

PASZE	N O R M A B R A N Ź O W A	BN-85
	Oznaczenie awoparcyny w premiksach, koncentratkach i mieszankach paszowych, metodą mikrobiologiczną	9160-28
		Grupa katalogowa 1549

## 1. WSTĘP

Przedmiotem normy jest metoda mikrobiologiczna płytkowo-studzienkowa oznaczania awoparcyny w premiksach, koncentratkach i mieszankach paszowych.

## 2. METODA BADAŃ

**2.1. Zasada metody** polega na pomiarze średnicy kołystych stref zahamowania wzrostu szczepu testowego *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i obliczaniu na tej podstawie zawartości awoparcyny.

### 2.2. Aparatura i przyrządy

- a) Autoklaw.
- b) Cieplarka.
- c) Aparat Kocho.
- d) Wstrząsarka laboratoryjna.
- e) Pehametr.
- f) Wirówka.
- g) Aparat do pomiaru stref zahamowania lub suwmiarka.
- h) Korkobory o średnicy 10 mm.
- i) Płytki Petriego o średnicy 12 cm.
- j) Butelki Roux.

### 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 — awoparcyna o znanej aktywności.
- b) Chlorek sodowy — roztwór 0,9%, sterylny. Odważyć 9 g NaCl, rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić do 1000 ml. Sterylizować 20 min pod ciśnieniem 0,1 MPa (1 atm).
- c) Kwas solny.
- d) Wodorotlenek sodowy, roztwór o  $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$ .
- e) Bufor fosforanowy o pH 4,5.

Rozpuścić 13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  w 1000 ml wody destylowanej. Sterylizować 20 min pod ciśnieniem 0,1 MPa (1 atm). Po sterylizacji pH powinno wynosić 4,5.

f) Mieszanina ekstrakcyjna.

Aceton, woda, kwas solny stężony, zmieszane w stosunkach objętościowych: 65:32,5:2,5.

### 2.4. Pożywki, szczep testowy

**2.4.1. Pożywka do hodowli**, przechowywania szczepu testowego i wykonania oznaczeń.

- a) Pepton — 6 g.
- b) Ekstrakt mięsny — 1,5 g.
- c) Ekstrakt drożdżowy — 3 g.
- d) Agar — 20 g.
- e) Woda destylowana do 1000 ml.

Składniki należy rozpuścić przez podgrzanie. Rozlać po około 300 ml do butelek Roux, po około 7 ml do probówek. a w przypadku stosowania pożywki do wykonania oznaczeń rozlać do kolb stożkowych w ilości potrzebnej do jednorazowego użytku. Sterylizować 30 min pod ciśnieniem 0,1 MPa (1 atm), po sterylizacji pH powinno wynosić 6,5 ( $\pm 0,1$ ).

### 2.4.2. Szczep testowy *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Na skos agarowy wg 2.4.1 posiać drobnoustrój testowy i inkubować 18 ÷ 24 h w temperaturze 30°C. Hodowlę przechowywać w lodówce w temperaturze +4°C i przed upływem miesiąca przesiać na nowy skos agarowy.

**2.4.3. Przygotowanie zawiesiny zarodników drobnoustroju testowego.** Skosy agarowe z wyhodowanym szczepem testowym wg 2.4.2 zmyć za pomocą 5 ml chlorku sodowego wg 2.3b), przy użyciu jałowych perełek szklanych. Uzyskaną zawiesinę przenieść na podłoże w butelce Roux wg 2.4.1 i równomiernie rozprowadzić po całej powierzchni podłoża. Inkubować przez 5 ÷ 7 dni w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji zmyć hodowlę 10 ml chlorku sodowego wg 2.3b) przy użyciu jałowych perełek szklanych. Sprawdzić pod mikroskopem zdolność wytwarzania zarodników i zawiesinę dobrze wymieszać. Tak przygotowana zawiesina może być przechowywana w lodówce przez 5 miesięcy.

**2.4.4. Określanie optymalnej ilości zawiesiny używanej w badaniach.** Pożywkę wg 2.4.1 rozpuścić na łaźni wodnej i rozlać po 30 ml do 6 kolb stożkowych pojemności 100 ml. Do każdej kolby z pożywką ostudzoną do temperatury około 50°C wprowadzić następujące ilości:

Zgłoszona przez Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego  
Ustanowiona przez Dyrektora Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego dnia 11 listopada 1985 r.  
jako norma obowiązująca od dnia 1 lipca 1986 r.  
(Dz. Norm. i Miar nr 3/1986 poz. 7)

0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ml zawiesiny zarodników drobnoustroju testowego. Zawartość kolb dobrze wymieszać i wylać na płytki Petriego w takiej ilości, aby uzyskać warstwę agarową około 2 mm. Po zastygnięciu podłoża sterylnym korkoborem na każdej płytce wyciąć 4 studzienki. Studzienki napęlnić roztworem w ilości 0,15 ml wzorca awoparcyny o stężeniu 0,5; 1,0; 2,0; 4,0  $\mu\text{g/ml}$  ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$ ). Płytki pozostawić przez 1 h na stole laboratoryjnym, a następnie przenieść do cieplarki i inkubować przez 16 ÷ 18 h w temperaturze 30°C. Po inkubacji ocenić wielkość i ostrość uzyskanych stref zahamowania wzrostu i wybrać optymalną ilość zawiesiny, która będzie stosowana w badaniach.

