

εργαστήριο σε ψύξη, και το διάστημα μεταξύ δειγματοληψίας και ανάλυσης πρέπει να είναι κατά το δυνατόν συντομότερο .

Στις διάφορες μεθόδους αναφέρονται ειδικές προφυλάξεις για ορισμένες αναλύσεις.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ

Ι . ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΗΜΕΙΟΥ ΠΗΞΗΣ

1 . Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η διαδικασία αυτή καθορίζει τη μέθοδο αναφοράς για τον προσδιορισμό του σημείου πήξης ακατέργαστου, παστεριωμένου, UHT, επεξεργασμένου και αποστεριωμένου πλήρους γάλακτος, μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος και αποβουτυρωμένου γάλακτος, χρησιμοποιώντας ένα όργανο (κρουσκόπιο θερμίστορα) στο οποίο το θερμοστατικά ελεγχόμενο λουτρό ψύχεται με ηλεκτρικό ψύκτη και ένας διερευνητής θερμίστορα αντικαθιστά το γυάλινο θερμόμετρο υδράργυρου.

Διατίθενται δύο τύποι οργάνου . Ο πρώτος είναι ένα όργανο που ανιχνεύει το μέγιστο σημείο πήξης στην περιοχή οριζοντιοποίησης της καμπύλης ψύξης, ενώ ο δεύτερος, για εμπορικούς λόγους, έχει ρυθμιστεί να κάνει μια ανάγνωση σε ένα καθορισμένο χρόνο μετά την έναρξη της ψύξης . Καθώς οι καμπύλες σημείου ψύξης μπορεί να διαφέρουν από το ένα γάλα στο άλλο και μεταξύ γάλακτος και των τυποποιημένων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση, η εν λόγω μέθοδος αναφοράς απαιτεί τη χρήση οργάνων που αναζητούν την περιοχή οριζοντιοποίησης . Όργανα προκαθορισμένου χρόνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις ρουτίνας ανίχνευσης/διαχωρισμού .

Το σημείο πήξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η αναλογία

πρόσθετου νερού στο γάλα, εφόσον η οξύτητα του δείγματος δεν υπερβαίνει τα 0,18g γαλακτικού οξέος ανά 100 ml (βλέπε σημείο 7.4).

2 . Ορισμός

Σημείο πήξης γάλακτος : η λαμβανόμενη τιμή κατά τη μέτρηση σύμφωνα με την περιγραφόμενη διαδικασία και εκφρασμένη σε βαθμούς Κελσίου (°C).

3 . Αρχή

Μια δοκιμαστική δόση γάλακτος υπερψύχεται στην κατάλληλη θερμοκρασία, ανάλογα με το όργανο, και η κρυστάλλωση διεγείρεται με μηχανική δόνηση που προκαλεί τη γρήγορη άνοδο της θερμοκρασίας έως μια περιοχή οριζοντιοποίησης η οποία αντιστοιχεί στο σημείο πήξης του δείγματος .

Το όργανο βαθμονομείται με προσαρμογή του ώστε να δίνει τη σωστή ανάγνωση για δύο πρότυπα διαλύματα, χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία όπως και για δείγματα γάλακτος . Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η περιοχή οριζοντιοποίησης αποδίδει το σημείο πήξης του γάλακτος σε βαθμούς Κελσίου.

4 . Όργανα και γυάλινα σκεύη

Συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός και ιδιαίτερα :

4.1 . Κρυσκόπιο

Το κρυσκόπιο αποτελείται από ένα θερμοστατικά ελεγχόμενο λουτρό ψύξης, ένα διερευνητή θερμίστορα (ένα θερμόμετρο αντίστασης ημιαγωγού) με συνδεδεμένο κύκλωμα και γαλβανόμετρο ή διάταξη ανάγνωσης, ένα αναδευτήρα δείγματος και συσκευή για την εκκίνηση της πήξης μαζί με

σωλήνες υποδοχής του δείγματος .

4.1.1 . Λουτρό ψύξης

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο τύποι λουτρού ψύξης.

4.1.1.1 . Τύπος κατάδυσης

Ένα καλά μονωμένο υγρό που περιέχει κατάλληλο ψυκτικό υγρό, το οποίο αναδεύεται έτσι ώστε η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ δύο τυχόντων σημείων του υγρού να μην υπερβαίνει του 0,2 °C. Η θερμοκρασία του υγρού δεν πρέπει να κυμαίνεται περισσότερο από $\pm 0,5$ °C από την ονομαστική τιμή που δηλώνεται από τον κατασκευαστή.

Είναι σημαντικό, το υγρό στο λουτρό ψύξης να διατηρείται σε σταθερό επίπεδο. Ολόκληρη η επιφάνεια του σωλήνα υποδοχής δείγματος κάτω από τη χαραγή ένδειξης όγκου πρέπει να καλύπτεται από το ψυκτικό υγρό.

4.1.1.2 . Τύπος κυκλοφορίας

Ένα συνεχές ρεύμα κατάλληλου ψυκτικού υγρού κυκλοφορεί γύρω από το σωλήνα υποδοχής δείγματος. Η θερμοκρασία του δείγματος δεν πρέπει να κυμαίνεται περισσότερο από $\pm 0,5$ °C από την ονομαστική τιμή που δηλώνεται από τον κατασκευαστή.

Ένα κατάλληλο ψυκτικό υγρό είναι υδατικό διάλυμα 33% (v/v) 1,2 αιθανοδιόλης (αιθυλενογλυκόλης).

4.1.2 . Θερμίστορας και συνοδεύον κύκλωμα

Ο θερμίστορας πρέπει να είναι τύπου γυάλινου καθετήρα, διαμέτρου όχι μεγαλύτερης από $1,80 \pm 0,2$ mm και διαμέτρου εξοχής όχι μεγαλύτερης από 0,31 mm . Η σταθερά χρόνου του θερμίστορα πρέπει να είναι μικρότερη από δύο δευτερόλεπτα και η τιμή του β (βλέπε σημείωση) πρέπει να είναι υψηλή .

Η τιμή της τάσης εργασίας, ρεύματος και σταθεράς απόσβεσης πρέπει να είναι τέτοια ώστε η θερμοκρασία του θερμίστορα να μην αυξάνεται περισσότερο από 0,0005 °C πάνω από το άμεσο περιβάλλον του στους -0,512 °C. Η μέγιστη ανοχή επί της αντίστασης πρέπει να είναι ± 5 %.

Όταν ο καθετήρας είναι στη θέση λειτουργίας στο κρουσκόπιο, η άκρη της γυάλινης σφαίρας, πρέπει να κείται πάνω στον άξονα του σωλήνα υποδοχής δείγματος και σε ένα σημείο $44,6 \pm 0,1$ mm κάτω από την κορυφή του σωλήνα (βλέπε σχήμα στη σελίδα 128). Πρέπει να υπάρχει ένα υποστήριγμα για να βοηθά το χειριστή να θέσει τον καθετήρα στη θέση αυτή .

Σημείωση

ως β ορίζονται τα χαρακτηριστικά αντίστασης-θερμοκρασίας του θερμίστορα σύμφωνα με τη σχέση :

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

όπου :

T είναι η θερμοκρασία σε Kelvin,

R είναι η αντίσταση σε ohms σε θερμοκρασία T,

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

είναι ο συντελεστής της θερμοκρασίας,

β είναι μια σταθερά που εξαρτάται από το υλικό κατασκευής του θερμίστορα.

Στη συνήθη πρακτική συνίσταται μια τιμή που ξεπερνά το 3 000 .

4.1.3 . Διάταξη μέτρησης και ανάγνωσης

4.1.3.1 . Αρχή της μέτρησης

Το χρησιμοποιούμενο όργανο πρέπει να λειτουργεί πάνω στην αρχή της ανίχνευσης της πρώτης περιοχής οριζοντιοποίησης της καμπύλης σημείου πήξης . Η περιοχή οριζοντιοποίησης είναι το τμήμα της καμπύλης στο οποίο η θερμοκρασία παραμένει σταθερή μέσα στο όριο των $\pm 0,002$ °C επί 20 δευτερόλεπτα τουλάχιστον.

4.1.3.2 . Χειρισμός με το χέρι

Η αντίσταση του θερμίστορα πρέπει να αντισταθμιστεί με τη βοήθεια γέφυρας Wheatstone ή παρόμοιας διάταξης, χρησιμοποιώντας σταθερούς ρυθμιστές αντίστασης υψηλής ποιότητας, των οποίων η ανοχή δεν είναι μεγαλύτερη του $\pm 10\%$ και των οποίων ο συντελεστής θερμοκρασίας δεν υπερβαίνει το 2×10^{-5} °C.

Ο μεταβλητός (αντισταθμιζόμενος) ρυθμιστής αντίστασης δεν πρέπει να αποκλίνει από τη γραμμικότητα σε όλη την περιοχή εμβέλειάς του περισσότερο από 0,3 % της μέγιστης τιμής του.

Πρέπει να υπάρχει τρόπος προσαρμογής των ρυθμιστών αντίστασης με σκοπό τη βαθμονόμησή τους.

Ο δίσκος μέτρησης πρέπει να είναι βαθμολογημένος σε διαστήματα όχι μεγαλύτερα από 0,001 °C .

4.1.3.3 . Αυτόματη λειτουργία

Η διάταξη ανάγνωσης πρέπει να επιτρέπει διαχωρισμό τουλάχιστον 0,001 °C στην περιοχή από 0 έως - 1 °C όταν το όργανο λειτουργεί σωστά .

Η σταθερότητα της διάταξης μέτρησης και του αντιστοίχου κυκλώματος

πρέπει να είναι τέτοια που διαδοχικές ενδείξεις της ίδιας θερμοκρασίας να μην έχουν μεγαλύτερη διαφορά από 0,001 °C.

Η γραμμικότητα του κυκλώματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην εισάγεται σφάλμα μεγαλύτερο από $\pm 0,001^{\circ}\text{C}$ σε καμία περιοχή μεταξύ $-0,400^{\circ}\text{C}$ και $-0,600^{\circ}\text{C}$ όταν το όργανο λειτουργεί σωστά .

4.1.4 . Σύρμα ανάδευσης

Ένα σύρμα από μέταλλο αδρανές στο γάλα και με διάμετρο μεταξύ 1 και 1,5 mm χρησιμοποιείται για την ανάδευση της δοκιμαστικής δόσης.

Το σύρμα ανάδευσης πρέπει να προσαρμόζεται ως προς το πλάτος του και να τοποθετείται κάθετα με το επίπεδο του κατώτερου άκρου του ίδιο με το άκρο του καθετήρα του θερμίστορα . Επιτρέπεται μια ανοχή περίπου 1,5 mm πάνω ή κάτω από τη θέση αυτή.

Το σύρμα ανάδευσης πρέπει να δονείται επιμήκως με ένα επαρκές πλάτος δηλούμενο από τον κατασκευαστή (όχι μικρότερο από $\pm 1,5$ mm) για να εξασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία μέσα στη δοκιμαστική δόση παραμένει σταθερή. Κατά τη διάρκεια της κανονικής λειτουργίας ανάδευσης δεν πρέπει ο αναδευτήρας να προσκρούσει στον καθετήρα του θερμίστορα ή το τοίχωμα του σωλήνα.

