

วิธีการตรวจวิเคราะห์ ด้านจุลชีววิทยา

: โดยใช้ Petrifilm Yeast and Mold

Count Plate



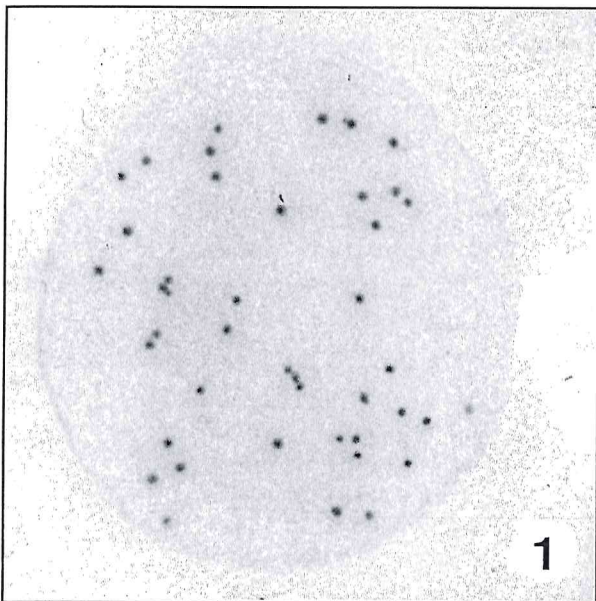
3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate

คู่มือการแปลผล

คู่มือฉบับนี้ใช้เป็นแนวทางในการแปลผลที่ได้จากแผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate (YM) สามารถสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมได้ที่ บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด

3M Petrifilm™ YM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน เจลที่ละลายได้ในน้ำเย็น และสีย้อมซึ่งช่วยให้การแยกแยะโคโลนีทำได้ชัดเจน และนับง่าย

การแยกแยะโคโลนีระหว่างยีสต์และราทำได้โดยดูลักษณะต่อไปนี้

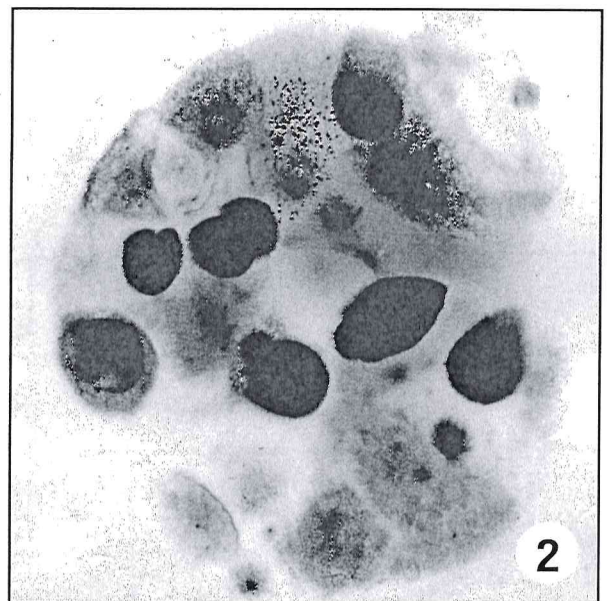


จำนวนยีสต์ = 43

รูปที่ 1 เป็นตัวอย่างโคโลนียีสต์ คือขนาดเล็ก ขอบเขตชัดเจน สีเขียวอมฟ้า

ยีสต์

- โคโลนีขนาดเล็ก มีขอบเขตชัดเจน
- บางโคโลนีอาจถูกฉีกขาดได้ โดยถูบนแผ่นฟิล์มด้านบน
- ส่วนใหญ่จะมีสีสม่ำเสมอเท่ากันทั้งโคโลนี
- สีของโคโลนีอาจมีหลายสี แตกต่างไปตามการสร้างเอนไซม์ฟอสฟาเทสของยีสต์แต่ละชนิด เช่น สีเขียวอมฟ้า หรือสีขาวขุ่นสีอ่อนอื่นๆ อาจได้แก่ ขาวเทา, ขาวเหลือง เป็นต้น



จำนวนรา = 29

รูปที่ 2 เป็นตัวอย่างโคโลนีของรา คือขนาดใหญ่ ขอบโคโลนีไม่ชัดเจน มีสีหลากหลายขึ้นอยู่กัชนิดของรา และมีจุดโฟกัสกึ่งกลางโคโลนี

