń: 2,0; 1,0; 0,5; 0,25;  $\mu\text{g/ml}$  ( $S_8, S_4, S_2, S_1$ ).

## 2.6. Wykonanie oznaczania

**2.6.1. Przygotowanie ekstraktów analizowanych prób.** Sporządzić z dokładnością 0,001 g (preparaty, premiksy) lub 0,01 g (koncentraty mieszanki) odważkę próby (załącznik 1) i umieścić w kolbie stożkowej ze szlifem pojemności 250 ml. Dodać 60 ml buforu fosforanowego o pH 8 ogrzanego do temperatury 80°C i zawartość kolby po wymieszaniu wstrząsać na wstrząsarce laboratoryjnej przez 15 min. Roztwór pozostawić na 10 min i po tym czasie dodać 40 ml metanolu cz. wg 2.3b) i wstrząsać dalsze 5 min. Ekstrakt odwirować przy 3000 obr/min w ciągu 10 min. Pobrać odpowiednią ilość supernatantu (załącznik 1) i za pomocą mieszaniny buforu i metanolu wg 2.3f) wykonać rozcieńczenia zgodnie z załącznikiem 1. Stężenie uzyskanego roztworu wynosi 2  $\mu\text{g/ml}$  ( $U_8$ ).

**2.6.2. Przygotowanie rozcieńczeń ekstraktów do badań.** Ekstrakty o stężeniu 2,0  $\mu\text{g/ml}$  ( $U_8$ ) rozcieńczyć mieszaniną buforu i metanolu wg 2.3f) kolejno w stosunku 1:1 uzyskując stężenia:

1,0  $\mu\text{g/ml}$  ( $U_4$ ),

0,5  $\mu\text{g/ml}$  ( $U_2$ ),

0,25  $\mu\text{g/ml}$  ( $U_1$ ).

**2.6.3. Przygotowanie płytek do oznaczeń i przeprowadzenie badania.** Rozpuścić uprzednio przygotowaną wg 2.4.2 pożywkę agarową, ostudzić do temperatury około 50°C i wprowadzić drobnoustrój testowy w ilości 0,05 ml na 30 ml pożywki. Tak przygotowaną pożywkę rozlać do jałowych płytek Petriego. Warstwa podło-

ża powinna wynosić około 2 mm. Po wystygnięciu agar na każdej płytce wyciąć za pomocą korkoboru po 8 otworów. Dla każdej badanej próby przygotować cztery płytki. Na obwodzie płytki zaznaczyć dermatografem miejsce jednego z otworów i posuwając się zgodnie z ruchem wskazówek zegara napełnić otwory roztworami wzorca o stężeniu tylozyny 2,0; 1,0; 0,5; 0,25  $\mu\text{g/ml}$  oraz roztworami z badanej próby o takim samym stężeniu tylozyny w ilości  $0,10 \div 0,15$  ml na otwór. Płytki inkubować przez 18 h w temperaturze  $28 \div 30^\circ\text{C}$ .

**2.7. Obliczenie wyniku oznaczania.** Zmierzyć średnice stref zahamowania wzrostu z dokładnością 0,1 mm. Wyniki pomiarów zapisać w tablicy i wyliczyć średnie arytmetyczne dla odpowiadających sobie stref z 4 płytek zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i badanego. Uzyskane średnie wykorzystać do wyliczenia uśrednionej wartości wielkości strefy zahamowania wzrostu dla najniższego i najwyższego stężenia wzorca i próbki. Wielkość strefy zahamowania dla najniższego stężenia wzorca ( $SL$ ), obliczyć wg wzoru

$$SL = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10} \quad (1)$$

w którym  $S_1, S_2, S_4, S_8$  — średnie arytmetyczne średnic stref zahamowania wzrostu dla roztworów wzorcowych tylozyny przy stężeniach 0,25; 0,5; 1,0; 2,0  $\mu\text{g/ml}$ , mm.

