31984L0004

1984 1 18 EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS L 15/28

KOMISIJOS DIREKTYVA

1983 m. gruodžio 20 d.

iš dalies keičianti Direktyvas 71/393/EEB, 72/199/EEB ir 78/633/EEB, nustatančias oficialiai pašarų kontrolei taikytinus Bendrijos analizės metodus

(84/4/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1970 m. liepos 20 d. Tarybos direktyvą 70/373/EEB dėl Bendrijos mėginių paėmimo ir analizės metodų, taikomų valstybinei pašarų kontrolei, įvedimo ([1]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Graikijos prisijungimo aktu, ypač į jos 2 straipsnį,

kadangi Komisijos direktyvos 71/393/EEB ([2]), 72/199/EEB ([3]) ir 78/633/EEB ([4]) nustato žalių aliejų ir riebalų, virginiamicino ir cinko bacitracino analizės metodus; kadangi būtina šiuos metodus pakeisti metodais, atitinkančiais mokslo ir technikos žinių pažangą;

kadangi šioje direktyvoje numatytos priemonės atitinka nuolatinio Pašarų komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Direktyvos 71/393/EEB priedo IV dalis „Žalio aliejaus ir riebalų nustatymas“ keičiama šios direktyvos I priedu.

2 straipsnis

Direktyvos 72/199/EEB II priedo 5 dalis „Virginiamicino nustatymas matuojant difuziją agaro terpėje“ keičiama šios direktyvos II priedu.

3 straipsnis

Direktyvos 78/633/EEB priedo 1 dalis „Cinko bacitracino nustatymas matuojant difuziją agaro terpėje“ keičiama šios direktyvos III priedu.

4 straipsnis

Valstybės narės ne vėliau kaip iki 1984 m. birželio 1 d priima įstatymus ir kitus teisės aktus, kurie įsigalioję įgyvendina šią direktyvą, ir apie tai jos nedelsdamos praneša Komisijai.

5 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1983 m. gruodžio 20 d.

Komisijos vardu

Poul DALSAGER

Komisijos narys

([1]) OL L 170, 1970 8 3, p. 2.
([2]) OL L 279, 1971 12 20, p. 7.
([3]) OL L 123, 1972 5 29, p. 6.
([4]) OL L 206, 1978 7 29, p. 43.

I PRIEDAS

„4. **ŽALIŲ ALIEJŲ IR RIEBALŲ NUSTATYMAS**

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu galima nustatyti žalių aliejų ir riebalų kiekį pašaruose. Jis netaikomas aliejingųjų augalų sėklų ir aliejingųjų vaisių, apibrėžtų 1966 m. rugsėjo 22 d. Tarybos reglamente (EEB) Nr. 136/66, analizei.

Atsižvelgiant į pašarų rūšį, gali būti taikomas vienas iš šių dviejų metodų.

1.1. *A metodas*

Tinka augalinės kilmės paprastiesiems pašarams, išskyrus pašarus, turinčius aliejų ir riebalų, kurių neįmanoma visiškai išekstrahuoti petroleteriu prieš tai nehidrolizavus. Tai būtų glitimas, mielės, sojų ir bulvių baltymai. Be to, šis metodas tinka kombinuotiesiems pašarams, išskyrus pašarus, turinčius pieno miltelių, arba pašarus, iš kurių aliejai ir riebalai negali būti visiškai ekstrahuoti petroleteriu prieš tai nehidrolizavus.

1.2. *B metodas*

Tinka gyvūninės kilmės paprastiesiems pašarams, taip pat pašarams, kurie 1.1 punkte išvardyti kaip A metodo išimtys.

2. **Metodo esmė**

2.1. *A metodas*

Mėginys ekstrahuojamas petroleteriu. Tirpiklis nudistiliuojamas, o likutis džiovinamas ir sveriamas.

2.2. *B metodas*

Mėginys apdorojamas karštu vandenilio chlorido rūgšties tirpalu. Mišinys aušinamas ir filtruojamas. Likutis plaunamas, džiovinamas ir ekstrahuojamas petroleteriu taikant A metodą.

3. **Reagentai**

3.1. Petroleteris: 40–60 °C virimo temperatūros, bromo skaičius mažesnis kaip 1, liekana po išgarinimo mažesnė kaip 2 mg/100 ml.

3.2. Natrio sulfatas, bevandenis.

3.3. Vandenilio chlorido rūgštis, 3 mol/l.

3.4. Pagalbinės filtravimo priemonės, pvz., diatomitas, *Hyflo-supercel*.

4. **Aparatūra**

4.1. Ekstrahavimo aparatūra. Jei su sifonu (Soksleto aparatas), parenkamas flegmos grąžinimo greitis, užtikrinantis maždaug 10 ciklų per valandą; jei aparatūra be sifono, flegmos grąžinimo greitis turėtų būti apie 10 ml/min.