รา

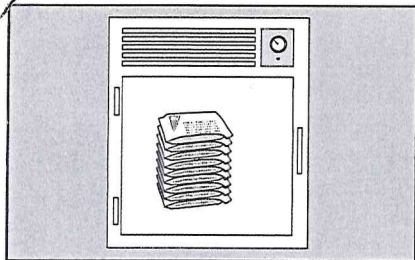
- โคโลนีขนาดใหญ่
- ขอบโคโลนีเป็นเส้นใย ไม่มีขอบเขตชัดเจน
- สีแตกต่างกันไปตามแตงควัสดุที่ราแต่ละชนิดสร้างขึ้น เช่น น้ำตาล เบจ ส้ม เขียวอมฟ้า
- โคโลนีแบนราบ
- มักมีจุดโฟกัสกึ่งกลางโคโลนี

วิธีใช้ 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate

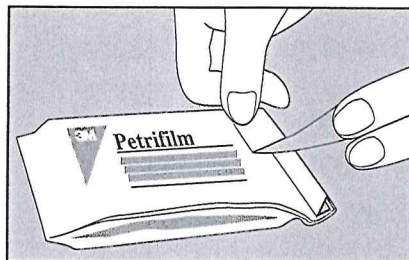
รายละเอียด คำเตือน การรับประกัน ขอบเขตการรับผิดชอบของ 3เอ็ม การเก็บรักษาและการกำจัด และข้อแนะนำในการใช้ ให้อ่านหนังสือที่แนบพร้อมผลิตภัณฑ์

วิธีใช้และการเก็บรักษา

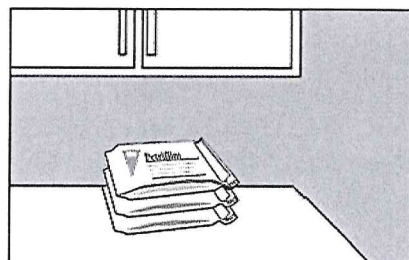
การเก็บรักษา



1 ช่องที่ยังไม่ได้เปิด ให้เก็บที่อุณหภูมิ $\leq 8^{\circ}\text{C}$ ($\leq 46^{\circ}\text{F}$) ใช้ให้หมดก่อนวันหมดอายุที่ระบุบนแผ่นหรือบรรจุภัณฑ์ ในกรณีที่มีบริเวณปฏิบัติการมีความชื้นสูง หลังนำช่องออกจากตู้เย็น ควรปล่อยให้อุณหภูมิขึ้นถึงอุณหภูมิห้องก่อนเปิดใช้

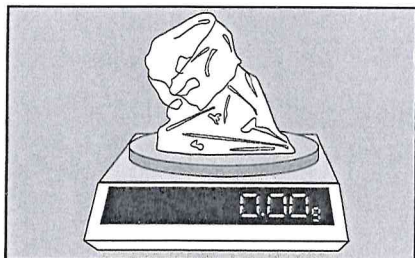


2 ช่องที่เปิดแล้วใช้ไม่หมด ให้พับปากช่องและปิดด้วยเทปกา

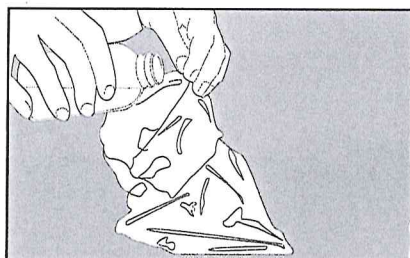


3 เพื่อป้องกันการสัมผัสความชื้น โดยหำนำช่องที่เปิดแล้วกลับไปใส่ตู้เย็นอีก ให้เก็บช่องที่เปิดใช้แล้วในที่เย็นและแห้ง (อุณหภูมิ $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ $\leq 50\%$) แล้วใช้ให้หมดภายใน 1 เดือนหลังเปิด