Wielkość strefy zahamowania dla najwyższego stężenia wzorca ( $SH$ ), obliczyć wg wzoru

$$SH = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1}{10} \quad (2)$$

w którym  $S_1, S_2, S_4, S_8$  — jak we wzorze (1).

Obliczając wielkość stref zahamowania wzrostu dla próby korzystać z tych samych wzorów wstawiając w miejsce symbolu  $S$  symbol  $U$ . Znaczenie symboli  $S$  i  $U$  jest identyczne jak we wzorze na obliczanie logarytmu względnej aktywności ( $\lg A$ ).

Wyliczone wartości dla wzorca i próby nanieść na papier półlogarytmiczny z zaznaczonymi stężeniami w  $\mu\text{g/ml}$  na skali logarytmicznej i średnicami stref zahamowania wzrostu w mm na skali arytmetycznej. W przypadku braku papieru półlogarytmicznego średnice stref zahamowania wzrostu odnieść do logarytmów stężeń. Przez uzyskane punkty wykreślić proste dla roztworu wzorcowego ( $S$ ) i badanego ( $U$ ). Otrzymane linie powinny być równoległe, co daje pewność, że podczas badania nie nastąpiły interferencje.

Linie można także uznać za równoległe, jeżeli wartości różnic  $SH-SL$  i  $UH-UL$  nie różnią się więcej niż 10% ich średniej wartości. Jeżeli warunek równoległości linii jest spełniony obliczyć logarytm względnej aktywności tylozyny ( $\lg A$ ) wg wzoru

$$\lg A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \cdot 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2} \quad (3)$$

w którym:

$U_1, U_2, U_4, U_8$  — średnie arytmetyczne średnic stref zahamowania wzrostu dla roztworów badanych prób przy założonych stężeniach tylozyny 0,25; 0,5; 1,0; 2,0  $\mu\text{g/ml}$ , mm,

$S_1; S_2; S_4; S_8$  — jak we wzorze 1,

0,602 — współczynnik przeliczeniowy.

Rzeczywistą zawartość tylozyny w badanej próbce ( $X$ ) obliczyć wg wzoru

$$X = y \cdot z \quad (4)$$

w którym:

$y$  — założona zawartość tylozyny,

$z$  — antylogarytm względnej aktywności.

Założoną zawartość tylozyny wraz z jednostkami podaje załącznik 1. Antylogarytm względnej aktywności tylozyny powinien mieścić się w zakresie od 0,5 do 2,0. Jeżeli warunek ten nie jest spełniony, oznaczenie należy powtórzyć zwracając szczególną uwagę na odpowiednie dostosowanie stężenia ekstraktu do wzorca.

**2.8. Wynik końcowy oznaczania.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń nie różniących się więcej niż 5% błędu względnego w przypadku preparatu i premiksów i 10% błędu względnego w przypadku koncentratu i mieszanek. Wynik podać w zaokrągleniu do jednego miejsca po przecinku.

K O N I E C

ZAŁĄCZNIK

### DANE DLA PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW ANALIZOWANYCH PRÓB

Nazwa próby	Założona zawartość tylozyny	Wielkość odważki g	Objętość pobranego supernatantu ml	Rozcieńczenie do objętości ml
Tylan	100 g/kg	1	2	100 <sup>1)</sup>
Polfamiks 3P	5 g/kg	4	1	100
Polfamisk 3P G	4 g/kg	5	1	100
Koncentrat KT-1	200 mg/kg	10	5	50
Mieszanka PP-prestarter	100 mg/kg	20	5	50
Mieszanka PP-grower	40 mg/kg	20	5	20

<sup>1)</sup> Pobrać 5 ml i rozcieńczyć do objętości 50 ml.

### INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie z/s w Snopkowie 21-002 Jastków.

2. Autorzy projektu normy — mgr Bożena Nogalska, mgr Maria

Jakubowska — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego; dr Bolesław Wojtoń, lek. wet. Jadwiga Działoszyńska — Instytut Weterynarii, Puławy.