4.2. Ekstrahavimo tūtos, neturinčios petroleteryje tirpių medžiagų, ir kurių akytumas atitiktų 4.1 punkto reikalavimus.

4.3. Džiovinimo spinta, gali būti vakuuminė, nustatyta 75 ± 3 °C, arba atmosferos slėgio, nustatyta 100 ± 3 °C.

5. **Darbo eiga**

5.1. *A metodas:* (žr. 8.1 punktą).

5 g mėginio pasveriami 1 mg tikslumu, supilama į ekstrahavimo tūtą (4.2) ir užkemšama riebalų neturinčios vatos tamponu.

Tūta įdedama į ekstraktorių (4.1) ir ekstrahuojama 6 valandas petroleteriu (3.1). Petroleterio ekstraktas supilamas į sausą, pasvertą kolbą, į kurią įdedama pemzos gabaliukų [1].

Tirpiklis nudistiliuojamas. Garinimo likutis išdžiovinamas, pusantros valandos laikant džiovinimo spintoje (4.3). Ataušinama eksikatoriuje ir pasveriama. Dar kartą džiovinama 30 minučių norint patikrinti, ar nekinta aliejų ir riebalų masė (sveriant du kartus iš eilės, masės skirtumas turi būti mažesnis kaip 1 mg).

5.2. *B metodas*

2,5 g mėginio (žr. 8.2 punktą) pasveriama 1 mg tikslumu, suberiama į 400 ml cheminę stiklinę arba į 300 ml konusinę kolbą, įpilama 100 ml 3 mol/l vandenilio chlorido rūgšties (3.3) ir įdedami keli pemzos gabaliukai. Cheminė stiklinė uždengiama laikrodžio stiklu arba prie konusinės kolbos prijungiamas grįžtamasis kondensatorius. Mišinys užverdamas ir vieną valandą leidžiama pamažu virti ant mažos ugnies arba ant kaitinimo plokštės. Produktui neleidžiama prilipti prie indo sienelių.

Ataušinama ir įdedama pagalbinių filtravimo priemonių (3.4), kurių filtruojant pakaktų visiškai išvengti aliejaus ir riebalų nuostolių. Filtruojama per sudrėkintą, riebalų neturintį dvigubą filtruojamąjį popierių. Likutis plaunamas šaltu vandeniu tol, kol gaunamas neutralus filtratas. Patikrinama, ar filtrate nėra kažkiek aliejaus ar riebalų. Jų buvimas rodo, kad mėginys, prieš jį hidrolizuojant, turi būti ekstrahuojamas petroleteriu, taikant A metodą.

Dvigubas filtruojamasis popierius su likučiu padedamas ant laikrodžio stiklo ir pusantros valandos džiovinama džiovinimo spintoje esant 100 ± 3 °C.

Dvigubas filtruojamasis popierius ir sausas likutis įdedamas į ekstrahavimo tūtą (4.2) ir ji užkemšama riebalų neturinčios vatos tamponu. Tūta įdedama į ekstraktorių (4.1) ir atliekama taip, kaip nurodyta 5.1 punkto antrojoje bei trečiojoje pastraipose.

6. **Rezultatų skaičiavimas**

Likučio svoris išreiškiamas mėginio masės procentine dalimi.

7. **Pakartojamumas**

Rezultatų skirtumas tarp dviejų lygiagrečių vieno mėginio matavimų, atliktų to paties tyrėjo, neturi viršyti:

— 0,2 % absoliučiąja verte, jei neapdorotų aliejų ir riebalų kiekis mažesnis kaip 5 %,

— 4,0 % didžiausio rezultato, jei kiekis yra 5–10 %,

— 0,4 % absoliučiąja verte, jei kiekis didesnis kaip 10 %.

8. **Pastabos**

8.1. Jei produktai turi didelį kiekį aliejų bei riebalų, todėl juos sunku susmulkinti arba neįmanoma paimti sumažinto vienalyčio mėginio, atliekama taip.

20 g mėginio pasveriama 1 mg tikslumu ir sumaišoma su 10 g arba daugiau bevandenio natrio sulfato (3.2). Ekstrahuojama petroleteriu (3.1), kaip nurodyta 5.1 punkte. Gautas ekstraktas praskiedžiamas petroleteriu (3.1) iki 500 ml, homogenizuojama. Paimama 50 ml tirpalo, supilama į prieš tai pasvertą sausą mažą kolbą, į kurią įdedami keli pemzos gabaliukai (2). Nudistiliuojamase tirpiklis, išdžiovinama ir toliau atliekama taip, kaip nurodyta 5.1 punkto paskutinėje pastraipoje.