การเตรียมตัวอย่าง

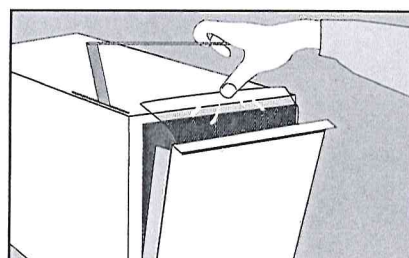


4 เตรียมตัวอย่างที่ต้องการตรวจเงา 1:10 หรือมากกว่า โดยชั่งหรือปิเปตอาหารใส่ภาชนะที่เหมาะสม เช่น Stomacher bag, Dilution bottle, Whirl-Pak bag หรือภาชนะปลอดเชื้ออื่นๆ



5 สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่าง ได้แก่ Butterfield's phosphate buffer (IDF phosphate buffer, KH_2PO_4 0.0425 g/L, adjust to pH 7.2), 0.1% Peptone water, Peptone salt diluent (ISO 6887-1), Buffered Peptone water (ISO 6887-1), Saline solution (0.85-0.90%), Bisulphate-free letheen broth, หรือน้ำกลั่น

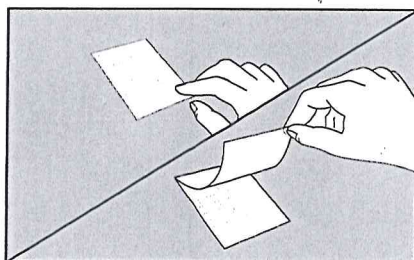
ห้ามใช้ บัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ citrate, bisulfite หรือ thiosulfate เพราะสารประกอบเหล่านี้จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ



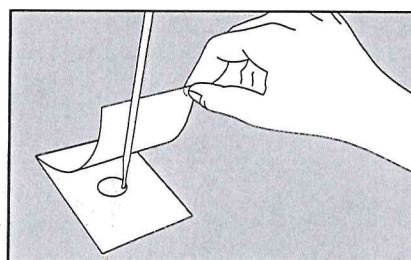
6 ผสมหรือปั่นตัวอย่างตามวิธีที่ปฏิบัติอยู่ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ไม่จำเป็นต้องปรับ pH ของตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ท่านสามารถใช้ตัวอย่างที่ผ่านการปรับ pH แล้วได้

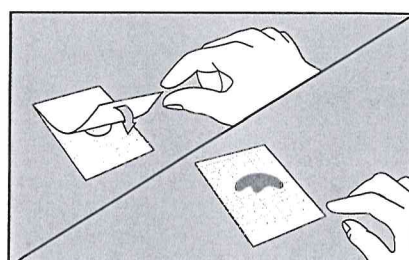
การถ่ายตัวอย่างลงแผ่น



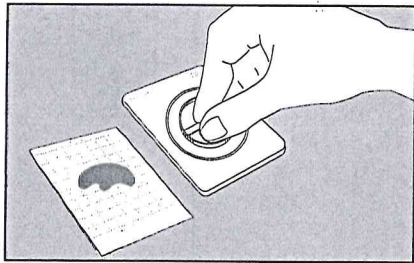
7 วางแผ่น 3M Petrifilm™ YM บนพื้นราบ เปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนขึ้น



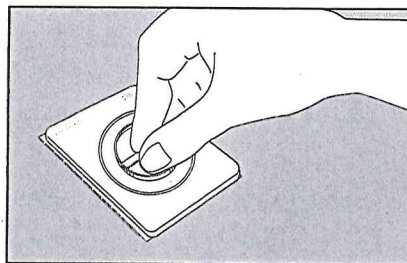
8 ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่าง 1 มล. ลงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง ให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่น 3M Petrifilm™ YM



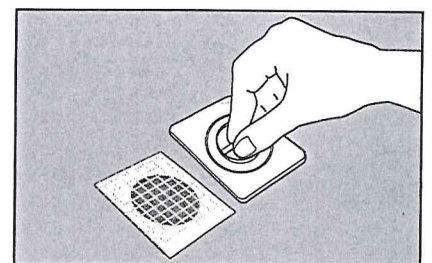
9 ค่อยๆ ปิดแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา อย่าปล่อยให้แผ่นฟิล์มตกลงมาเอง



10 วางตัวกด (spreader) ทาบลงบนแผ่น 3M Petrifilm™ YM

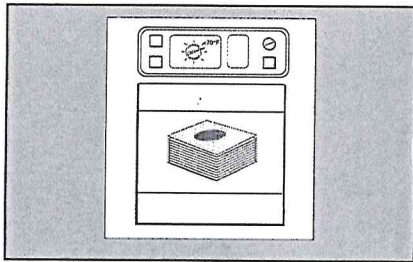


11 จับแกนกลางแผ่น spreader กดลงจนเห็นตัวอย่างกระจายทั่วบริเวณวงกลมขอบนอก อย่าบิดหรือเลื่อน spreader