4.1.5 . Διάταξη προς έναρξη της ψύξης

Αυτή μπορεί να είναι οποιαδήποτε διάταξη η οποία κατά τη λειτουργία της προκαλεί τη στιγμιαία ψύξη του δείγματος έτσι ώστε η θερμοκρασία της δοκιμαστικής δόσης ανέρχεται στο σημείο πήξης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό το σύρμα ανάδευσης - μία μέθοδος είναι να αυξηθεί το πλάτος δόνησης επί ένα έως δύο δευτερόλεπτα έτσι ώστε το σύρμα ανάδευσης να προσκρούσει στο τοίχωμα του σωλήνα υποδοχής δείγματος .

4.1.6 . Σωλήνες υποδοχής δείγματος

Οι σωλήνες υποδοχής δείγματος (βλέπε σχήμα στη σελίδα 128) πρέπει να είναι κατασκευασμένοι από γυαλί και να έχουν μήκος $50,8 \pm 0,1$ mm, εξωτερική διάμετρο $16,0 \pm 0,1$ mm και εσωτερική διάμετρο $13,5 \pm 0,1$ mm . Το πάχος του τοιχώματος σε όλο το μήκος του σωλήνα δεν πρέπει να μεταβάλλεται περισσότερο από 0,1 mm.

Οι σωλήνες πρέπει να φέρουν χαραγή ένδειξης όγκου 29,8 mm κάτω από το άκρο (21 mm πάνω από τη βάση του σωλήνα) προς ένδειξη, αντίστοιχα, όγκου δείγματος $2,5 \pm 0,1$ mm.

4.1.7 . Ηλεκτρική παροχή

Η τάση παροχής πρέπει να σταθεροποιείται, είτε μέσα στη συσκευή είτε εξωτερικά, έτσι ώστε η διακύμανση να μην ξεπερνά το ± 1 % της ονομαστικής τιμής όταν η κύρια παροχή κυμαίνεται κατά ± 6 %.

4.2 . Αναλυτικός ζυγός

4.3 . Ογκομετρικές φιάλες μιας χαραγής χωρητικότητας 1 000 ml, κλάσης A.

4.4 . Κλίβανος ξήρανσης, καλά εξαεριζόμενος, ικανός να διατηρεί θερμοκρασία 130 ± 1 °C

ή

Ηλεκτρικός φούρνος, καλά εξαεριζόμενος, ικανός να διατηρεί θερμοκρασίας 300 ± 25 °C.

4.5. Αποξηραντής

5. Αντιδραστήρια

5.1. Νερό απεσταγμένο σε βοροπυριτικό γυαλί, βρασθέν και ψυχθέν στους 20 ± 2 °C σε φιάλη εφοδιασμένη με σωλήνα απορρόφησης διοξειδίου του άνθρακα.

5.2. Χλωριούχο νάτριο, ποιότητας αναλυτικού αντιδραστηρίου, λεπτά λειοτριβημένο, αποξηραμένο επί πέντε ώρες στους 300 ± 25 °C σε φούρνο ηλεκτρικό (βλέπε σημείο 4.4) ή, εναλλακτικά, αποξηραμένο σε κλίβανο (βλέπε σημείο 4.4) στους 130 ± 1 °C επί 24 ώρες τουλάχιστον και ψυχθέν σε θερμοκρασία δωματίου σε κατάλληλο αποξηραντή.

5.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα (βλέπε πίνακα κατωτέρω) ξηρού χλωριούχου νατρίου (βλέπε σημείο 5.2) σε φιάλη ζύγισης. Διαλύεται σε απεσταγμένο νερό (βλέπε σημείο 5.1), μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη μίας χαραγής των 1 000 ml και αραιώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή στους 20 ± 2 °C.

Διατηρείται στους 5 °C περίπου σε καλά πωματισμένες φιάλες από πολυαιθυλένιο χωρητικότητας όχι μεγαλύτερης από 250 ml επί όχι περισσότερο από δύο μήνες.

Σημείο πήξης διαλυμάτων χλωριούχου νατρίου στους 20 °C

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

Πριν χρησιμοποιηθεί ένα πρότυπο διάλυμα, η φιάλη αναστρέφεται ελαφρά και περιστρέφεται αρκετές φορές για να αναμειχθεί καλά το περιεχόμενό της. Σε καμιά περίπτωση δεν πρέπει να αναταραχθεί τόσο ισχυρά ώστε να δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρος.

Δείγματα πρότυπων διαλυμάτων θα αφαιρούνται από τις φιάλες δια της απόχυσης από τη φιάλη του διαλύματος, σε καθαρό, ξηρό, ευρύστομο ποτήρι ζέσεως, πχ σιφώνια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ για το σκοπό αυτό.

Διαλύματα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται από φιάλες οι οποίες δεν είναι πλήρως κατά το ένα τέταρτο τους και εάν δεν συντηρούνται με μκητοκτόνο (για παράδειγμα διάλυμα thiomersal , 10gr/l) και δεν θα χρησιμοποιούνται εάν είναι παλαιότερα των δύο μηνών.

6. Βαθμονόμηση του κρουοσκοπίου θερμίστορα

Το κρουοσκόπιο πρέπει να εγκατασταθεί έτσι ώστε η θερμοκρασία του περιβάλλοντα αέρα να μην αποκλίνει περισσότερο από 1 °C από τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η βαθμονόμηση . Το κρουοσκόπιο δεν πρέπει να εκτίθεται σε ηλιακό φως ή ρεύματα και θερμοκρασία δωματίου μεγαλύτερη από 26-27 °C.

Εξασφαλίζεται ότι το κρουοσκόπιο είναι σε καλή κατάσταση λειτουργίας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ότι έχει τεθεί σε λειτουργία τουλάχιστον 12 ώρες πριν τη βαθμονόμηση . Ελέγχεται η θέση του καθετήρα, το πλάτος δόνησης του σύρματος ανάδευσης και η θερμοκρασία των ψυκτικών υγρών.

Επιλέγονται δύο πρότυπα διαλύματα (βλέπε πίνακα ανωτέρω) που περικλείουν κατά προσέγγιση την αναμενόμενη τιμή του σημείου πήξης των δειγμάτων γάλακτος προς ανάλυση . Η διαφορά μεταξύ των σημείων πήξης των δύο διαλυμάτων πρέπει, κατά προτίμηση, να μην είναι μικρότερη από -0,100 °C.

(Σε ορισμένα μοντέλα κρουσκοπίων διαθέσιμων κατά την περίοδο αυτή, το συνδεδεμένο με το θερμίστορα κύκλωμα έχει σχεδιαστεί ώστε να εξισορροπείται σε μια ειδική τιμή του σημείου πήξης εντός της περιοχής μέτρησης του οργάνου . Σε αυτές τις περιπτώσεις η χρήση ενός πρότυπου διαλύματος έχοντος αυτό το σημείο πήξης σαν ένα από τα διαλύματα βαθμονόμησης, διευκολύνει τη διαδικασία βαθμονόμησης και ο κατασκευαστής πρέπει να υποδεικνύει την τιμή αυτή).

Μεταφέρονται με σιφώνιο $2,5 \pm 0,1$ ml ενός πρότυπου μέσα σε καθαρό, στεγνό σωλήνα υποδοχής δείγματος και το κρουσκόπιο τίθεται σε λειτουργία.

Οι χρησιμοποιούμενοι σωλήνες υποδοχής δείγματος κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης πρέπει να είναι κατασκευασμένοι από τον ίδιο τύπο γυαλιού και να πλένονται και να εκπλύονται με αφαλατισμένο νερό την ίδια στιγμή με αυτούς που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων γάλακτος . Η θερμοκρασία των πρότυπων διαλυμάτων πρέπει να είναι όμοια προς αυτή των δειγμάτων γάλακτος .

Η βαθμονόμηση ελέγχεται με προσαρμογή, όπως υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή, έως ότου η ένδειξη ανάγνωσης του κρουσκοπίου είναι ίση με το σημείο πήξης του πρότυπου διαλύματος . Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με το άλλο πρότυπο διάλυμα και συνεχίζεται εναλλακτικά με τον ίδιο τρόπο, έως ότου διαδοχικές αναγνώσεις κάθε διαλύματος, χωρίς περαιτέρω προσαρμογή ελέγχου της βαθμονόμησης, δίνουν την σωστή τιμή του σημείου πήξης καθενός . Το κρουσκόπιο είναι τότε έτοιμο προς χρήση και θα δείξει κατευθείαν το σημείο πήξης του δείγματος γάλακτος, χωρίς την εφαρμογή οποιασδήποτε διόρθωσης.

7 . Προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση

7.1 . Τα δείγματα διατηρούνται, εάν χρειαστεί, σε θερμοκρασία μεταξύ 0 και 5 °C .

- 7.2 . Απομακρύνονται από το δείγμα τυχόν ξένα σώματα ή στερεό βούτυρο, εάν χρειαστεί, με διήθηση μέσα σε καθαρό, στεγνό δοχείο, και το δείγμα αναμειγνύεται ελαφρά . Ο ηθμός, εάν χρησιμοποιηθεί, πρέπει να είναι αδρανής στο γάλα και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία εργαστηρίου .
- 7.3 . Το γάλα μπορεί να αναλυθεί όταν είναι στη θερμοκρασία διατήρησης του (μεταξύ 0 και 5 °C) ή μπορεί να αφεθεί να αποκτήσει τη θερμοκρασία εργαστηρίου αμέσως πριν από την έναρξη της ανάλυσης . Ωστόσο, είναι απαραίτητο τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα γάλακτος να είναι στην ίδια θερμοκρασία όταν χρησιμοποιούνται .
- 7.4 . Η τιτλοδοτήσιμη οξύτητα του γάλακτος προσδιορίζεται, κατά το δυνατόν, ταυτόχρονα με την ανάλυση του σημείου πήξης . Δείγματα με οξύτητα υπερβαίνουσα τα 0,18 g γαλακτικού οξέος ανά 100 ml γάλακτος δεν μπορούν να εξεταστούν .
- 7.5 . Το UHT, το επεξεργασμένο και το αποστειρωμένο γάλα πρέπει να μένει επί τουλάχιστον 20 λεπτά σε ανοικτό δοχείο πριν εξεταστεί.

8 . Διαδικασία

8.1. Προκαταρκτικοί έλεγχοι

Ελέγχεται εάν το επίπεδο και η θερμοκρασία του ψυκτικού υγρού είναι σε συμφωνία με τις οδηγίες του κατασκευαστή και εάν, εφόσον χρειαστεί, ο καθετήρας του θερμίστορα είναι μέσα σε ένα άδειο σωλήνα υποδοχής δείγματος στην κοιλότητα υποδοχής δείγματος . Το κρουοσκόπιο τίθεται σε λειτουργία και εξασφαλίζεται ότι το ψυκτικό υγρό αναδεύεται ή κυκλοφορεί σωστά, όπως επιβάλλεται . Αφού το κρουοσκόπιο είναι σε λειτουργία επί τουλάχιστον 12 ώρες, ελέγχεται η θερμοκρασία του ψυκτικού υγρού και η θέση και το πλάτος ανάδευσης του σύρματος ανάδευσης.

8.2 . Έλεγχος βαθμονόμησης ρουτίνας

Πριν από κάθε κύκλο ελέγχου, μετράται το σημείο πήξης πρότυπου διαλύματος χλωριούχου νατρίου (π.χ . διάλυμα με σημείο πήξης $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$) έως ότου δύο διαδοχικοί προσδιορισμοί δεν διαφέρουν κατά περισσότερο από $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$. Εάν ο μέσος όρος των τιμών αυτών διαφέρει από το σημείο πήξης του πρότυπου διαλύματος περισσότερο από $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$, το κρουσκόπιο βαθμονομείται ξανά όπως περιγράφηκε στο σημείο 6.