Iš ekstrahavimo tūtoje esančio likučio pašalinamas tirpiklis, likutis sumalamas smulkiau kaip iki 1 mm dydžio dalelių, supilama atgal į ekstrahavimo tūtą (natrio sulfato nededama) ir atliekama taip, kaip nurodyta 5.1 punkto antrojoje ir trečiojoje pastraipose.

Aliejaus ir riebalų kiekis, kaip procentinė mėginio dalis, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$(10a + b) \times 5$$

čia:

a = likučio masė g po pirmojo ekstrahavimo (ekstrakto alikvotinė dalis),

b = likučio masė g po antrojo ekstrahavimo.

8.2. Analizuojant produktus su mažu aliejų ir riebalų kiekiu, mėginio masę galima padidinti iki 5 g.

---

(1) Jei aliejui arba riebalams toliau turi būti atliekami kokybinės analizės bandymai, pemzos gabaliukai pakeičiami stiklo karoliukais.

(2) Jei aliejui arba riebalams toliau turi būti atliekami kokybinės analizės bandymai, pemzos gabaliukai pakeičiami stiklo karoliukais.“

II PRIEDAS

„5. **Virginiamicino nustatymas**

— matuojant difuziją agaro terpėje —

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas virginiamicino kiekis pašaruose ir premiksuose. Radimo riba 2 mg/kg (2 ppm) ([1]).

2. **Metodo esmė**

Mėginys ekstrahuojamas *Tween* 80 tirpalu metanolyje. Ekstraktas nupilamas arba centrifuguojamas ir skiedžiamas. Jo antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant virginiamicino difuziją agaro terpėje, kurioje pasėta *Micrococcus luteus* kultūra . Difuzija matoma pagal mikroorganizmo inhibavimo zonų susidarymą. Laikoma, kad naudojamų antibiotiko koncentracijos verčių intervale šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: Micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1. *Pradinės bakterijų kultūros laikymas*

Mėgintuvėlyje su gulsčiąja mitybine terpe (4.1) pasėjama *Micrococcus luteus* ir inkubuojama 24 valandas esant 30 °C. Kultūra laikoma šaldytuve esant 4 °C. Naujai sėjama kas dvi savaites.

3.2. *Bakterijų suspensijos ruošimas* ([a])

Bakterijos iš mėgintuvėlio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos naudojant 2–3 ml natrio chlorido tirpalo (4.3). Ši suspensija naudojama 250 ml mitybinės terpės apsėjimui(4.1), esančios *Roux* kolboje, ir inkubuojama 18–20 valandų esant 30 °C. Kultūra surenkama su 25 ml natrio chlorido tirpalo (4.3) ir sumaišoma. Suspensija praskiedžiama natrio chloridu tirpalu (4.3) santykiu 1/10. Šios suspensijos šviesos pralaidumo koeficientas matuojamas 1 cm storio kiuvetėje esant 650 nm bangos ilgiui, kai palyginamasis tirpalas naudojamas natrio chlorido tirpalas (4.3), kuris turi būti apie 75 %. Esant 4 °C šią suspensiją galima laikyti vieną savaitę.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Mitybinė ir nustatymo terpė* ([b])

Mėsos peptonas	6,0 g
Tripsino peptonas	4,0 g
Mielių ekstraktas	3,0 g
Mėsos ekstraktas	1,5 g
Gliukozė	1,0 g
Agaras	10-20 g
Vanduo	1 000 ml

pH 6,5 (po sterilizavimo).

4.2. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 6*

Kalio hidrofosfatas K_2HPO_4	2,0 g
Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4	8,0 g
Vanduo iki	1 000 ml

4.3. Natrio chlorido tirpalas 0,8 % (m/V): 8 g natrio chlorido ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 000 ml; sterilizuojama.

4.4. Metanolis.

4.5. Fosfatinio buferinio tirpalo (4.2) ir metanolio mišinys: 80/20 (V/V).

4.6. *Tween* 80 tirpalas metanolyje 0,5 % (m/V): 5 g *Tween* 80 ištirpinamas metanolyje (4.4) ir praskiedžiama metanoliu iki 1 000 ml.

4.7. Standartinė cheminė medžiaga: žinomo aktyvumo virginiamicinas.

5. **Standartiniai tirpalai**

Tiksliai pasveriamas reikiamas standartinės medžiagos (4.7) kiekis, jis ištirpinamas metanolyje (4.4) ir praskiedžiamas metanoliu (4.4), kad pradiniame tirpale virginiamicino koncentracija būtų 1 000 µg/ml.

Laikomas užkimštoje kolboje esant 4 °C, šis tirpalas yra stabilus bent penkias dienas.