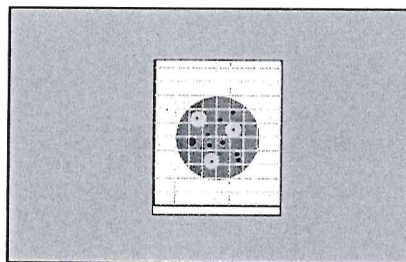
12 ยก spreader ขึ้น รอ 1-2 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว ก่อนเคลื่อนย้ายแผ่น 3M Petrifilm™ YM

การบ่มเชื้อ



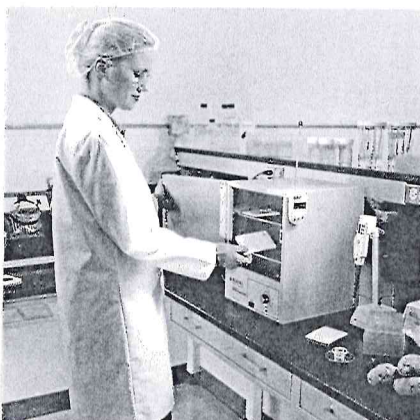
13 บ่มแผ่น 3M Petrifilm™ YM โดยให้ด้านใสหงายขึ้น สามารถซ้อนแผ่นได้ไม่เกิน 20 แผ่น ที่อุณหภูมิ 20-25 °C (70-77 °F) เป็นเวลา 3-5 วัน

การแปลผล

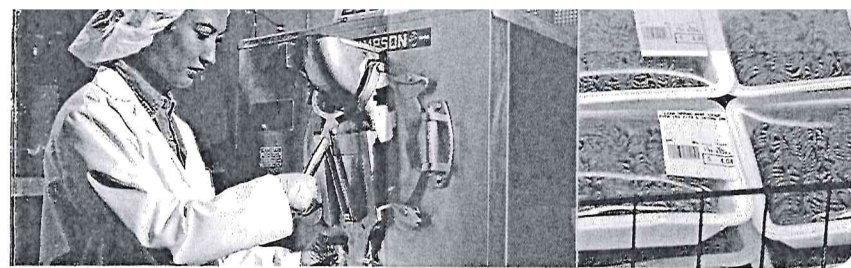


14 นับโคโลนี โดยอาจใช้เครื่องนับแบบมาตรฐาน หรือแว่นขยายที่มีไฟส่องแบบอื่น ๆ อ่านผลโดยดูคู่มือการแปลผลประกอบ

ราที่มีขนาดใหญ่หรือเจริญเติบโตเร็ว อาจบดบังผลเมื่ออ่านวันที่ 5 ในแผ่นที่มีจำนวนโคโลนีมาก ให้นับ ณ วันที่ 3 และบันทึกผลไว้ ถ้าในวันที่ 5 บนแผ่นมีจำนวนโคโลนีมากเกินไป ให้ใช้ผลของวันที่ 3 เป็นจำนวนโคโลนีโดยประมาณ

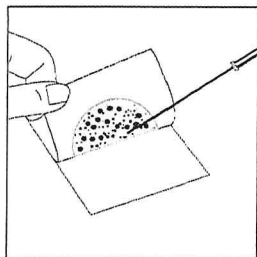


Technician
Productivity
Maximized



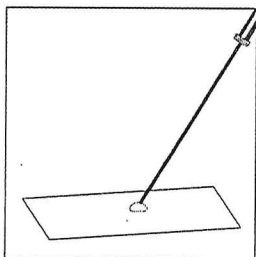
การยืนยันชนิดของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

ยีสต์และราที่มีสายพันธุ์หลากหลายและอาจไม่สามารถแยกแยะชนิดด้วยตาเปล่าได้ การตรวจสอบเพื่อแยกชนิดทำได้ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์