Optymalna jest ta ilość zawiesiny, przy której uzyskuje się wyraźne strefy zahamowania wzrostu bakterii o następujących średnicach:

- $S_1$  — około 15 mm,
- $S_2$  — około 18 mm,
- $S_4$  — około 21 mm,
- $S_8$  — około 24 mm.

## 2.5. Przygotowanie roztworu standardu

**2.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy.** Odważyć około 10 mg awoparcyny wg 2.3a) z dokładnością do 0,0001 g i rozpuścić w buforze fosforanowym wg 2.3e) w takiej ilości, aby powstały roztwór zawierał 100  $\mu\text{g/ml}$ . Jeżeli roztwór wzorcowy nie ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu należy odważoną ilość awoparcyny rozpuścić w mieszaninie ekstrakcyjnej wg 2.3f). Przechowywać w zamkniętej butelce w lodówce w temperaturze 4°C. Trwałość roztworu wynosi około 7 dni.

**2.5.2. Roztwory wzorcowe robocze.** Z roztworu podstawowego sporządzić w dniu wykonania oznaczania, roztwory robocze o następującym stężeniu awoparcyny: w wypadku wykonywania oznaczeń w polfamijsach i koncentratkach 4,0; 2,0; 1,0; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , w mieszaninach paszowych 2,0; 1,0; 0,5; 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Rozcieńczenia wykonywać buforem fosforanowym wg 2.3e), stężenia zmniejszać rozcieńczając w stosunku 1:1.

## 2.6. Wykonywanie oznaczeń

### 2.6.1. Przygotowanie ekstraktów prób do analizy

**2.6.1.1. Przygotowanie ekstraktów awoparcyny z premiksów i koncentratów.** Z przygotowanej wg PN-75/R-64769 średniej próbki laboratoryjnej, sporządzić z dokładnością do 0,01 g odważkę dobrze wymieszanej próbki, wg załącznika 1 i umieścić w kolbie pomiarowej na 100 ml. Zalać próbkę 60 ml mieszaniny ekstrakcyjnej wg 2.3f). Wytrząsać przez 15 min na wstrząsarce. Po zakończeniu wytrząsania sprawdzić pH i doprowadzić do pH 2 używając HCl. Uzupelnąć objętość próbki do 100 ml mieszaniną ekstrakcyjną. Sączyć przez bibułę do sączenia Whatman No 1. Pierwsze 5 ml przesączu należy odrzucić, następne ilości przesączu — zbierać. Przesącz należy rozcieńczyć buforem fosforanowym do stężenia awoparcyny 4,0  $\mu\text{g/ml}$  wg załącznika 1. Z tego roztworu przygotować stężenia 2,0; 0,1 i 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , rozcieńczając buforem fosforanowym w stosunku 1:1.

**2.6.1.2. Przygotowanie ekstraktów awoparcyny z mieszanek paszowych.** Z przygotowanej wg PN-75/R-64769 średniej próbki laboratoryjnej, sporządzić z dokładno-

ścią do 0,01 g odważkę 50 g dobrze wymieszanej i zmielonej próbki i umieścić w kolbie stożkowej pojemności 250 ml. Zalać dokładnie odmierzoną 100 ml mieszaniny ekstrakcyjnej wg 2.3f) i wytrząsać na wstrząsarce przez 30 min. Zawartość przenieść do zamkniętych probówek wirówkowych i wirować 15 min przy 2500 obr/min. Klarowny roztwór osadu należy przenieść do 150 ml kolbek Erlenmayera i doprowadzić do pH 4,5 za pomocą NaOH wg 2.3d). Tak otrzymany roztwór należy rozcieńczyć wg załącznika 2, buforem fosforanowym wg 2.3e), w celu uzyskania próbki o zawartości 2,0  $\mu\text{g/ml}$  awoparcyny. Rozcieńczenie 1,0; 0,5 i 0,25  $\mu\text{g/ml}$  otrzymać rozcieńczając próbkę o stężeniu 2,0  $\mu\text{g/ml}$  za pomocą buforu fosforanowego w stosunku 1:1.