Εάν το κρουσκόπιο χρησιμοποιείται συνεχώς, ο έλεγχος βαθμονόμησης ρουτίνας εκτελείται τουλάχιστον μία φορά ανά ώρα . Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδηγίες του κατασκευαστή .

8.3 . Προσδιορισμός του σημείου πήξης του γάλακτος

Η φιάλη με το δείγμα του γάλακτος αναστρέφεται ελαφρά και περιστρέφεται αρκετές φορές για να αναμειχθούν τα περιεχόμενά της . Σε καμία στιγμή δεν πρέπει ένα δείγμα να αναταραχθεί τόσο ζωηρά που να εγκλωβιστεί αέρας.

Μεταφέρονται με σιφώνιο $2,5 \pm 0,1$ ml του γάλακτος μέσα σε καθαρό, στεγνό σωλήνα υποδοχής δείγματος και απομακρύνεται τυχόν πλεόνασμα με σιφώνιο. Εξασφαλίζεται ότι ο καθετήρας και το σύρμα ανάδευσης είναι καθαρά και στεγνά, σκουπίζοντάς τα, εάν χρειαστεί, με ένα μαλακό, καθαρό, χωρίς χνούδι ύφασμα από κάτω προς τα πάνω.

Ο σωλήνας υποδοχής δείγματος εισάγεται στο βαθμονομημένο κρουσκόπιο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή . Το γάλα θα ψυχθεί και η πήξη θα αρχίσει σε μια θερμοκρασία που καθορίζεται από τον κατασκευαστή με προσέγγιση $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(Σε ορισμένα αυτόματα όργανα η θερμοκρασία αυτή μπορεί να παρατηρηθεί σε ψηφιακή διάταξη ανάγνωσης - σε χειροκίνητα όργανα η απαραίτητη

ακρίβεια επιτυγχάνεται εξασφαλίζοντας ότι η πήξη αρχίζει όταν ο δείκτης ή η χορδή του γαλβανόμετρου συμπέσει με την κατάλληλη ένδειξη).

Εάν, για οποιοδήποτε λόγο, η πήξη αρχίσει πριν ή μετά την καθορισμένη περιοχή θερμοκρασίας, η δοκιμή εγκαταλείπεται και επαναλαμβάνεται με άλλη δοκιμαστική δόση του γάλακτος. Εάν και το επαναληπτικό δείγμα πήξει πριν την καθορισμένη θερμοκρασία, μια περαιτέρω δόση του δείγματος πρέπει να θερμανθεί στους 45 °C και να διατηρηθεί επί πέντε λεπτά για να μπορέσει να λιώσει το κρυσταλλικό λίπος.

Μετά ψύχεται ξανά στη θερμοκρασία ανάλυσης και αναλύεται αμέσως. Η θερμοκρασία του γάλακτος μετά την έναρξη της πήξης θα ανέβει γρήγορα σε μια τιμή η οποία θα παραμείνει ουσιαστικά σταθερή επί κάποιο χρονικό διάστημα πριν πέσει και πάλι. Το σημείο πήξης αντιστοιχεί στην υψηλότερη θερμοκρασία που αποκτήθηκε κατά την περίοδο αυτή, και αυτή η τιμή πρέπει να καταγραφεί.

Σημείωση

Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η θερμοκρασία παραμένει σταθερή και το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της πήξης και της επίτευξης της υψηλότερης θερμοκρασίας θα διαφέρει από δείγμα σε δείγμα και θα είναι σημαντικά μικρότερο για το νερό και τα πρότυπα διαλύματα χλωριούχου νατρίου από ότι για το γάλα. Είναι απαραίτητο, η υψηλότερη θερμοκρασία να είναι αυτή η οποία καταγράφεται.

Όταν η μέτρηση έχει ολοκληρωθεί ικανοποιητικά, ο σωλήνας αποσύρεται, εκπλύεται με νερό και ο καθετήρας του θερμίστορα και ο αναδευτήρας στεγνώνονται με μαλακό, καθαρό, χωρίς χνούδι ύφασμα από κάτω προς τα πάνω και εκτελείται πανομοιότυπος προσδιορισμός σε άλλη δόση του δείγματος γάλακτος.

Εάν η διαφορά των σημείων πήξης που αποκτήθηκαν είναι μεγαλύτερη από την τιμή επαναληψιμότητας (0,004 °C), εκτελείται πανομοιότυπος

προσδιορισμός σε άλλη δόση του δείγματος . Εφόσον οι δύο προσδιορισμοί συμφωνούν μέσα σε όρια των 0,004 °C, οι τιμές πρέπει να καταγραφούν και να χρησιμοποιηθούν στον υπολογισμό του τελικού αποτελέσματος.

8.4 . Ψύξη του καθετήρα

Μετά τη χρήση του οργάνου, χρησιμοποιείται ένας άδειος σωλήνας υποδοχής δείγματος στην κοιλότητα υποδοχής δείγματος και η κεφαλή λειτουργίας χαμηλώνεται για να διατηρηθεί ψυχρός ο καθετήρας.

(Σε ορισμένα μοντέλα κρυσκόπιου αυτό μπορεί να μην είναι δυνατόν - σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να εξασφαλιστεί ότι ο καθετήρας έχει ψυχθεί επαρκώς πριν ληφθούν μετρήσεις, για παράδειγμα, με εκτέλεση αρκετών πλασματικών προσδιορισμών έως ότου αποκτηθούν σταθερές τιμές ανάγνωσης).

9 . Έκφραση αποτελεσμάτων

9.1 . Υπολογισμός

Εάν, ακολουθώντας τον έλεγχο βαθμονόμησης ρουτίνας, επιβεβαιωθεί η βαθμονόμηση, υπολογίζεται ο μέσος όρος των αποδεκτών επαναληπτικών τιμών σημείου πήξης που παρελήφθησαν, στρογγυλεύοντας στην τρίτη δεκαδική θέση.

Εάν το άθροισμα δύο αποδεκτών επαναληπτικών τιμών είναι περιττός αριθμός, ο μέσος όρος πρέπει να στρογγυλοποιηθεί στην πλησιέστερη άρτια τιμή όπως δείχνει το ακόλουθο παράδειγμα:

Σημείο πήξης (°C)

Επαναληπτικές τιμές	Μέσος όρος
- 0,544 - 0,545	- 0,544
- 0,545 - 0,546	- 0,546

9.2. Ακρίβεια

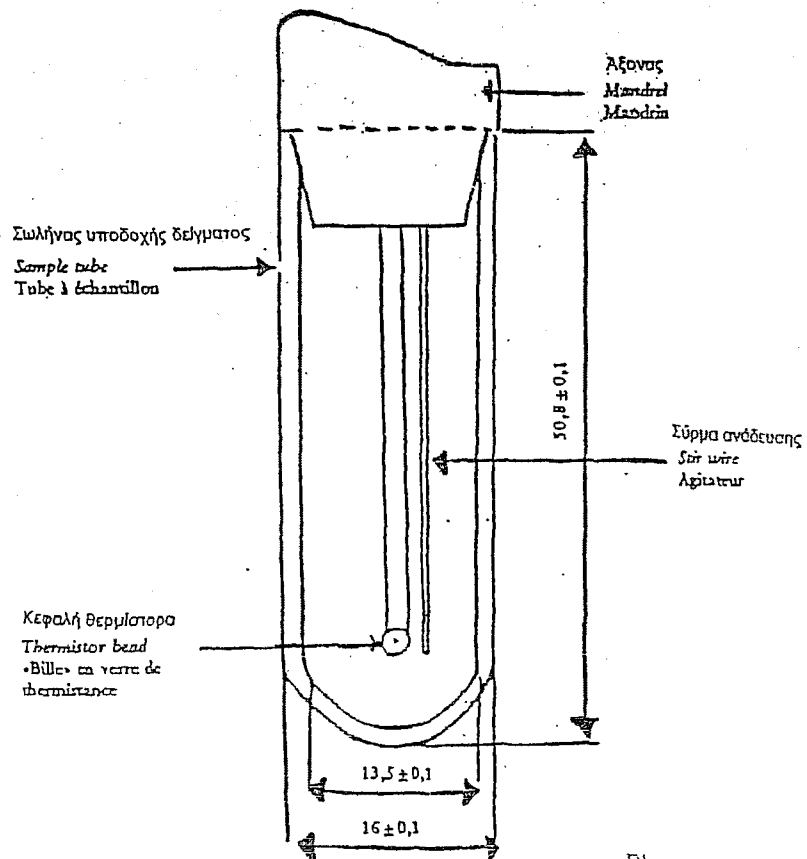
9.2.1 Επαναληψιμότητα (r): 0,004 °C.

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

ΣΧΗΜΑ 1

Λεπτομέρεια κρυόσκοπιου θερμίστορα (θέση του σωλήνα υποδοχής δείγματος σε σχέση με το θερμίστορα και το σύρμα ανάδευσης).

Detail of Thermistor Cryoscope 4.1 (position of sample tube in relation to thermistor bead and stir wire).



Όλες οι διαστάσεις σε mm
All dimensions in mm
Toutes dimensions en mm

II . ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ

1 . Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς προσδιορισμού της ενεργότητας φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα.

2 . Ορισμός

2.1. Η ενεργότητα φωσφατάσης είναι ένα μέτρο της ποσότητας της ενεργού αλκαλικής φωσφατάσης στο προϊόν, εκφρασμένη ως η ποσότητα φαινόλης, σε μg ανά ml , που αποδεσμεύεται κάτω από τις μνημονευόμενες στη διαδικασία συνθήκες του παστεριωμένου γάλακτος.

2.2. Κάθε γάλα του οποίου η ενεργότητα φωσφατάσης είναι κάτω από $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ φαινόλης θεωρείται αρνητικό σε αντίδραση φωσφατάσης .

3 . Αρχή

Η ενεργότητα φωσφατάσης αξιολογείται από την ποσότητα φαινόλης που αποδεσμεύεται από το φαινυλοφωσφορικό δινάτριο που προστίθεται στο δείγμα . Η αποδεσμευμένη φαινόλη αντιδρά με διβρωμοκινονοχλωροϊμίδιο παράγοντας διβρωμοϊνδοφαινόλη (υποκύνου χρώματος) η οποία μετράται χρωμομετρικά στα 610 nm . Γίνεται σύγκριση με δείγμα στο οποίο το ένζυμο της φωσφατάσης έχει καταστραφεί.

4 . Αντιδραστήρια

4.1 . Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού βάρου και υδροξειδίου του βάρου

4.1.1. Διαλύονται 50,0 g υδροξειδίου βάριου $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 1 000 ml.

4.1.2. Διαλύονται 22,0 g βορικού οξέος (H_3BO_3) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 1 000 ml.

4.1.3. Θερμαίνονται 500 ml κάθε διαλύματος στους 50 °C, τα διαλύματα αναμειγνύονται, αναδεύονται, ψύχονται γρήγορα στους 20 °C, το pH διορθώνεται, εάν χρειαστεί, στα $10,6 \pm 0,1$ με προσθήκη διαλύματος 4.1.1 ή 4.1.2. Διήθηση. Το διάλυμα διατηρείται σε στεγανά πωματισμένο δοχείο.