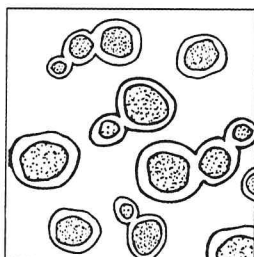
รูปที่ 11

นำโคโลนีในแผ่น 3M Petrifilm™ YM ไปตรวจวิเคราะห์ต่อได้ โดยเปิดแผ่นฟิล์มด้านบนขึ้น แล้วใช้เหล็กแหลมเขี่ยโคโลนี ที่ต้องการจากเนื้อเจล



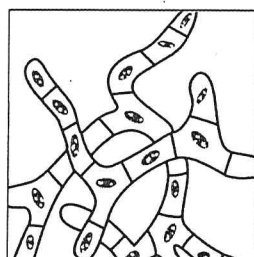
รูปที่ 12

จุ่มโคโลนีที่เขี่ยลงในหยดน้ำ กลั่นบนแผ่นสไลด์ ปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover slip) แล้วส่องดูภายใต้กำลังขยาย x40 หรือ x100 (ใช้หยดน้ำมันช่วย)



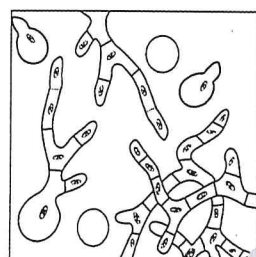
รูปที่ 13

ยีสต์มีรูปทรงวงรี บางส่วนอาจกำลังแตกหน่อ (budding)



รูปที่ 14

สำหรับราจะเห็นเป็นเส้นใย (ไมซีเลียม) แตกกิ่งก้านสาขา



รูปที่ 15

อาจเห็นราในหลายระยะของการเจริญเติบโต

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้บ่ม อ้างอิงตามวิธีที่ได้รับการรับรอง ได้แก่

- AOAC Official Method 997.02 : Yeast and Mold Counts in Foods.
บ่มที่อุณหภูมิ 20-25 °C เป็นเวลา 5 วัน
- Cananda
 - Environmental Sampling : Yeast and Mold Count Plates Method MFLP-41A
 - Food Products and Ingredients : Yeast and Mold Count Plates Method MFHPB-32

ข้อความและรูปภาพในแผ่นพับ
3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plate ฉบับนี้
สงวนลิขสิทธิ์ตามกฎหมาย

แผนกผลิตภัณฑ์จุลชีววิทยา
บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด
ชั้น 12 อาคารเสริมมิตรทาวเวอร์
159 ถนนอโศกมนตรี แขวงคลองเตยเหนือ
เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
โทรศัพท์ 0-2260-8577 ต่อ 1711
โทรสาร 0-2261-7535
www.3M.com

3M

Table 995.21B. Diluents and enzyme treatments for various foods^a

Food	Diluent	Enzyme
Flour/meal	Peptone	None
Black pepper	Peptone	None
Onion powder	Peptone	Papain
Garlic powder	Peptone	Papain
Soy beans	Peptone	None
Pinto beans	Peptone	None
Rice	Peptone	None
Coffee beans	Peptone	None
Cocoa beans	Peptone	None
Cream cheese	Peptone	Hemicellulase
Other cheeses	PT ^b	Papain
Sour cream	Peptone	Papain
Vegetable juices	Peptone	None
Fruit juices	Peptone	None
Raw tomato	Peptone	None
Frozen strawberries	Peptone	None
Fresh blackberries	Peptone	None
Fruit preserves	Peptone	None
Walnuts	Peptone	Papain
Peanuts	Peptone	Papain
Raw ground beef	PT	None
Summer sausage	PT	None
Roast beef	PT	None

^a Based on analysis of 1 mL 1:10 dilution. Foods tested at dilutions of 1:100 or higher do not usually need enzyme treatment. See Table 986.32 (see 17.2.05) for recommended enzyme treatments of foods not listed in this table.

^b Peptone-Tween 80 diluent, B(h).

solution, mix well, and incubate 20–30 min in water bath at 35°–37°C. Correct for additional dilution by filtering 1.2 mL enzyme-treated suspension homogenate.

Analysis

See Figures 986.32A and B (see 17.2.05) for filtration unit and filtration unit clamp.

Turn on vacuum source. Place sterile filtration unit on manifold or vacuum flask. Open clamp A. Rotate back funnel portion C. Aseptically place sterile filter, B(a), on surface of base D. Rotate funnel forward. Clamp shut by sliding jaws L of stainless steel clamp over entire length of flanges B that extend from both sides of funnel C and base D, and rotating moving arm K into horizontal (locked) position.