**2.6.2. Przygotowanie płytek do oznaczeń i przeprowadzenie badań.** Dla każdej próbki należy przygotować 4 płytki. Rozpuścić uprzednio przygotowaną wg 2.4.1 pożywkę agarową przez podgrzanie, ostudzić do temperatury około 50°C i wprowadzić optymalną ilość zawiesiny drobnoustroju testowego sprawdzoną doświadczalnie wg 2.4.4. Ustawić płytki Petriego o równym dnie na wypoziomowanym stole i rozlać po 18 ml zaszczepionej pożywki, aby uzyskać warstwę agarową grubości około 2 mm. Po zastygnięciu pożywki wstawić płytki do lodówki do temperatury około 4°C na 1 h. Na każdej płytce po wyjęciu z lodówki należy wyciąć korkoborem osiem studzienek. Poszczególne studzienki napęlnić roztworem w ilości 0,15 ml awoparcyny o odpowiednim stężeniu  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$  wg 2.5.2 oraz roztworem 0,15 ml badanej próbki  $U_1$ ,  $U_2$ ,  $U_4$ ,  $U_8$  wg 2.6.1.1 lub 2.6.1.2, zaznaczając na obwodzie płytki dermatografem pierwsze stężenie, a następne roztwory wprowadzać zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Płytki pozostawić przez 1 h na stole laboratoryjnym, a następnie przenieść do cieplarki i inkubować przez 16 ÷ 18 h w temperaturze 30°C.

**2.7. Obliczanie wyników.** Zmierzyć strefy zahamowania wzrostu bakterii z dokładnością do 0,1 mm. Wyniki pomiarów zapisać w tabeli i wyliczyć średnie arytmetyczne dla odpowiadających sobie stężeń i stref z 4 płytek zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i dla badanego. Uzyskane średnie są podstawą do wyliczenia uśrednionej wartości wielkości stref zahamowania wzrostu dla najniższego  $SL$  i najwyższego  $SH$  stężenia standardu oraz próby  $U$  wg wzorów

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

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

w których:  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_4$ ,  $S_8$  — średnie arytmetyczne stref zahamowania wzrostu dla kolejnych rozcieńczeń wzorca awoparcyny przy stężeniu wg 2.5.2, (mm).

Dla obliczania wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii dla próbki należy wykorzystać te same wzory wstawiając zamiast symboli  $S$  symbol  $U$ . Wyliczyć różnice  $SH - SL$  i  $UH - UL$ . Jeżeli wyliczone różnice

nie są większe niż 10% ich średniej wartości, należy uznać, że został spełniony warunek równoległości, obrazujący zależność pomiędzy stężeniem awoparcyny a wielkością stref zahamowania wzrostu bakterii, odpowiednio dla roztworów standardowych jak i badanych. Mając zebrane w tabeli średnie wartości stref zahamowania wzrostu bakterii dla poszczególnych stężeń standardu i próby należy obliczyć logarytm  $A$  wg wzoru

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

a następnie zawartość awoparcyny w badanej próbce

$$X = Y \times A \quad (4)$$

w którym:

$Y$  — założona zawartość awoparcyny w badanym produkcie,

$A$  — współczynnik proporcjonalności odczytany z logarytmu  $A$ .

**2.8. Wyniki końcowe oznaczeń.** Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników dwóch równoległych oznaczeń, różniących się nie więcej niż o 5% błędu względnego w przypadku premiksów i koncentratów i o 10% błędu względnego w przypadku mieszanek paszowych.

Wynik należy podać w zaokrągleniu do jednego miejsca po przecinku.

K O N I E C

#### ZAŁĄCZNIK 1

#### DANE DO PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW AWOPARCYN Y Z PREMIKSÓW I KONCENTRATÓW

Zakładana zawartość awoparcyny $\mu\text{g/g}$	Odważka g	Objętość mieszaniny ekstrakcyjnej ml	Ilość ekstraktu pobrana do końcowego rozcieńczenia ml	Objętość końcowa ml	Zawartość awoparcyny $\mu\text{g/ml}$
1500	26,66	100	2	50	4
750	13,33	100	2	50	4
2000	5,0	100	2	50	4
2000	5,0	100	2	50	4
1000	10,0	100	2	50	4
4000	2,5	100	2	50	4
80	25,0	100	10	50	4
80	25,0	100	10	50	4
108	18,5	100	10	50	4
74	27,0	100	10	50	4

#### ZAŁĄCZNIK 2

#### DANE DO PRZYGOTOWANIA EKSTRAKTÓW AWOPARCYN Y Z MIESZANEK PASZOWYCH

Zakładana zawartość awoparcyny $\mu\text{g/g}$	Odważka g	Objętość mieszaniny ekstrakcyjnej ml	Ilość ekstraktu pobrana do końcowego rozcieńczenia ml	Objętość końcowa ml	Zawartość awoparcyny $\mu\text{g/ml}$
5,0	50	100	20	25	2
7,5	50	100	15	25	2
10,0	50	100	20	50	2
15,0	50	100	15	50	2
20,0	50	100	20	100	2
40,0	50	100	10	100	2

#### INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę — Centralne Laboratorium Przemysłu Paszowego, Lublin z siedzibą w Snopkowie.

2. Normy związane

PN-75/R-64769 Pasze. Pobieranie próbek

3. Autor projektu normy — mgr Maria Jakubowska.