4.1.4. Το διάλυμα αραιώνεται πριν τη χρήση με ίσο όγκο νερού.

4.2. Ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος

Διαλύονται 6,0 g μεταβορικού νατρίου (NaBO_2) ή 12,6 g ($\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και 20,0 g χλωριούχου νατρίου (NaCl) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 1 000 ml.

4.3. Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης χρώματος

Αραιώνονται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανάπτυξης χρώματος (4.2) στα 100 ml με νερό.

4.4. Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος

Διαλύονται 0,1 g άνυδρου φαινυλοφωσφορικού δινάτριου απηλλαγμένου φαινόλης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος (4.1.3) ή διαλύονται 0,5 ml φαινυλοφωσφορικού δινάτριου σε 4,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανάπτυξης χρώματος (4.2), προστίθενται δύο σταγόνες διαλύματος BQC (4.6) και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 λεπτά. Το χρώμα που σχηματίζεται έτσι εκχυλίζεται με 2,5 ml βουταν-1-όλης και αφήνεται έως η βουταν-1-όλη

διαχωριστεί. Η βουταν-1-όλη αφαιρείται και απορρίπτεται. Εάν χρειαστεί, η εκχύλιση επαναλαμβάνεται .

Το διάλυμα μπορεί να φυλαχθεί σε ψυγείο επί μερικές μέρες - το χρώμα αναπτύσσεται και επανεκχυλίζεται πριν από τη χρήση. Το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος παρασκευάζεται πριν από τη χρήση με αραιώση 1 ml του διαλύματος αυτού στα 100 ml, με το ρυθμιστικό διάλυμα βορικού βαρίου, υδροξειδίου βαρίου (4.1.3).

4.5. Διάλυμα καταβύθισης ψευδαργύρου-χαλκού

Διαλύονται 3,0 g θειικού ψευδαργύρου ($ZnSO_4, 7H_2O$) και 0,6 g θειικού χαλκού (II) ($CuSO_4, 5H_2O$) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως στα 100 ml.

4.6. Διάλυμα 2,6-διβρωμοκινονοχλωριμίδιου (διάλυμα BQC)

Διαλύονται 40 ± 1 mg 2,6-διβρωμοκινονοχλωριμίδιου (BQC) ($C_6H_2Br_2ClNO_6$) σε 10 ml αιθανόλης 96% (v/v).

Διατηρείται σε φιάλη σκούρου χρώματος σε ψυγείο. Εάν είναι αποχρωματισμένο ή παλιότερο από ένα μήνα απορρίπτεται .

4.7. Διάλυμα θειικού χαλκού (II)

Διαλύονται 0,05 g θειικού χαλκού (II) ($CuSO_4, 5H_2O$) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 100 ml.

4.7. Πρότυπα διαλύματα φαινόλης

4.8.1. Ζυγίζονται 200 ± 2 mg καθαρής άνυδρης φαινόλης, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, προστίθεται νερό, αναμειγνύεται και ο όγκος

συμπληρώνεται έως τη χαραγή. Αυτό το μητρικό διάλυμα παραμένει σταθερό επί αρκετούς μήνες στο ψυγείο.

4.8.2 Αραιώνονται 10 ml του μητρικού διαλύματος στα 100 ml με νερό και αναμειγνύονται. 1 ml περιέχει 200 mg φαινόλης.

5. Όργανα και γυάλινα σκεύη

Σημειώσεις:

- (α) όλα τα γυάλινα σκεύη, τα πώματα και τα εργαλεία δειγματοληψίας πρέπει να είναι προσεκτικά καθαρισμένα. Συνιστάται να εκπλυθούν με πρόσφατα βρασμένο απεσταγμένο νερό ή να ατμιστούν –
- (β) ορισμένοι τύποι πλαστικών πωμάτων μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση με φαινολικές ουσίες και η χρήση τους δεν πρέπει να επιτρέπεται.

Συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και ιδιαίτερα:

- 5.1. Αναλυτικός ζυγός
- 5.2. Υδρόλουτρο, ικανό να διατηρείται στους 37 ± 1 °C .
- 5.3. Φασματοφωτόμετρο κατάλληλο για αναγνώσεις σε μήκος κύματος 610 nm .
- 5.4. Δοκιμαστικοί σωλήνες, 16 ή 18 mm x 150 mm, κατά προτίμηση βαθμολογημένοι στα 5 και 10 ml .
- 5.5. Σιφώνια
- 5.6. Γυάλινα χωνιά, κατάλληλου μεγέθους, για παράδειγμα διαμέτρου 5 cm.
- 5.7. Πτυχωτοί ηθμοί διαμέτρου τουλάχιστον 9 cm για μέση ταχύτητα διήθησης.

5.8. Ογκομετρικές φιάλες για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.

6. Διαδικασία

Σημειώσεις:

- (α) αποφεύγεται η επίδραση απευθείας ηλιακού φωτός κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού –
- (β) μόλυνση με ίχνη σάλιου ή αναπνοής μπορεί να δώσει εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα και πρέπει να αποφεύγεται. Από την άποψη αυτή, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στη διαδικασία σιφωνισμού.

6.1. Προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση

6.1.1. Η ανάλυση πραγματοποιείται αμέσως μετά τη δειγματοληψία . Διαφορετικά, το δείγμα φυλλάσσεται σε ψυγείο, αλλά όχι για περισσότερο από δύο ημέρες.

6.2. Δοκιμαστική δόση

Μεταφέρεται με σιφώνιο μέσα σε καθένα από δύο δοκιμαστικούς σωλήνες (5.4) 1 ml του δείγματος προς ανάλυση, χρησιμοποιώντας ένα σωλήνα ως έναν έλεγχο ή μάρτυρα (τυφλό).

6.3. Προσδιορισμός

6.3.1. Ο μάρτυρας θερμαίνεται επί δύο λεπτά σε ζέον νερό - ο δοκιμαστικός σωλήνας και το ποτήρι ζέσης νερού καλύπτονται με φύλλο αλουμίνιου για να εξασφαλιστεί η θέρμανση ολόκληρου του σωλήνα. Ψύχεται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου.

6.3.2. Ο μάρτυρας και το δείγμα προς ανάλυση επεξεργάζονται με τον ίδιο τρόπο κατά το υπόλοιπο μέρος της διαδικασίας. Προστίθενται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (4.4) και αναμειγνύονται.

- 6.3.3. Τα δείγματα επωάζονται αμέσως στο υδρόλουτρο (5.2) επί 60 λεπτά, αναμειγνύοντας κατά διαστήματα τα περιεχόμενα (τουλάχιστον τέσσερις φορές).
- 6.3.4. Θερμαίνονται σε ζέον νερό επί δυό λεπτά με τον ίδιο τρόπο όπως στο σημείο 6.3.1. Ψύχονται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου .
- 6.3.5. Προστίθεται 1 ml διαλύματος καταβύθισης ψευδαργύρου-χαλκού (4.5) σε κάθε σωλήνα και αναμειγνύεται πλήρως.
- 6.3.6. Γίνεται διήθηση μέσα από στεγνό διηθητικό χάρτη, απορρίπτονται τα πρώτα 2 ml, ξαναγίνεται διήθηση, εάν χρειαστεί, έως ότου το διήθημα γίνει τελείως διαυγές και συλλέγονται 5 ml σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- 6.3.7. Προστίθενται 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ανάπτυξης χρώματος (4.2).
- 6.3.8. Προστίθενται 0,1 ml διαλύματος BQC (4.6), αναμειγνύονται, και το χρώμα αφήνεται να αναπτυχθεί επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου .
- 6.3.9. Μετράται η απορρόφηση σε σχέση με τον έλεγχο ή μάρτυρα στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 610 nm (5.3).
- 6.3.10. Ο προσδιορισμός επαναλαμβάνεται με κατάλληλη αραιώση του δείγματος εάν η απορρόφηση, όπως μετρήθηκε στο σημείο 6.3.9 υπερβαίνει την απορρόφηση του πρότυπου που περιέχει 20 µg φαινόλης ανά σωλήνα, όπως μετρήθηκε στο σημείο 6.4.4 . Η αραιώση αυτή παρασκευάζεται με ανάμειξη ενός όγκου του δείγματος προς ανάλυση με κατάλληλο όγκο μέρους του ίδιου δείγματος θερμανθέντος προσεκτικά μέχρι βρασμού ώστε να αδρανοποιηθεί η περιεχόμενη φωσφατάση .
- 6.4. Κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης
- 6.4.1. Παρασκευάζεται κατάλληλη σειρά αραιωμένων πρότυπων, αρχίζοντας από το πρότυπο φαινόλης (4.8.2), που περιέχουν 0 (έλεγχος ή μάρτυρας), 2, 5, 10 και

20 µg φαινόλης ανά χιλιοστόλιτρο . Μεταφέρονται με σιφώνιο αντίστοιχα 1 ml νερού και 1 ml από τα τέσσερα πρότυπα διαλύματα φαινόλης σε κάθε ένα από πέντε δοκιμαστικούς σωλήνες.

6.4.2. Προστίθεται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 1 ml διαλύματος θειικού χαλκού (II) (4.7), 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης χρώματος (4.3), 3 ml νερού και 0,1 ml διαλύματος BQC (4.6)- αναμειγνύονται.

6.4.3. Το χρώμα αφήνεται να αναπτυχθεί επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6.4.4. Μετράται η απορρόφηση σε σχέση με τον έλεγχο ή μάρτυρα σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 610 nm (5.3).

6.4.5. Από τις τιμές απορρόφησης (6.4.4) που ελήφθησαν για κάθε ποσότητα φαινόλης που προστέθηκε (6.4.1), υπολογίζεται η γραμμή παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελάχιστων τετράγωνων.

7. Έκφραση αποτελεσμάτων

7.1. Υπολογισμός και σχέση

7.1.1. Από την ανάγνωση της απορρόφησης (6.3.9) υπολογίζεται η ποσότητα της φαινόλης χρησιμοποιώντας τη γραμμή παλινδρόμησης που ελήφθη (6.4.5).

7.1.2. Υπολογίζεται η ενεργότητα φωσφατάσης, εκφρασμένη σε µg φαινόλης ανά χιλιοστόλιτρο του παστεριωμένου γάλακτος από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Ενεργότητα φωσφατάσης} = 2,4 \times A \times D$$

όπου :

A είναι η ποσότητα της φαινόλης σε µg σύμφωνα με το σημείο 7.1.1,

D είναι ο συντελεστής αραίωσης της αραίωσης σύμφωνα με το σημείο 6.3.10 .
(στην περίπτωση μη αραίωσης, D = 1),

συντελεστής 2,4 είναι ο συντελεστής αραίωσης (5/12 1 ml δείγματος προς ανάλυση) - Βλέπε σημείο 6.2 σε συνδυασμό με τα σημεία 6.3.2, 6.3.5 και 6.3.6.

7.2 Ακρίβεια

7.2.1. Επαναληψιμότητα (r): 2 µg φαινόλης/ml.

7.2.2. Αναπαραγωγιμότητα (R): 3 µg φαινόλης/ml (προκαταρκτικά).

7.2.3. Εάν χρησιμοποιηθεί μια αραίωση σύμφωνα με το σημείο 6.3.10 το όριο που μνημονεύεται στα σημεία 7.2.1 και 7.2.2 αναφέρεται στα αποτελέσματα που προέκυψαν από το αραιωμένο δείγμα .

III. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς προσδιορισμού της παρουσίας ή απουσίας ενζύμου υπεροξειδάσης σε γάλα σαν ένα έλεγχο της παστερίωσης.

2. Ορισμός

Θετική αντίδραση υπεροξειδάσης:

Εάν το γάλα έχει παστεριωθεί σωστά, ένα κυανό χρώμα θα προκύψει μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από την ανάμειξη.

Αρνητική αντίδραση υπεροξειδάσης:

Κανένα χρώμα δεν θα προκύψει μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από την ανάμειξη.

3. Αρχή

Το ένζυμο της υπεροξειδάσης διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου . Το αποδεσμευόμενο ατομικό οξυγόνο οξειδώνει την άχρωμη 1,4-φαινυλενοδιαμίνη προς την πορφυρή ινδοφαινόλη (δοκιμή Storch). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ένζυμου.

4. Αντιδραστήρια

4.1. Διάλυμα 1,4-φαινυλενοδιαμίνης

Διαλύονται 2 g 1,4-φαινυλενοδιαμίνης ($C_6H_8N_2$) σε θερμό ($50^{\circ}C$) νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 100 ml . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη με γυάλινο πώμα και διατηρείται σε ψυχρό και σκοτεινό μέρος . Μετά την παρασκευή του, ένα διάλυμα 1,4-φαινυλενοδιαμίνης σχηματίζει ένα ίζημα μέσα σε μία ή δύο ημέρες: αυτό πρέπει μετά να απορριφθεί.

4.2 . Διάλυμα υπεροξειδίου υδρογόνου

Αραιώνονται 9 ml υπεροξειδίου υδρογόνου 30 % σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 100 ml. Για σταθεροποίηση, προστίθεται 1 ml πυκνού θειικού οξέος ανά λίτρο διαλύματος.

Το διάλυμα υπεροξειδίου υδρογόνου είναι σταθερό επί ένα μήνα, εάν φυλαχθεί σε ψυχρό, σκοτεινό μέρος και σε φιάλη με γυάλινο πώμα, αποκλείοντας κάθε επαφή με οργανικές ενώσεις.

5. Διαδικασία

5.1. Εισάγονται 5 ml του δείγματος γάλακτος μέσα σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα με κατάλληλο κλείσιμο.

5.2. Προστίθενται 5 ml διαλύματος 1,4-φαινυλενοδιαμίνης (4 .1).

- 6.4. Προστίθενται δύο σταγόνες διαλύματος υπεροξειδίου υδρογόνου (4.2).
- 5.4. Παρατηρείται η παραγωγή χρώματος μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από την ανάμειξη. Εάν το κυανό χρώμα προκύψει αργότερα από 30 δευτερόλεπτα από την προσθήκη των αντιδραστήριων, η αντίδραση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί.

IV . ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ - ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΡΥΒΛΙΟΥ ΣΤΟΥΣ 30 °C

1 . Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή καθορίζει την διαδικασία αναφοράς καταμέτρησης μικροοργανισμών με τη βοήθεια μίας τεχνικής καταμέτρησης αποικίας στους 30 °C . Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη σε ακατέργαστο γάλα και παστεριωμένο γάλα και σε γάλα UHT επεξεργασμένο και αποστειρωμένο προεπιωασμένο στους 30 °C επί 15 ημέρες.

2 . Ορισμός

Ο όρος "μικροοργανισμοί" σημαίνει: οργανισμοί σχηματίζοντες καταμετρήσιμες αποικίες όταν επωασθούν αεροβίως κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες.

3. Αρχή

Ένας καθορισμένος όγκος του δείγματος γάλακτος αναμειγνύεται με το υπόστρωμα της καλλιέργειας σε τρυβλία Petri και επωάζεται στους 30 °C επί 72 ώρες. Οι αποικίες καταμετρώνται και υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά ml ακατέργαστου ή παστεριωμένου γάλακτος ή ανά 0,1 ml προεπιωασμένου UHT επεξεργασμένου ή αποστειρωμένου γάλακτος .

4 . Όργανα και γυάλινα σκεύη

Συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και ιδιαίτερα:

4.1. Όργανα

4.1.1. Κλίβανος θερμού αέρα, ικανός να λειτουργεί στους 170 έως 175 °C.

4.1.2. Αυτόκλειστο, ικανό να λειτουργεί στους 121 ± 1 °C.

4.1.3. Επωαστής, ικανός να διατηρεί θερμοκρασία 30 ± 1 °C σε όλα τα σημεία του εσωτερικού του.

4.1.4. pHμετρο, με δυνατότητα εξίσωσης θερμοκρασίας, ακρίβειας $\pm 0,1$ μονάδας pH

4.1.5. Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 45 ± 1 °C.

4.1.6. Φακός, μεγεθυντική ικανότητα 2-4 x.

4.1.7. Φακός, μεγεθυντική ικανότητα 8-10 x.

4.1.8. Καταμετρητής

4.1.9. Αναμεικτήρας, ικανός να αναμειγνύει 1 ml του δείγματος γάλακτος ή δεκαδική αραιώση με 9 ml διαλύτη και λειτουργώντας πάνω στην αρχή της εκκέντρου περιστροφής των περιεχόμενων του δοκιμαστικού σωλήνα .

4.2 . Γυάλινα σκεύη

4.2.1. Δοκιμαστικοί σωλήνες, με κατάλληλες διατάξεις κλεισίματος και επαρκή χωρητικότητα για να περιέχουν, με επαρκή κενό χώρο για ανάδευση, 10 ml της αρχικής αραιώσης ή περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις .

- 4.2.2. Φιάλες χωρητικότητας 150 έως 250 ml ή σωλήνες, χωρητικότητας περίπου 20 ml, για να φέρουν το υπόστρωμα καλλιέργειας .
- 4.2.3. Σιφώνια (πωματισμένα με ακατέργαστο βαμβάκι) από γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με ακέραια άκρα, ονομαστικής χωρητικότητας 1 ml και έχοντας απόληξη διαμέτρου 1,75 έως 3 mm .
- 4.2.4. Τρυβλία Petri, από διαυγές άχρωμο γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με το από κάτω τρυβλίο (πυθμένα) να έχει εσωτερική διάμετρο περίπου 90 έως 100 mm. Το εσωτερικό βάθος πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 mm . Ο πυθμένας δεν πρέπει να έχει ανωμαλίες που να παρεμποδίζουν την καταμέτρηση των αποικιών .
- 4.2.5. Αποστείρωση των γυάλινων σκευών

Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να αποστειρώνονται με μια από τις ακόλουθες μεθόδους :

- (α) με διατήρηση στους 170 έως 175 °C επί όχι λιγότερο από μία ώρα μέσα σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1)-
- (β) με διατήρηση στους 121 ±1 °C επί όχι λιγότερο από 20 λεπτά μέσα σε αυτόκλειστο (4.1.2).

Πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής διείδυση ατμού στο αυτόκλειστο: εάν ο εξοπλισμός αποστειρώνεται σε δοχεία, αυτά δεν πρέπει να κλείνονται στεγανά, οι φιάλες πρέπει να έχουν χαλαρά τοποθετημένα πώματα.

Τα γυάλινα σκεύη που αποστειρώθηκαν μέσα στο αυτόκλειστο πρέπει να στεγνώνονται με απάντληση του ατμού.

Τα σιφώνια πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1).

5. Υπόστρωμα καλλιέργειας - Άγαρ για καταμέτρηση τρυβλίου με γάλα

5.1. Σύσταση

Εκχύλισμα μαγιάς	2,5 g
Τρυπτόνη	5,0 g
D (+) γλυκόζη ή δεξτρόζη	1,0 g
Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη	1,0 g
Άγαρ	10 έως 15 g, ανάλογα με τις πηκτικές ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου άγαρ
Νερό	1 000 ml

Το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη πρέπει να είναι απηλλαγμένο από αναστολείς. Αυτό πρέπει να ελεγχθεί με συγκριτικές δοκιμές χρησιμοποιώντας αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη που είναι με βεβαιότητα απηλλαγμένο από αναστολείς.

Παρασκευή:

Τα συστατικά διασπείρονται σε αιώρημα και διαλύονται με την ακόλουθη σειρά: εκχύλισμα μαγιάς, τρυπτόνη, γλυκόζη και τελικά, αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, μέσα σε νερό. Η θέρμανση του αιωρήματος θα βοηθήσει τη διαδικασία αυτή. Προστίθεται το άγαρ και θερμαίνεται μέχρι βρασμού, αναδεύοντας συνεχώς έως ότου το άγαρ διαλυθεί εντελώς ή αμιζεται επί 30 λεπτά περίπου.

Εάν χρειαστεί, γίνεται διήθηση μέσα από διηθητικό χάρτη.

Το pH ελέγχεται με pH μέτρο (4.1.4) και, εάν χρειαστεί, το pH προσαρμόζεται έτσι ώστε, μετά την αποστείρωση, να είναι $6,9 \pm 0,1$ στους 25 °C χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον 0,1 mol/l) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος.

5.2. Κατανομή, αποστείρωση και διατήρηση του υποστρώματος καλλιέργειας

Το υπόστρωμα (5.1) μοιράζεται σε ποσότητες των 100 έως 150 ml μέσα σε φιάλες ή 12 έως 15 ml μέσα σε σωλήνες (4.2.2). Οι φιάλες και οι σωλήνες πωματίζονται.

Αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο (4.1.2) στους 121 ± 1 °C επί 15 λεπτά.

Ελέγχεται το pH του υποστρώματος.

Εάν το υπόστρωμα δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία μεταξύ 1 και 5 °C επί όχι περισσότερο από ένα μήνα από την παρασκευή.

5.3. Άνυδρο υπόστρωμα καλλιέργειας του εμπορίου

Το υπόστρωμα καλλιέργειας (5.1) μπορεί να παρασκευαστεί από άνυδρο υπόστρωμα του εμπορίου. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή, αλλά το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη προστίθεται πριν διαλυθεί αν δεν αποτελεί συστατικό.

Το pH προσαρμόζεται στο $6,9 \pm 0,1$ στους 25 °C όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.1 και το υπόστρωμα κατανέμεται, αποστειρώνεται και φυλάσσεται όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.2 .

6. Διαλύτες

6.1. Διάλυμα πεπτόνης/φυσιολογικού ορού

Σύσταση

Πεπτόνη	1,0 g
Χλωριούχο νάτριο	8,5 g
Νερό	1 000 ml

Παρασκευή

Τα συστατικά διαλύονται στο νερό, αν χρειαστεί θερμαίνοντας.

Το pH ελέγχεται με ένα pHμετρο (4.1.4) εάν χρειαστεί, το pH διορθώνεται έτσι ώστε, μετά την αποστείρωση, να είναι $7,0 \pm 0,1$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον $0,1\text{ mol/l}$) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος.

6.2. Κατανομή, αποστείρωση και φύλαξη του αραιωτικού

Το αραιωτικό (6.1) κατανέμεται μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (4.2.1) σε τέτοιες ποσότητες ώστε μετά την αποστείρωση κάθε σωλήνας να περιέχει $9,0 \pm 0,2\text{ ml}$ αραιωτικού. Οι σωλήνες πωματίζονται.

Αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο (4.1.2) στους $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ επί 15 λεπτά.