Aseptically add ca 15–20 mL sterile H₂O to funnel. Pipet 1.0 mL homogenate (1:10 dilution) or appropriate volume of enzyme-treated homogenate into funnel. Apply free end of vacuum tubing E to suction hole F to draw liquid through prefilter mesh G. Aseptically add additional 10–15 mL sterile H₂O to funnel and draw through mesh as before. Close clamp A to direct vacuum to base of filtration unit and draw liquid through filter.

Open clamp A. Rotate moving arm K of stainless steel clamp into unlocked (ca 45° angle) position and slide jaws L off flanges B. Rotate back funnel C.

Place filter on surface of predried YM-11 plate, B(i). Avoid trapping air bubbles between filter and agar. Incubate plates 50 ± 2 h at 25° ± 1°C.

Count all squares containing one or more colonies (positive squares). Colonies are usually some shade of blue. Examine filter using illuminated magnification as some colonies may be only pinpoint in size. To confirm that filter does not contain any positive squares, hold up Petri dish and examine “horizon” of filter for raised “bumps” or areas that reflect light differently. These may be either very small or very pale colonies. While hydrophobic lines act as barriers to spread of colonies, some fast-growing molds produce too much mycelium to remain completely confined within a single square (spreader). In case of spreader, only count the square of origin, which usually has the densest or tallest growth. Do not count squares into which colony has spread.

Count squares containing one or more colonies as described above. Convert total number of positive squares to MPN index as follows:

$$\text{MPN} = 1600 \log_e [1600/(1600 - x)]$$

where x = number of positive squares.

Multiply MPN by reciprocal of dilution factor, round to 2 significant figures, and report as yeast and mold count/g or mL.

Reference: *J. AOAC Int.* 79, 1069(1996).

17.2.09

AOAC Official Method 997.02 Yeast and Mold Counts in Foods

Dry Rehydratable Film Method (Petrifilm™ Method)

First Action 1997

Final Action 2000

(Applicable to enumeration of total yeasts and molds in foods.)

See Tables 997.02A and B for the results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

Method uses culture plates of dry medium supplemented with antibiotics, dye to enhance visualization of growth, and cold water-soluble gelling agent. Undiluted or diluted suspensions are added to plates at a rate of 1 mL/plate. Suspension is spread over ca 30 cm² growth area. Gelling agent is allowed to solidify, plates are incubated, and yeasts and molds are counted.

B. Apparatus and Reagent

(a) *Yeast and mold count plates*.—Contain nutrients supplemented with chlortetracycline, chloramphenicol, cold water-soluble gelling agent, and dye sensitive to presence of phosphatase (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) that enhances visualization of yeast and mold growth. Circular growth area of single plate contains thirty 1 × 1 cm squares outlined on film base. (Available as 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count plates from 3M Microbiology Products, 3M Center, Bldg. 275-5W-05, St. Paul, MN 55144-1000, USA.)

(b) *Plastic spreader*.—Provided with Petrifilm plates, designed to spread suspension evenly over plate growth area.

Table 997.02A. Interlaboratory study results for determination of mold count in foods by dry rehydratable film method