Iš šio pradinio tirpalo nuosekliai skiedžiant mišiniu (4.5) paruošiami šie tirpalai:

s_8	1,0	µg/ml
s_4	0,5	µg/ml
s_2	0,25	µg/ml
s_1	0,125	µg/ml

6. **Ekstrakto ir bandomųjų tirpalų ruošimas**

6.1. *Ekstrahavimas*

6.1.1 Produktai, kuriuose virginiamicino koncentracija 100 mg/kg arba mažesnė

Pasveriama 50 g mėginio, įpilama 200 ml tirpalo (4.6) ir 30 minučių kratoma ant purtyklės. Paliekama nusistovėti arba centrifuguojama, paimama 20 ml supernatanto ir sukamajame garintuve garinama maždaug iki 5 ml, esant ne didesnei kaip 40 °C temperatūrai. Likutis praskiedžiamas mišiniu (4.5) numatomai 1 µg/ml virginiamicino koncentracijai (= u_8) gauti.

6.1.2. Produktai, kuriuose virginiamicino koncentracija didesnė kaip 100 mg/kg

Pasveriama ne daugiau kaip 10 g mėginio, turinčio 1–50 mg virginiamicino, įpilama 100 ml tirpalo (4.6) ir 30 minučių kratoma ant purtyklės. Paliekama nusistovėti arba centrifuguojama, supernatantas praskiedžiamas mišiniu (4.5) numatomai 1 µg/ml virginiamicino koncentracijai (= u_8) gauti.

6.2. *Bandomieji tirpalai*

Iš u_8 tirpalo nuosekliai skiedžiant (1:1) mišiniu (4.5), paruošiami u_4 (numatomas kiekis: 0,5 µg/ml), u_2 (numatomas kiekis: 0,25 µg/ml) ir u_1 (numatomas kiekis: 0,125 µg/ml) tirpalai.

7. **Bandymų eiga**

7.1. *Sėjimas į bandymų terpę*

Į bandymo mitybinę terpę (4.1) pasėjama bakterijų suspensija (3.2), esant maždaug 50 °C. Atliekant išankstinius bandymus ant lėkštelių su terpe (4.1) nustatomas bakterijų suspensijos kiekis, reikalingas aiškiausioms ir didžiausioms inhibavimo zonoms gauti, esant įvairioms virginiamicino koncentracijos vertėms.

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturių koncentracijų standartinius tirpalus (s_8, s_4, s_2 ir s_1) ir keturių koncentracijų bandymo tirpalus (u_8, u_4, u_2 ir u_1). Kiekvienoje lėkštelėje būtinai turi būti keturių koncentracijų ekstrakto ir standartiniai tirpalai. Paimamos gana didelės lėkštelės, kad agaro terpėje galima būtų padaryti bent aštuonias 10-13 mm skersmens skyles, kurių centrai būtų nutolę ne mažiau kaip 30 mm. Bandymą galima atlikti lėkštelėse, padarytose iš stiklo plokštelės, iš viršaus padengtos 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio ar plastiko žiedu.

Į lėkšteles įpilama terpės (4.1), apsėtos kaip 7.1 punkte, kad gautųsi maždaug 2 mm storio sluoksnis (60 ml į 200 mm skersmens lėkštelę). Paliekama sutirštėti horizontalioje padėtyje, išgręžiamos skylės ir įlašinama į jas tiksliai išmatuoti bandomieji ir standartiniai tirpalo tūriai (0,10-0,15 ml į kiekvieną skylę, atsižvelgiant į skersmenį). Kiekvienos koncentracijos tirpalas panaudojamas bent keturis kartus, taigi atliekant kiekvieną nustatymą įvertinamos 32 inhibavimo zonos.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos 16–18 valandų esant 30 ± 2 °C.

8. **Įvertinimas**

Inhibavimo zonų skersmuo išmatuojamas 0,1 mm tikslumu. Matavimų vidurkio vertes kiekvienai koncentracijos vertei pažymimos pusiau logaritminiame grafike, kuriame ihhibavimo zonų skersmuo būtų pavaizduotas kaip koncentracijos logaritmo funkcija. Brėžiamos staninį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės, kaip parodyta žemiau esančiame pavyzdyje: naudojantis formule nustatomas taškas, geriausiai

atitinkantis mažiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SL):

a) $SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$

Nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis didžiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SH) pasinaudojant formule:

b) $SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$

Panašiai apskaičiuojami taškai, geriausiai atitinkantys mažiausią (UL) ir didžiausią (UH) koncentraciją ekstrakte, pakeičiant aukščiau pateiktose formulėse S_1, S_2, S_4 ir S_8 į U_1, U_2, U_4 ir U_8

Apskaičiuotos SL ir SH vertės pažymimos tame pačiame grafike ir taškai sujungiami, taip gaunama geriausiai standartinį tirpalą atitinkanti tiesė. Panašiu būdu pažymimos UL ir UH vertės, kurių taškai taip pat sujungiami, gaunant geriausiai ekstraktą atitinkančią tiesę.