Ελέγχεται το pH του αραιωτικού.

Εάν το αραιωτικό δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία μεταξύ 1 και $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ επί όχι περισσότερο από έναν μήνα από την παρασκευή.

6.3. Άνυδρα αραιωτικά του εμπορίου

Το αραιωτικό (6.1) μπορεί να παρασκευαστεί από αφυδατωμένα δισκία ή σκόνες του εμπορίου. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Το pH διορθώνεται όπως περιγράφηκε στο σημείο 6.1 και τα αραιωτικά κατανέμονται, αποστειρώνονται και φυλάσσονται όπως περιγράφηκε στο σημείο 6.2.

7. Διαδικασία

7.1. Τήξη του υποστρώματος

Πριν αρχίσει η μικροβιολογική εξέταση, η απαιτούμενη ποσότητα υποστρώματος λιώνεται γρήγορα και το υπόστρωμα παραμένει υγροποιημένο στους 45 ± 1 °C σε υδρόλουτρο (4.1.5).

7.2. Προετοιμασία του δείγματος γάλακτος

Το δείγμα του γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να κατανεμηθούν κατά το δυνατόν ομοιόμορφα, αναστρέφοντας γρήγορα το δοχείο με το δείγμα γάλακτος 25 φορές . Πρέπει να αποφεύγεται ο αφρισμός ή να αφήνεται ο αφρός να διαλυθεί. Το χρονικό διάστημα μεταξύ ανάμειξης και ανάληψης της δοκιμαστικής δόσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα τρία λεπτά.

7.3. Προετοιμασία της αρχικής αραιώσης (10^{-1}) (ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα)

Μεταφέρεται με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3) 1 ml του δείγματος (7.2) ακατέργαστου γάλακτος ή παστεριωμένου γάλακτος μέσα σε 9 ml αραιωτικού (6.1) αποφεύγοντας την επαφή μεταξύ του σιφωνίου και του αραιωτικού. Η θερμοκρασία του αραιωτικού πρέπει να είναι περίπου η ίδια με αυτήν του δείγματος γάλακτος. Η αρχική αυτή αραιώση αναμειγνύεται προσεκτικά στον αναμικτήρα (4.1.9) επί 5 έως 10 δευτερόλεπτα.

Έτσι αποκτάται μία αρχική αραιώση 10^{-1}

7.4. Παρασκευή περαιτέρω δεκαδικών αραιώσεων (ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα)

Μεταφέρεται με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3) 1 ml της αρχικής αραιώσης (7.3) μέσα σε 9 ml αραιωτικού (6.1) ακολουθώντας τις οδηγίες που δόθηκαν στο σημείο 7.3.

Έτσι αποκτάται η αραιώση 10^{-2} .

Οι διαδικασίες αυτές επαναλαμβάνονται για να αποκτηθούν περαιτέρω

δεκαδικές αραιώσεις έως ότου υπολογιστεί ότι αποκτήθηκε ο κατάλληλος αριθμός μικροοργανισμών (8.1.1).

7.5. Εμβολιασμός τρυβλίων Petri

7.5.1. Ακατέργαστο γάλα : μεταφέρεται με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3) 1 ml του δείγματος ή/και της κατάλληλης δεκαδικής αραιώσης μέσα σε τρυβλίο (4.2.4). Πρέπει να εξετάζονται δύο αραιώσεις τουλάχιστον. Προετοιμάζεται ένα τρυβλίο από κάθε αραιώση κατάλληλα επιλεγμένη (8.1.1).

7.5.2. Παστεριωμένο γάλα : μεταφέρεται με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3) 1 ml του δείγματος ή/και της κατάλληλης δεκαδικής αραιώσης μέσα σε τρυβλίο (4.2.4). Πρέπει να εξετάζονται δύο αραιώσεις τουλάχιστον. Προετοιμάζονται δύο τρυβλία από κάθε αραιώση κατάλληλα επιλεγμένη (8.1.1).

7.5.3. Γάλα UHT - επεξεργασμένο και αποστειρωμένο. (εξετάζεται μετά από επώαση 15 ημερών στους 30°C). Μεταφέρεται με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3) 0,1 ml του δείγματος του γάλακτος (7.2) μέσα σε τρυβλίο (4.2.4). Προετοιμάζονται δύο τρυβλία .

7.6. Απόχυση

Αποχύνονται περίπου 15 έως 18 ml υποστρώματος (7.1) μέσα σε κάθε εμβολιασμένο τρυβλίο.

Αναμειγνύονται αμέσως μετά την έκχυση, περιστρέφοντας επαρκώς το τρυβλίο Petri ώστε να αποκτηθούν ομοιόμορφα κατανεμημένες αποικίες μετά την επώαση.

Ο χρόνος μεταξύ τους τέλους της προετοιμασίας του δείγματος του γάλακτος και της ανάμειξης, ανάλογα με το είδος του γάλακτος, τη δοκιμαστική δόση ή την αραιώση του υποστρώματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 15 λεπτά.

Αφήνονται να στερεοποιηθούν πάνω σε καθαρή, ψυχρή, οριζόντια επιφάνεια.

7.7. Επώαση των τρυβλίων Petri

Τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστή (4.1.3). Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα. Δεν στοιβάζονται περισσότερα από έξι κατά ύψος. Οι στήλες των τρυβλίων πρέπει να απέχουν η μία από την άλλη και από τα τοιχώματα και την κορυφή του επωαστή.

Επωάζονται στους 30 ± 1 °C επί 72 ± 2 ώρες.

7.8. Καταμέτρηση αποικιών

Οι αποικίες καταμετρούνται μέσα στα τρυβλία Petri που δεν περιέχουν περισσότερες από 300 αποικίες.

Τα τρυβλία εξετάζονται σε χαμηλό φως . Για να διευκολυνθεί η καταμέτρηση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλος φακός (4.1.6) ή/και καταμετρητής (4.1.8). Αποφεύγεται η λανθασμένη θεώρηση σωματιδίων ή κατακαθισμένου υλικού στα τρυβλία ως σημειακές αποικίες. Εξετάζονται προσεκτικά αμφίβολα αντικείμενα, χρησιμοποιώντας φακό υψηλής μεγέθυνσης (4.1.7), όπου απαιτείται, για να ξεχωρίσουν τις αποικίες από ξένο υλικό.

Εκτεινόμενες αποικίες θεωρούνται ως μόνες αποικίες . Εάν λιγότερο από ένα τέταρτο του τρυβλίου έχει καλυφθεί από εκτεινόμενες αποικίες, οι αποικίες καταμετρούνται στο απρόσβλητο τμήμα του τρυβλίου και υπολογίζεται ο αριθμός που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το τρυβλίο . Εάν περισσότερο από ένα τέταρτο του τρυβλίου έχει καλυφθεί από εκτεινόμενες αποικίες, το τρυβλίο απορρίπτεται .

8. Υπολογισμός και έκφραση αποτελεσμάτων

8.1. Ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα

- 8.1.1. Χρησιμοποιούνται μετρήσεις από όλα τα τρυβλία που περιέχουν από 10 έως 300 αποικίες (βλέπε σημεία 8.1.3 και 8.1.4).
- 8.1.2. Ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά ml ακατέργαστου ή παστεριωμένου γάλακτος δίνεται από τη σχέση:

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

όπου

ΣC είναι το άθροισμα των αποικιών όπως καταμετρήθηκαν στην 8.1.1,

$(n_1+0,1 n_2)d$ είναι ίσο με τον όγκο του δείγματος στο τρυβλίο, στο οποίο:

n_1 είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στην πρώτη αραίωση,

n_2 είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη δεύτερη αραίωση,

d είναι ο συντελεστής αραίωσης με τον οποίο έγιναν οι πρώτες μετρήσεις.

Η μέτρηση δίνεται με δύο σημαντικά ψηφία. Όταν το ψηφίο που πρέπει να στρογγυλευθεί είναι το 5, στρογγυλοποιείται έτσι ώστε το ψηφίο ακριβώς στα αριστερά να είναι περιττό.

Παράδειγμα (παστεριωμένο γάλα)

Αραίωση 10^{-2} : 278 και 290 αποικίες

Αραίωση 10^{-3} : 33 και 28 αποικίες

$$\text{Αριθμός/ml} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}}$$

$$\text{Αριθμός/ml} = 0,022$$

$$= \frac{629}{0,022}$$

$$= 28\ 590$$

$$= 29\ 000$$

$$= 2,9 \times 10^4.$$

8.1.3. Εάν υπάρχουν μόνο μετρήσεις μικρότερες από 10, ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά χιλιοστόλιτρο αναφέρεται ως "μικρότερος από 10 x d ανά ml", με το "d" να είναι το αντίστροφο του μικρότερου συντελεστή αραιώσης.

8.1.4. Εάν υπάρχουν μόνο μετρήσεις που υπερβαίνουν τις 300 αποικίες αλλά είναι δυνατή η μέτρηση, υπολογίζεται μια κατ' εκτίμηση μέτρηση και πολλαπλασιάζεται επί το αντίστροφο του συντελεστή αραιώσης. Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως "Εκτιμώμενος αριθμός μικροοργανισμών ανά ml".

8.2. Γάλα UHT - επεξεργασμένο και αποστειρωμένο

Οι μετρήσεις τρυβλίου περισσότερο από 10 αποικίες ανά 0,1 ml πρέπει να θεωρείται ότι δεν ικανοποιούν πλέον τις απαιτήσεις τις κοινοτικές απαιτήσεις.

9. Ακρίβεια

Δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμα αποτελέσματα διεθνώς αναγνωρισμένων δοκιμών συνεργασίας.

V. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ - ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΡΥΒΛΙΟΥ**ΣΤΟΥΣ 21 °C**

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς καταμέτρησης μικροοργανισμών με τη βοήθεια μιας τεχνικής καταμέτρησης αποικιών στους 21 °C σε παστεριωμένο γάλα μετά από επώαση του γάλακτος στους 6 °C επί πέντε ημέρες για να προσδιοριστεί ο βαθμός μόλυνσης του παστεριωμένου γάλακτος από ψυχροτροπικούς οργανισμούς ικανούς προς πολλαπλασιασμό σε γάλα στους 6 °C.

2. Ορισμός

Ο ορισμός "μικροοργανισμοί" σημαίνει: οργανισμοί σχηματίζοντες καταμετρήσιμες αποικίες όταν επωασθούν αεροβίως κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες.

3. Αρχή

Το παστεριωμένο γάλα επωάζεται στους 6 °C επί πέντε μέρες. Ένας καθορισμένος όγκος του δείγματος του γάλακτος αναμειγνύεται με το υπόστρωμα της καλλιέργειας σε τρυβλία Petri και επωάζεται στους 21 °C επί 25 ώρες . Οι αποικίες καταμετρώνται και υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά ml παστεριωμένου γάλακτος.

4. Όργανα και γυάλινα σκεύη

Συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός και ιδιαίτερα:

4.1. Όργανα

4.1.1. Κλίβανος θερμού αέρα, ικανός να λειτουργεί στους 170 έως 175 °C.

4.1.2. Αυτόκλειστο, ικανό να λειτουργεί στους 121 ± 1 °C.

4.1.3. Επωαστές, ικανοί να διατηρούν θερμοκρασία:

(α) $6 \pm 0,2$ °C

(β) 21 ± 1 °C

σε όλα τα σημεία του εσωτερικού τους.