Product	Mold level	Method	Mean log ₁₀ colony count	s _r	s _R	RSD _r , %	RSD _R , %	r ^a	R ^b
Orange juice	Low	PYM ^c	2.50	0.13	0.17	5.05	6.93	0.36	0.49
		BAM ^d	2.50	0.33	0.38	13.23	15.17	0.94	1.07
	High	PYM	3.23	0.18	0.37	5.68	11.51	0.52	1.05
		BAM	3.21	0.12	0.36	3.66	11.10	0.33	1.01
Hot dog	Low	PYM	2.35	0.32	0.80	13.67	34.00	0.91	2.26
		BAM	2.20	0.08	0.98	3.44	44.69	0.21	2.78
	High	PYM	3.09	0.11	0.97	3.58	31.54	0.31	2.76
		BAM	3.06	0.19	0.98	6.18	31.89	0.54	2.76
Yogurt	Low	PYM	2.34	0.16	0.75	6.90	31.81	0.46	2.11
		BAM	2.15	0.11	0.92	5.18	42.68	0.31	2.59
	High	PYM	3.21	0.43	0.50	13.45	15.70	1.22	1.42
		BAM	3.00	0.17	0.92	5.50	30.49	0.47	2.59
Ketchup	Low	PYM	2.17	2.52	2.61	116.00	120.10	7.13	7.38
		BAM	1.90	0.27	0.67	13.93	35.08	0.75	1.88
	High	PYM	2.76	0.42	0.50	15.35	18.01	1.20	1.41
		BAM	2.78	0.18	0.80	6.32	30.50	0.50	2.40
Corn meal	Low	PYM	2.28	0.69	0.76	30.18	33.53	1.95	2.16
		BAM	2.29	0.39	0.63	17.13	27.56	1.11	1.78
	High	PYM	2.50	0.61	0.76	24.54	29.81	1.73	2.11
		BAM	2.54	0.51	0.64	20.01	25.10	1.44	1.80
Cake mix	Low	PYM	1.73	0.30	0.68	17.29	39.06	0.85	1.92
		BAM	1.57	0.52	0.82	33.35	52.29	1.48	2.31
	High	PYM	1.73	0.49	0.78	28.13	44.96	1.37	2.20
		BAM	1.71	0.31	0.77	18.26	45.01	0.88	2.18

^a $r = 2.8 \times s_r$

^b $R = 2.8 \times s_R$

^c PYM = Petrifilm yeast and mold count plate.

^d BAM = Method described in FDA *Bacteriological Analytical Manual*, 7th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA.

Table 997.02B. Interlaboratory study results for determination of yeast count in foods by dry rehydratable film method

Product	Yeast level	Method	Mean log ₁₀ colony count	s _r	s _R	RSD _r , %	RSD _R , %	r ^a	R ^b
Orange juice	Low	PYM ^c	1.72	0.48	0.77	28.05	44.98	1.36	2.18
		BAM ^d	1.72	0.51	0.82	29.41	47.81	1.43	2.33
	High	PYM	2.93	0.26	0.38	8.98	13.07	0.74	1.08
		BAM	2.95	0.15	0.36	5.20	12.32	0.43	1.03
Corn meal	Low	PYM	1.32	0.98	1.48	73.99	112.00	2.76	4.18
		BAM	1.49	0.81	1.45	54.00	96.88	2.28	4.09
	High	PYM	1.99	1.16	1.51	58.33	75.70	3.28	4.26
		BAM	2.27	1.08	1.32	47.85	58.15	3.07	3.73
Cake mix	Low	PYM	1.51	0.58	1.11	38.47	73.61	1.64	3.14
		BAM	1.23	0.75	1.18	61.10	96.59	2.12	3.35
	High	PYM	2.09	0.25	1.06	11.79	50.78	0.70	3.00
		BAM	2.07	0.40	1.14	19.25	55.01	1.13	3.22

^a $r = 2.8 \times s_r$

^b $R = 2.8 \times s_R$

^c PYM = Petrifilm yeast and mold count plate.

^d BAM = Method described in FDA *Bacteriological Analytical Manual*, 7th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA.

(c) *Pipets*.—Serological pipet or pipetting syringe accurately delivering 1.0 mL.

(d) *Colony counter*.—Standard apparatus, Quebec model preferred, or one providing equivalent magnification (1.5×) and visibility.

(e) *Blender*.—High speed mechanical blender rotating at 10 000–12 000 rpm, or stomacher.

(f) *Dilution water*.—Butterfield's phosphate-buffered dilution water. Place 34 g KH_2PO_4 into 1 L volumetric flask and dissolve in 500 mL H_2O . Adjust pH to 7.2 with 1M NaOH (40 g/L) and dilute to volume with H_2O . Autoclave 15 min at 121°C. Store stock solution in refrigerator. Prepare dilution blanks by pipetting 1.25 mL stock solution into 1 L volumetric flask and dilute to volume with H_2O . Dispense 90 or 99 ± 1 mL into bottles. Autoclave 15 min at 121°C.

C. General Instructions

Store unopened yeast and mold count plate foil pouches at ≤8°C. After opening, return unused plates to foil pouch. Seal pouch by folding and taping the open end. Store resealed foil pouch at ≤8°C in a dry place. Use plates within 1 month after opening. Exposure of yeast and mold count plates to temperatures >25°C and/or humidities >50% RH can affect performance of plates.