Jei nėra jokių trukdžių, tiesės turi būti lygiagrečios. Praktiniame darbe tiesės gali būti laikomos lygiagrečiomis, jei (SH — SL) ir (UH — UL) vertės ir jų vidutinė vertė skiriasi ne daugiau kaip 10 %.

Jei nustatoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, galima atmesti u_1 ir s_1 arba u_8 ir s_8 vertės ir SL, SH, UL ir UH vertės apskaičiuojamos pagal alternatyvias formules, gaunant alternatyvias geriausiai atitinkančias tieses:

a′) $SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6}$ or $\frac{5s_2 + 2s_4\, s_8}{6}$

(b′) $SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6}$ or $\frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$

ir panašiai skaičiuojamos UL ir UH vertės. Turi būti vykdomi tie patys lygiagretumo kriterijai. Galutinėje ataskaitoje turi būti nurodyta, kad rezultatas buvo apskaičiuojamas pagal tris koncentracijas.

Jei manote, kad tiesės yra lygiagrečios, pagal vieną iš šių formulių apskaičiuojamas santykinio aktyvumo logaritmas (log A), atsižvelgiant į tai, ar lygiagretumui įvertinti buvo naudojamos trys ar keturios koncentracijos.

Keturios koncentracijos:

c) $\text{Log A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$

Trys koncentracijos:

d) $\text{Log A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$

arba

d′) $\text{Log A} = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$

Mėginio ekstrakto aktyvumas = atitinkamo standarto aktyvumas × A

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Jei nustatoma, kad santykinis aktyvumas yra už 0,5–2,0 intervalo ribų, bandymas kartojamas, atitinkamai keičiant ekstrakto koncentracijos vertes arba, jei tai neįmanoma, standartinio tirpalo koncentracijas. Kai santykinio aktyvumo neįmanoma gauti reikiamame intervale, visi gauti rezultatai turi būti laikomi tik apytikriais, ir tai turi būti nurodyta galutinėje ataskaitoje.

Kai manoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, nustatymas pakartojamas. Jei lygiagretumas vis tiek nepasiekiamas, nustatymas turi būti laikomas nepatenkinamu.

Rezultatas išreikškiamas mg virgianimicino vienam kilogramui pašaro.

9. **Pakartojamumas**

Rezultatų skirtumas tarp dviejų lygiagrečių to paties mėginio matavimų, atliktų to paties tyrėjo, neturi viršyti:

— 2 mg/kg absoliučiąja verte, jei virginiamicino kiekis mažesnis arba lygus 10 mg/kg,
— 20 % didžiausios vertės, jei virginiamicino kiekis yra 10–25 mg/kg,
— 5 mg/kg absoliučiąja verte, jei virginiamicino kiekis 25–50 mg/kg,
— 10,0 % didžiausios vertės, jei virginiamicino kiekis yra didesnis kaip 50 mg/kg.

(1) 1 mg virginiamicino atitinka 1 000 UK vienetų.
(a) Galima taikyti kitus metodus, jei būtų nustatyta, kad gaunamos panašios bakterijų suspensijos.
(b) Galima naudoti bet kurią prekyboje esančią mitybinę terpę, kuri turi panašią sudėtį ir duoda tuos pačius rezultatus.“

III PRIEDAS

„1. **CINKO BACITRACINO NUSTATYMAS**

— matuojant difuziją agaro terpėje —

1. **Tikslas ir taikymo sritis**

Šiuo metodu nustatomas cinko bacitracino kiekis pašaruose ir premiksuose. Radimo riba 5 mg/kg (5 ppm) ([1]).

2. **Metodo esmė**

Esant pH 2 mėginys ekstrahuojamas metanolio, vandens bei vandenilio chlorido rūgšties mišiniu ir natrio sulfido tirpalu. Pridedamas natrio sulfidas skirtas visų tirpių vario druskų, galinčių trukdyti nustatymui, nusodinimui. Ekstrakto pH padidinamas iki 6,5, tirpalas koncentruojamas (jei būtina) ir skiedžiamas. Jo antibiotinis aktyvumas nustatomas matuojant cinko bacitracino difuziją agaro terpėje, kurioje pasėtas *Micrococcus luteus (flavus)*. Difuzija matoma pagal mikroorganizmo inhibavimo zonų susidarymą. Laikoma, kad naudojamų antibiotiko koncentracijos verčių intervale šių zonų skersmuo yra proporcingas antibiotiko koncentracijos logaritmui.

3. **Mikroorganizmas: *Micrococcus luteus (flavus)* ATCC 10240**

3.1. *Pradinės bakterijų kultūros laikymas*

Mėgintuvėlyje su gulsčiąja mitybine terpe (4.1) pasėjama *Micrococcus luteus (flavus)* ir inkubuojama 24 valandas esant 30 °C. Kultūra laikoma šaldytuve esant 4 °C. Naujai sėjama kas dvi savaites.