4.1.4. ρΗμετρο, με δυνατότητα εξίσωσης θερμοκρασίας, ακρίβειας $\pm 0,1$ μονάδας pH

4.1.5. Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 45 ± 1 °C.

4.1.6. Φακός, μεγεθυντική ικανότητα 2-4 x.

4.1.7. Φακός, μεγεθυντική ικανότητα 8-10 x.

4.1.8. Συσκευή αρίθμησης

4.1.9. Αναμεικτήρας ικανός να αναμειγνύει 1ml του δείγματος γάλακτος ή δεκαδική διάλυση με 9 ml του διαλύτου και αναμεικτής ικανός ο οποίος να λειτουργεί στην βάση της αρχής της περιστροφής του περιεχομένου του υπο εξέταση δείγματος στον δοκιμαστικό σωλήνα.

4.2. Γυάλινα σκεύη

4.2.1. Δοκιμαστικοί σωλήνες, με κατάλληλες διατάξεις κλεισίματος και επαρκή χωρητικότητα για να περιέχουν, με επαρκή κενό χώρο για ανάδευση, 10 ml της αρχικής αραιώσης ή περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις.

- 4.2.2. Φιάλες χωρητικότητας 150 έως 250 ml ή σωλήνες, χωρητικότητας περίπου 20 ml, για να φέρουν το υπόστρωμα καλλιέργειας.
- 4.2.3. Σιφώνια (πωματισμένα με ακατέργαστο βαμβάκι) από γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με ακέραια άκρη, ονομαστικής χωρητικότητας 1 ml και έχοντας απόληξη διαμέτρου 1,75 έως 3 mm.
- 4.2.4. Τρυβλία Petri, από διαυγές άχρωμο γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με το από κάτω τρυβλίο (πτυθμένα) να έχει εσωτερική διάμετρο περίπου 90-100 mm. Το εσωτερικό βάθος πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 mm. Ο πτυθμένας δεν πρέπει να έχει ανωμαλίες που να παρεμποδίζουν την καταμέτρηση των αποικιών.
- 4.2.5. Αποστείρωση των γυάλινων σκευών:

Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να αποστειρώνονται με μια από τις ακόλουθες μεθόδους:

- (α) με διατήρηση στους 170 έως 175 °C επί όχι λιγότερο από μια ώρα μέσα σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1)
- (β) με διατήρηση στους 121 ± 1 °C επί όχι λιγότερο από 20 λεπτά μέσα σε αυτόκλειστο (4.1.2).

Πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής διείσδυση ατμού στο αυτόκλειστο: εάν ο εξοπλισμός αποστειρώνεται σε δοχεία, αυτά δεν πρέπει να κλείνονται στεγανά, οι φιάλες πρέπει να έχουν χαλαρά τοποθετημένα πώματα. Τα γυάλινα σκεύη που αποστειρώθηκαν μέσα στο αυτόκλειστο πρέπει να στεγνώνονται με απάντληση του ατμού.

Τα σιφώνια πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1).

5. Υπόστρωμα καλλιέργειας - άγαρ για καταμέτρηση τρυβλίου με γάλα

5.1. Σύσταση

Εκχύλισμα μαγιάς	2,5 g
Τρυπτόνη	5,0 g
D (+) Γλυκόζη	1,0 g
Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη	1,0 g
Άγαρ	10 έως 15 g, ανάλογα με τις πηκτικές ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου άγαρ
Νερό	1 000 ml.

Το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη πρέπει να είναι απηλλαγμένο από αναστολείς. Αυτό πρέπει να ελεγχθεί με συγκριτικές δοκιμές χρησιμοποιώντας αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη που είναι με βεβαιότητα απηλλαγμένα από αναστολείς.

Παρασκευή

Τα συστατικά διασπείρονται σε αιώρημα και διαλύονται με την ακόλουθη σειρά: εκχύλισμα μαγιάς, τρυπτόνη, γλυκόζη και τελικά, αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, μέσα σε νερό. Η θέρμανση του αιωρήματος θα βοηθήσει τη διαδικασία αυτή. Προστίθεται το άγαρ και θερμαίνεται μέχρι βρασμού, αναδεύοντας συνεχώς έως ότου το άγαρ διαλυθεί εντελώς ή ατμίζεται επί 30 λεπτά περίπου.

Εάν χρειαστεί, γίνεται διήθηση μέσα από διηθητικό χάρτη.

Το pH ελέγχεται με pHμετρο (4.1.4) και, εάν χρειαστεί, το pH προσαρμόζεται έτσι ώστε, μετά την αποστείρωση, να είναι $6,9 \pm 0,1$ στους 25 °C χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον 0,1 mol/l) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος.

5.2. Κατανομή, αποστείρωση και διατήρηση του υποστρώματος καλλιέργειας

Το υπόστρωμα (5.1) μοιράζεται σε ποσότητες των 100 έως 150 ml μέσα σε φιάλες ή 12 έως 15 ml μέσα σε σωλήνες (4.2.2). Οι φιάλες και οι σωλήνες πωματίζονται.

Αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο (4.1.2) στους 121 ± 1 °C επί 15 λεπτά.

Ελέγχεται το pH του υποστρώματος.

Εάν το υπόστρωμα δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκόταδι, σε θερμοκρασία μεταξύ 1 και 5 °C επί όχι περισσότερο από ένα μήνα από την παρασκευή.

5.3. Άνυδρο υπόστρωμα καλλιέργειας του εμπορίου

Το υπόστρωμα καλλιέργειας (5.1) μπορεί να παρασκευασθεί από άνυδρο υπόστρωμα του εμπορίου. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή αλλά το αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη προστίθεται πριν διαλυθεί αν δεν αποτελεί συστατικό.

Το pH προσαρμόζεται στο $6,9 \pm 0,1$ στις 25 °C όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.1 και το υπόστρωμα κατανέμεται, αποστειρώνεται και φυλάσσεται όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.2.

6. Διαλύτες

6.1. Διάλυμα πεπτόνης/φυσιολογικού ορού :

Σύσταση

Πεπτόνη	1,0 g
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	8,5 g

Νερό 1 000 ml

Παρασκευή:

Τα συστατικά διαλύονται στο νερό, αν χρειαστεί θερμαίνοντας .

Το pH ελέγχεται με ένα pHμετρο (4.1.4) και εάν χρειαστεί, το pH διορθώνεται έτσι ώστε, μετά την αποστείρωση, να είναι $7,0 \pm 0,1$ στους 25 °C χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον 0,1 mol/l) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος .

6.2. Κατανομή, αποστείρωση και φύλαξη του αραιωτικού

Το αραιωτικό (6.1) κατανέμεται μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (4.2.1) σε τέτοιες ποσότητες ώστε, μετά την αποστείρωση, κάθε σωλήνας να περιέχει $9,0 \pm 0,2$ ml αραιωτικού. Οι σωλήνες πωματίζονται.

Αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο (4.1.2) στους 121 ± 1 °C επί 15 λεπτά.

Ελέγχεται το pH του αραιωτικού.

Εάν το αραιωτικό δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία μεταξύ 1 και 5 °C επί όχι περισσότερο από ένα μήνα από την παρασκευή.

6.3. Άνυδρα αραιωτικά του εμπορίου

Το αραιωτικό (6.1) μπορεί να παρασκευαστεί από αφυδατωμένα δισκία ή σκόνες του εμπορίου. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Το pH διορθώνεται όπως περιγράφηκε στο σημείο 6.1 και τα αραιωτικά κατανέμονται, αποστειρώνονται και φυλάσσονται όπως περιγράφηκε στο σημείο 6.2.

7. Διαδικασία

7.1. Τήξη του υποστρώματος

Πριν αρχίσει η μικροβιολογική εξέταση, η απαιτούμενη ποσότητα υποστρώματος λιώνεται γρήγορα και το υπόστρωμα διατηρείται ρευστοποιημένο στους 45 ± 1 °C σε υδρόλουτρο (4.1.5).

7.2. Προετοιμασία του δείγματος γάλακτος

7.2.1. Επωάζεται μια κλειστή συσκευασία παστεριωμένου γάλακτος ή, εάν αυτό είναι αδύνατο, ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα όχι λιγότερο από 100 ml επί 120 ± 2 ώρες στους $6 \pm 0,5$ °C σε επώαση [4.1.3.(α)].

7.2.2. Μετά την επώαση, το δείγμα του γάλακτος αναμειγνύεται πλήρως έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να κατανεμηθούν κατά το δυνατόν ομοιόμορφα, αναστρέφοντας γρήγορα το δοχείο με το δείγμα του γάλακτος 25 φορές. Πρέπει να αποφεύγεται ο αφρισμός ή να αφήνεται ο αφρός να διασπαρεί. Το μεσοδιάστημα μεταξύ ανάμειξης και ανάληψης της δοκιμαστικής δόσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα τρία λεπτά.

7.3. Προετοιμασία της αρχικής αραιώσης 10^{-1}

Μεταφέρεται, με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3), 1 ml του δείγματος (7.2.2) ακατέργαστου γάλακτος ή παστεριωμένου γάλακτος μέσα σε 9 ml αραιωτικού (6.1) αποφεύγοντας την επαφή μεταξύ του σιφώνιου και του αραιωτικού. Η θερμοκρασία του αραιωτικού πρέπει να είναι περίπου η ίδια με αυτή του δείγματος γάλακτος. Η αρχική αυτή αραιώση αναμειγνύεται προσεκτικά στον αναμεικτήρα (4.1.9) επί 5 έως 10 δευτερόλεπτα.

Έτσι αποκτάται μια αρχική αραιώση 10^{-1} .

7.4. Παρασκευή περαιτέρω δεκαδικών αραιώσεων

Μεταφέρεται, με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3), 1 ml της αρχικής αραιώσης (7.3) μέσα σε 9 ml αραιωτικού (6.1) ακολουθώντας τις οδηγίες που δόθηκαν στο σημείο 7.3.

Έτσι αποκτάται η αραιώση 10^{-1} .

Οι διαδικασίες αυτές επαναλαμβάνονται για να αποκτηθούν περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις έως ότου υπολογιστεί ότι αποκτήθηκε ο κατάλληλος αριθμός μικροοργανισμών (8.1).

7.5. Εμβολιασμός τρυβλίων Petri

Μεταφέρεται, με αποστειρωμένο σιφώνιο (4.2.3), 1 ml του δείγματος ή/και της κατάλληλης δεκαδικής αραιώσης μέσα σε τρυβλίο (4.2.4). Πρέπει να εξετάζονται δύο αραιώσεις τουλάχιστον. Προετοιμάζονται δύο τρυβλία από κάθε αραιώση κατάλληλα επιλεγμένη (8.1).

7.6. Απόχυση

Αποχύνονται περίπου 15 έως 18 ml υποστρώματος (7.1) μέσα σε κάθε εμβολιασμένο τρυβλίο.

Αναμειγνύονται αμέσως μετά την έκχυση, περιστρέφοντας επαρκώς το τρυβλίο Petri, ώστε να αποκτηθούν ομοιόμορφα κατανεμημένες αποικίες μετά την επώαση.

Ο χρόνος μεταξύ του τέλους της προετοιμασίας του δείγματος γάλακτος και της ανάμειξης αραιώσης και υποστρώματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 15 λεπτά.

Αφήνονται να στερεοποιηθούν πάνω σε καθαρή, ψυχρή, οριζόντια επιφάνεια.