3.2. *Bakterijų suspensijos ruošimas* ([a])

Bakterijos iš mėgintuvėlio su neseniai paruoštu gulsčiuoju agaru (3.1) surenkamos panaudojant 2–3 ml natrio chlorido tirpalo (4.3). Ši suspensija naudojama 250 ml mitybinės terpės (4.1), esančios *Roux* kolboje, apsėjimui, ir inkubuojama 18–20 valandų esant 30 °C. Kultūra surenkama su 25 ml natrio chlorido tirpalo (4.3) ir sumaišoma. Suspensija praskiedžiama natrio chlorido tirpalu (4.3) santykiu 1/10. Šios suspensijos šviesos pralaidumo koeficientas, matuojamas 1 cm storio kiuvetėje, esant 650 nm bangos ilgiui, kai palyginamuoju tirpalu naudojamas natrio chlorido tirpalas (4.3), turi būti apie 75 %. Esant 4 °C šią suspensiją galima laikyti vieną savaitę.

4. **Mitybinės terpės ir reagentai**

4.1. *Mitybinė terpė* ([b])

Mėsos peptonas	6, 0 g
Tripsino peptonas	4, 0 g
Mielių ekstraktas	3, 0 g
Mėsos ekstraktas	1, 5 g
Gliukozė	1, 0 g
Agaras	10–20,0 g
Vanduo	1 000 ml

pH 6,5-6,6 (po sterilizavimo).

4.2. *Bandymo terpė* ([c])

Tripsino peptonas	10, 0 g
Mielių ekstraktas	3, 0 g
Mėsos ekstraktas	1, 5 g
Gliukozė	1, 0 g
Agaras	10–20 g
Tween 80	1 ml
Vanduo iki	1 000 ml

pH 6,5 (po sterilizavimo).

4.3. Natrio chlorido 0,8 % (m/V) tirpalas: 8 g natrio chlorido ištirpinama vandenyje ir praskiedžiama iki 1 000 ml; sterilizuojama.

4.4. Metanolio, vandens ir vandenilio chlorido rūgšties mišinys (4.6):

80/17,5/2,5 (v/v/v).

4.5. *Fosfatinis buferinis tirpalas, pH 6,5:*

Kalio hidrofosfatas K_2HPO_4	22,15 g
Kalio dihidrofosfatas KH_2PO_4	27,85 g
Vanduo iki	1 000 ml

4.6. Vandenilio chlorido rūgštis (ρ = 1,18-1,19 g/ml).

4.7. Vandenilio chlorido rūgštis (0,1 M).

4.8. Natrio hidroksido 1 M tirpalas.

4.9. Natrio sulfido apytikriai 0,5 M tirpalas.

4.10. Violetinio bromkrezolio 0,04 % (m/V) tirpalas: 0,1 g violetinio bromkrezolio ištirpinama 18,5 ml 0,01 M natrio hidroksido tirpale. Vandeniu praskiedžiama iki 250 ml ir sumaišoma.

4.11. Standartinė cheminė medžiaga: žinomo aktyvumo (T. V.) cinko bacitracinas.

5. **Standartiniai tirpalai**

Pasveriama cinko bacitracino (4.10) kiekis, atitinkantis 1 050 T. V. (pagal nurodytą aktyvumą). Įpilama 5 ml 0,1 M vandenilio chlorido rūgšties (4.7) ir paliekama stovėti 15 minučių. Įpilama 30 ml vandens, fosfatiniu buferiu (4.5) nustatoma pH vertė 4,5 (apie 4 ml), praskiedžiama iki 50 ml vandeniu ir gerai sumaišoma (1 ml = 21 T. V.).

Šį pradinį tirpalą nuosekliai skiedžiant fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.5) paruošiami tokių koncentracijų tirpalai:

s_8	0, 42	T. V./ml
s_4	0, 21	T. V./ml
s_2	0, 105	T. V./ml
s_1	0,0525	T. V./ml

6. **Ekstrakto ir bandomųjų tirpalų ruošimas**

6.1. *Ekstrahavimas*

6.1.1. Premiksai ir mineraliniai pašarai

Pasveriama 2,0–5,0 g mėginio, įpilama 29 ml mišinio (4.4), 1 ml natrio sulfido tirpalo (4.9) ir trumpai pakratoma. Patikrinama, ar pH vertė yra apie 2. Kratoma 10 minučių, įpilama 30 ml fosfatinio buferinio tirpalo (4.5), kratoma 15 minučių ir centrifuguojama. Paimama reikiama centrifugato alikvotinė dalis ir, naudodami pH-metrą arba violetinio bromkrezolio tirpalą (4.10) kaip indikatorių, 1 M natrio hidroksido tirpalu (4.8) nustatoma pH 6,5 vertė. Praskiedžiama fosfatiniu buferiu (4.5) numatomai cinko bacitracino koncentracijai 0,42 T. V. /ml (= u_8) gauti.