7.7. Επώαση των τρυβλίων Petri

Τα τρυβλία μεταφέρονται στον επωαστή [4.1.3.(β)]. Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα . Δεν στοιβάζονται περισσότερο από έξι κατά ύψος. Οι στήλες των τρυβλίων πρέπει να απέχουν η μια από την άλλη και από τα τοιχώματα και από την κορυφή του επωαστή.

Επωάζονται στους 21 ± 1 °C επί 25 ώρες.

7.8. Καταμέτρηση αποικιών

Οι αποικίες καταμετρούνται μέσα στα τρυβλία Petri που δεν περιέχουν περισσότερες από 300 αποικίες.

Τα τρυβλία εξετάζονται σε χαμηλό φως . Για να διευκολυνθεί η καταμέτρηση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλος φακός (4.1.6) ή/και καταμετρητής (4.1.8). Αποφεύγεται η λανθασμένη θεώρηση σωματιδίων ή κατακαθισμένου υλικού στα τρυβλία ως σημειακές αποικίες. Εξετάζονται προσεκτικά αμφίβολα αντικείμενα, χρησιμοποιώντας φακό υψηλής μεγέθυνσης (4.1.7) όπου απαιτείται, για να ξεχωρίσουν οι αποικίες από ξένο υλικό.

Εκτεινόμενες αποικίες θεωρούνται ως μονές αποικίες . Εάν λιγότερο από ένα τέταρτο του τρυβλίου έχει καλυφθεί από εκτεινόμενες αποικίες, οι αποικίες καταμετρούνται στο απρόσβλητο τμήμα του τρυβλίου και υπολογίζεται ο αριθμός που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το τρυβλίο . Εάν περισσότερο από ένα τέταρτο του τρυβλίου έχει καλυφθεί από εκτεινόμενες αποικίες, το τρυβλίο απορρίπτεται .

8. Υπολογισμός και έκφραση αποτελεσμάτων

- 8.1. Χρησιμοποιούνται μετρήσεις από όλα τα τρυβλία που περιέχουν από 10 έως 300 αποικίες (βλέπε σημεία 8.3 και 8.4).

8.2. Ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά ml παστεριωμένου γάλακτος δίνεται από τη σχέση:

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

όπου:

ΣC είναι το άθροισμα των αποικιών όπως καταμετρήθηκαν στην 8.1,

$(n_1 + 0,1 n_2)d$ είναι ίσο με τον όγκο του δείγματος στο τρυβλίο, στο οποίο:

n_1 είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη πρώτη αραίωση,

n_2 είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη δεύτερη αραίωση,

d είναι ο συντελεστής αραίωσης με τον οποίο έγιναν οι πρώτες μετρήσεις.

Η μέτρηση δίνεται με δύο σημαντικά ψηφία . Όταν το ψηφίο που πρέπει να στρογγυλευθεί είναι το 5, στρογγυλοποιείται έτσι ώστε το ψηφίο ακριβώς στα αριστερά να είναι περιττό .

Παράδειγμα :

Αραίωση 10^{-2} : 278 και 290 αποικίες

Αραίωση 10^{-3} : 33 και 28 αποικίες

$$\text{Αριθμός/ml} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}}$$

$$= \frac{629}{0,022}$$

=28 590

=29 000

=2,9 x 10⁴.

- 8.3. Εάν υπάρχουν μόνον μετρήσεις μικρότερες από 10, ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά χιλιοστόλιτρο αναφέρεται ως "μικρότερος από 10 x d ανά ml, με το "d" να είναι το αντίστροφο του μικρότερου συντελεστή αραιώσης.
- 8.4. Εάν υπάρχουν μόνο μετρήσεις που υπερβαίνουν τις 300 αποικίες αλλά είναι δυνατή η μέτρηση, υπολογίζεται μια κατ' εκτίμηση μέτρηση και πολλαπλασιάζεται επί το αντίστροφο του συντελεστή αραιώσης. Το αποτέλεσμα αναφέρεται ως "Εκτιμώμενος αριθμός μικροοργανισμών ανά ml .
9. Ακρίβεια
Δεν υπάρχουν αποτελέσματα διεθνώς αποδεκτών δοκιμών συνεργασίας.

VI . ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ - ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΣΤΟΥΣ 30 °C

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή καθορίζει τη διαδικασία αναφοράς καταμέτρησης κολοβακτηριδίων σε παστεριωμένο γάλα με τη βοήθεια μιας τεχνικής καταμέτρησης αποικιών στους 30 °C .

2. Ορισμός

Ο ορισμός "κολοβακτηρίδια" σημαίνει βακτήρια τα οποία στους 30 °C σχηματίζουν χαρακτηριστικές ή μη χαρακτηριστικές αποικίες που προκαλούν

ζύμωση της λακτόζης με παραγωγή αερίου κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες.

3. Αρχή

Ένας καθορισμένος όγκος του δείγματος του γάλακτος αναμειγνύεται με το υπόστρωμα καλλιέργειας σε τρυβλία Petri και επωάζεται στους 30 °C επί 24 ώρες. Καταμετρώνται οι χαρακτηριστικές αποικίες και, εάν χρειαστεί, επιβεβαιώνεται η ταυτότητα των μη χαρακτηριστικών αποικιών με έλεγχο της ικανότητας ζύμωσης της λακτόζης. Μετά υπολογίζεται ο αριθμός κολοβακτηριδίων ανά ml παστεριωμένου γάλακτος.

4. Όργανα και γυάλινα σκεύη

Ο συνηθισμένος εργαστηριακός εξοπλισμός, και ιδιαίτερα:

4.1. Όργανα

4.1.1. Κλίβανος θερμού αέρα, ικανός να λειτουργεί στους 170 έως 175 °C.

4.1.2. Αυτόκλειστο, ικανό να λειτουργεί στους 121 ± 1 °C.

4.1.3. Επωαστικό κλίβανο / incubator ικανό να διατηρεί θερμοκρασία 30 ± 1 °C σε όλα τα σημεία του εσωτερικού του.

4.1.4. pHμετρο, με δυνατότητα εξίσωσης θερμοκρασίας, ακρίβειας $\pm 0,1$ μονάδας pH

4.1.5. Υδρόλουτρο, ικανό να λειτουργεί στους 45 ± 1 °C.

4.1.6. Συρμάτινη βελόνα, από λευκόχρυσο-ιρίδιο ή νικέλιο-χρώμιο.

4.2. Γυάλινα σκεύη

- 4.2.1. Δοκιμαστικοί σωλήνες με κατάλληλο κλείσιμο και χωρητικότητα 20 ml, για να φέρουν το υπόστρωμα επιβεβαίωσης (5.2) και σωλήνες Durham κατάλληλων διαστάσεων για χρήση με τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- 4.2.2. Φιάλες χωρητικότητας 150 έως 250 ml για να φέρουν το στερεό επιλεκτικό υπόστρωμα (5.1).
- 4.2.3. Σιφώνια (πωματισμένα με ακατέργαστο βαμβάκι) από γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με ακέραια άκρα, ονομαστικής χωρητικότητας 1-10 ml και έχοντας απόληξη διαμέτρου 1,75 έως 3 mm.
- 4.2.4. Τρυβλία Petri, από διαυγές άχρωμο γυαλί ή αποστειρωμένο συνθετικό υλικό, με το από κάτω τρυβλίο (πυθμένα) να έχει εσωτερική διάμετρο περίπου 90-100 mm. Το εσωτερικό βάθος πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 mm. Ο πυθμένας δεν πρέπει να έχει ανωμαλίες που να παρεμποδίζουν την καταμέτρηση των αποικιών.
- 4.2.5. Αποστείρωση των γυάλινων σκευών:

Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να αποστειρώνονται με μια από τις ακόλουθες μεθόδους:

- (α) με διατήρηση στους 170 έως 175 °C επί όχι λιγότερο από μία ώρα μέσα σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1)
- (β) με διατήρηση στους 121 ± 1 °C επί όχι λιγότερο από 20 λεπτά μέσα σε αυτόκλειστο (4.1.2).

Πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής διείσδυση ατμού στο αυτόκλειστο: π.χ. αν ο εξοπλισμός αποστειρώνεται σε δοχεία, αυτά δεν πρέπει να είναι σφικτά κλεισμένα, οι φιάλες και τα φιαλίδια πρέπει να έχουν χαλαρά τοποθετημένα πώματα.

Τα γυάλινα σκεύη που αποστειρώθηκαν μέσα στο αυτόκλειστο πρέπει να στεγνώνονται με απάντληση του ατμού.

Τα σιφώνια πρέπει να αποστειρώνονται σε κλίβανο θερμού αέρα (4.1.1).

5. Υποστρώματα καλλιέργειας

5.1. Ιώδες-ερυθρό άγαρ χολής-λακτόξης (άγαρ VRBL). Στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα.

Σύσταση:

Πεπτόνη	7 g
Εκχύλισμα μαγιάς	3 g
Λακτόζη ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)	10 g
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	5 g
Χολικά άλατα	1,5 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,03 g
Κρυσταλλικό ιώδες	0,002 g
Άγαρ	10-15 g (ανάλογα με τις πηκτικές ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου άγαρ)
Νερό	1 000 ml

Παρασκευή:

Τα συστατικά διασπείρονται σε αιώρημα και διαλύονται στο νερό και αφήνονται να σταθούν επί αρκετά λεπτά . Μετά αναμειγνύονται ζυηρά.

Ελέγχεται το pH με pHμετρο (4.1.4) και, εάν χρειαστεί, το pH προσαρμόζεται

έτσι, ώστε μετά το βρασμό, να είναι $7.4 \pm 0,1$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον $0,1\text{ mol/l}$) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος.

Φέρονται γρήγορα σε βρασμό, αναδεύοντας κατά διαστήματα και αμέσως κατανέμονται σε ποσότητες των 100 έως 150 ml μέσα σε αποστειρωμένες φιάλες (4.2.2). Το υπόστρωμα ψύχεται σε υδρόλουτρο (4.1.5) στους $45 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Η στειρότητα του υλικού πρέπει να ελέγχεται την ώρα της χρησιμοποίησής του (βλέπε σημείο 6.4).

Το υλικό χρησιμοποιείται μέσα σε τρεις ώρες από την παρασκευή του.

5.2. Λαμπρός - πράσινος ζωμός λακτόζης - χολής . Υπόστρωμα επιβεβαίωσης.

Σύσταση:

Πεπτόνη	10 g
Λακτόζη ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Χολή βοός αφυδατωμένη	20 g
Λαμπρό πράσινο	0,0133 g
Νερό	1 000 ml

Παρασκευή:

Τα συστατικά διαλύονται μέσα στο νερό με βρασμό.

Ελέγχεται το pH με pH μέτρο (4.1.4) και, εάν χρειαστεί, το pH προσαρμόζεται έτσι ώστε, μετά την αποστείρωση, να είναι $7,2 \pm 0,1$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ χρησιμοποιώντας διάλυμα (τουλάχιστον $0,1\text{ mol/l}$) υδροξειδίου νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος.

Το υπόστρωμα κατανέμεται, σε ποσότητες των 10 ml, μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (4.2.1) που περιέχουν σωλήνες Durham. Οι σωλήνες πωματίζονται.

Αποστειρώνονται στο αυτόκλειστο (4.1.2) στους $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ επί 15 λεπτά.