6.1.2. Baltymų koncentratai

Pasveriama 10 g mėginio, įpilama 49 ml mišinio (4.4), 1 ml natrio sulfido tirpalo (4.9) ir trumpai pakratoma. Patikrinama, ar pH vertė yra apie 2. Kratoma 10 minučių, įpilama 30 ml fosfatinio buferinio tirpalo (4.5), kratoma 15 minučių ir centrifuguojama. Paimamas reikiamas centrifugato tūris ir, naudojant pH-metrą arba violetinio bromkrezolio tirpalą (4.10) kaip indikatorių, 1 M natrio hidroksido tirpalu (4.8) nustatoma pH 6,5 vertė. Esant ne aukštesnei kaip 35 °C temperatūrai, sukamajame garintuve tirpalas nugarinamas maždaug iki pusės tūrio.

Praskiedžiama fosfatiniu buferiu (4.5) numatomai cinko bacitracino koncentracijai 0,42 T. V. /ml (= u_8) gauti.

6.1.3. Kiti pašarai

Pasveriama 10 g mėginio (20,0 g, jei numatoma cinko bacitracino koncentracija 5 mg/kg). Įpilama 24 ml mišinio (4.4), 1 ml natrio sulfido tirpalo (4.9) ir 10 minučių homogenizuojama. Įpilama 25 ml fosfatinio buferinio tirpalo (4.5), kratoma 15 minučių ir centrifuguojama. Paimama 20 ml centrifugato ir, naudojant pH-metrą arba violetinio bromkrezolio tirpalą (4.10) kaip indikatorių, 1 M natrio hidroksido tirpalu (4.8) nustatoma pH 6,5 vertė. Esant ne aukštesnei kaip 35 °C temperatūrai, sukamajame garintuve tirpalas nugarinamas maždaug iki 4 ml. Praskiedžiama fosfatiniu buferiu (4.5) numatomai cinko bacitracino koncentracijai 0,42 T. V./ml (= u_8) gauti.

6.2. *Bandomieji tirpalai*

Iš u_8 tirpalo nuosekliai skiedžiant (1:1) fosfatiniu buferiniu tirpalu (4.5) paruošiami tirpalai u_4 (numatomas kiekis 0,21 T. V./ml), u_2 (numatomas kiekis 0,105 T. V./ml) ir u_1 (numatomas kiekis: 0,0525 T. V./ml).

7. **Bandymų eiga**

7.1. *Sėjimas į bandymų terpę*

Į bandymo mitybinę terpę (4.2), esant maždaug 50 °C, pasėjama bakterijų suspensija (3.2). Atliekant išankstinius bandymus ant lėkštelių su terpe (4.2), nustatomas bakterijų suspensijos kiekis, reikalingas didžiausioms ir aiškiausioms inhibavimo zonoms gauti, esant įvairioms cinko bacitracino koncentracijos vertėms.

7.2. *Lėkštelių paruošimas*

Difuzija ant agaro atliekama lėkštelėse, naudojant keturių koncentracijų standartinius tirpalus (s_8, s_4, s_2 ir s_1) ir keturių koncentracijų bandymo tirpalus (u_8, u_4, u_2 ir u_1). Kiekvienoje lėkštelėje būtinai turi būti keturių koncentracijos verčių ekstrakto ir standartiniai tirpalai. Paimamos gana didelės lėkštelės, kad agaro terpėje galima būtų padaryti bent aštuonias 10-13 mm skersmens skyles, kurių centrai būtų nutolę ne mažiau kaip 30 mm. Bandymą galima atlikti lėkštelėse, padarytose iš stiklo plokštelės, iš viršaus padengtos 200 mm skersmens ir 20 mm aukščio aliuminio ar plastiko žiedu.

Į lėkšteles įpilama terpės (4.2), apsėtos kaip 7.1 punkte, kad susidarytų maždaug 2 mm storio sluoksnis (60 ml į 200 mm skersmens lėkštelę). Paliekama sutirštėti horizontalioje padėtyje, išgręžiamos skylės ir į jas įlašinami tiksliai išmatuoti bandomųjų ir standartinių tirpalų kiekių tūriai (0,10-0,15 ml į kiekvieną skylę, atsižvelgiant į skersmenį). Kiekvienos koncentracijos tirpalas panaudojamas bent keturis kartus, taigi darant kiekvieną nustatymą įvertinamos 32 inhibavimo zonos.

7.3. *Inkubavimas*

Lėkštelės inkubuojamos 16–18 valandų esant 30 ± 2 °C.

8. **Įvertinimas**

Inhibavimo zonų skersmuo išmatuojamas 0,1 mm tikslumu. Matavimų vidurkio vertės kiekvienai koncentracijos vertei pažymimos pusiau logaritminiame grafike, kuriame inhibavimo zonų skersmuo būtų pavaizduotas kaip koncentracijos logaritmo funkcija. Nubrėžiamos standartinį tirpalą ir ekstraktą atitinkančios tiesės, kaip parodyta žemiau esančiame pavyzdyje.

Taikant formulę, nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis mažiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SL):

$$\text{a)}\quad SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Taikant formulę nustatomas taškas, geriausiai atitinkantis didžiausią standartinio tirpalo koncentraciją (SH):

$$\text{b)}\quad SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Panašiai apskaičiuojami taškai, geriausiai atitinkantys mažiausią UL ir didžiausią UH koncentracijas ekstrakte, pakeisdami aukščiau pateiktose formulėse S_1, S_2, S_4 ir S_8 į U_1, U_2, U_4 ir U_8.

Apskaičiuotos SL ir SH vertės pažymimos tame pačiame grafike ir taškai sujungiami, taip gaunama geriausiai standartinį tirpalą atitinkanti tiesė. Panašiu būdu pažymimos UL ir UH vertės, kurių taškai taip pat sujungiami, gaunant geriausiai ekstraktą atitinkančią tiesę.

Jei nėra jokių trukdžių, tiesės turi būti lygiagrečios. Praktiniame darbe tiesės gali būti laikomos lygiagrečiomis, jei (SH — SL) ir (UH — UL) vertės ir jų vidutinė vertė skiriasi ne daugiau kaip 10 %.

Jei nustatoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, u_1 ir s_1 ar u_8 ir s_8 vertės gali būti atmestos, o SL, SH, UL ir UH apskaičiuojamos pagal alternatyvias formules, gaunant alternatyvias geriausiai atitinkančias tieses:

$$\text{a}')\quad SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{or} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{b}')\quad SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{or} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

ir panašiai skaičiuojamos UL ir UH vertės. Turi būti vykdomi tie patys lygiagretumo kriterijai. Galutinėje ataskaitoje turi būti nurodyta, kad rezultatas buvo apskaičiuojamas pagal tris koncentracijas.

Jei manoma, kad tiesės yra lygiagrečios, pagal vieną iš formulių apskaičiuojamas santykinio aktyvumo logaritmą (log A), atsižvelgiant į tai, ar lygiagretumui įvertinti buvo naudojamos trys ar keturios koncentracijos.

Keturios koncentracijos:

$$\text{c)}\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Trys koncentracijos:

$$\text{d)}\quad \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1\, s_1}$$

arba

$$\text{d ′)}\quad \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Mėginio ekstrakto aktyvumas = atitinkamo standarto aktyvumas × A

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Jei nustatoma, kad santykinis aktyvumas yra už 0,5-2,0 intervalo ribų, bandymas kartojamas, atitinkamai keičiant ekstrakto koncentracijos vertes arba, jei tai neįmanoma, standartinio tirpalo koncentracijos vertes. Kai santykinio aktyvumo neįmanoma gauti reikiamame intervale, visi gauti rezultatai turi būti laikomi tik apytikriais, ir tai turi būti nurodyta galutinėje ataskaitoje.

Kai manoma, kad tiesės nėra lygiagrečios, nustatymas pakartojamas. Jei lygiagretumas vis tiek nepasiekiamas, nustatymas laikomas nepatenkinamu.

Rezultatas išreiškiamas mg cinko bacitracino vienam kilogramui pašaro.

9. **Pakartojamumas**

Rezultatų skirtumas tarp dviejų lygiagrečių to paties mėginio matavimų, atliktų to paties analitiko, neturi viršyti:

— 2 mg/kg absoliučiąja verte, jei cinko bacitracino kiekis mažesnis arba lygus 10 mg/kg,

— 20 % didžiausios vertės, jei cinko bacitracino kiekis yra 10–25 mg/kg,

— 5 mg/kg absoliučiąja verte, jei cinko bacitracino kiekis 25–50 mg/kg,

— 10 % didžiausios vertės, jei cinko bacitracino kiekis yra didesnis kaip 50 mg/kg.

([1]) 1 mg pašarinio cinko bacitracino atitinka 42 tarptautinius vienetus (T. V.).
([a]) Galima taikyti kitus metodus, jei būtų nustatyta, kad gaunamos panašios bakterijų suspensijos.
([b]) Galima naudoti bet kurią prekyboje esančią mitybinę terpę, kuri turi panašią sudėtį ir duoda tuos pačius rezultatus.
([c]) Galima naudoti bet kurią prekyboje esančią mitybinę terpę, kuri turi panašią sudėtį ir duoda tuos pačius rezultatus.“