After use, plates contain viable yeast and/or mold cultures. Autoclave used plates 15 min at 121°C prior to discarding.

D. Preparation of Test Suspension

Aseptically prepare 1:10 or greater dilution of food product with dilution H_2O . Blend or stomach 2 min and plate. Prepare additional dilutions as required.

E. Analysis

Place yeast and mold count plate on flat surface. Lift top film, hold pipet perpendicular to plate, and carefully inoculate 1 mL test suspension onto center of film base. Place top film down onto inoculum.

Lift plastic spreader using circular handle. Align center of spreader with approximate center of plate. Distribute suspension evenly using gentle downward pressure on center of spreader. Do not slide spreader across film. Remove spreader and leave plate undisturbed 1 min to let gel solidify.

Place plates in incubator in horizontal position, clear side up, in stacks not exceeding 20 units. Incubate plates 5 days at 20°–25°C.

Count plates promptly after incubation period. Yeasts appear as green or off-white in color and form small defined colonies. Mold colonies are usually blue but may also assume their natural pigmentation (e.g., black, yellow, green). They tend to be larger and more diffuse than yeast colonies.

To calculate yeast and mold count, multiply total number of yeast and mold colonies/plate (or average number of colonies/plate, if counting duplicate plates of same dilution) by appropriate dilution factor. When counting colonies on duplicate plates of consecutive dilutions, calculate mean number of colonies for each dilution before determining average yeast and mold count.

Estimated counts can be made on plates with >150 colonies and should be reported as estimated counts. In making such counts, determine average count/1 cm² and multiply by 30 (circular growth area is ca 30 cm²).

High numbers of yeast colonies may cause the entire growth area to turn blue. High numbers of mold colonies may cause growth area to turn blue, black, yellow, etc. When this occurs, do not make estimated counts, but further dilute and plate test suspension to obtain more accurate count.

Reference: *J. AOAC Int.* **80**, 806(1997).

Revised: March 2002

17.2.10

AOAC Official Method 2002.11 Detection and Quantification of Yeasts and Molds in Foods

SimPlate Yeast and Mold–Color Indicator (Y&M–CI) Method First Action 2002 Final Action 2005

(Applicable to detection and quantification of yeasts and molds in chocolate, cake mix, spices, nut meats, dairy foods, red meats, poultry meats, seafoods, fermented meats, frozen corn dogs, cereal, pasta, egg products, flour, prepackaged fresh salad, frankfurters, vegetables, fruits, and fruit juice.)

Caution: Test portion dilutions and incubated SimPlate devices from food products could contain pathogenic fungi if the particular test portion was so contaminated. Use standard aseptic microbiological laboratory technique, including decontamination of any spills with disinfectant.

See Tables 2002.11A–C for the results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle

SimPlate Yeast and Mold–Color Indicator (Y&M–CI) method is used to detect and quantify yeast and mold populations. The Y&M–CI medium and food mixture is dispensed into a SimPlate device and incubated for a minimum of 56 h. The medium changes color in the presence of yeasts and molds. The yeast and mold count is determined by counting the wells with changed color and referring to Table 2002.11D.

B. Media and Reagents

(a) *Dehydrated Y&M–CI medium*.—Individually packaged single or multiple test format with supplement(s), available from BioControl Systems, Inc. (12822 SE 32nd St, Bellevue, WA 98005, USA; www.rapidmethods.com).

(b) *SimPlate devices*.—In packs of 20 (BioControl).

(c) *Peptone water diluent, 0.1% (used in BAM method)*.—Dissolve 1.0 g peptone in 1 L deionized water. Autoclave at 121°C for 15 min. Final pH is 7.0 ± 0.2.

(d) *Peptone salt solution (used in ISO method)*.—Use 1.0 g enzymatic digest of casein and 8.5 g sodium chloride. Suspend ingredients in 1 L deionized water. Autoclave at 121°C for 15 min. Final pH is 7.0 ± 0.2.

C. Apparatus

(a) *Incubator*.—Maintaining 25°C in dark environment.

(b) *Micropipetor*.—Accurately dispensing 0.1 and 1.0 mL.

(c) *Pipets*.—Glass or plastic sterile pipets, 1 mL with 0.01 mL graduations; and 10 mL with 0.1 mL graduations.

(d) *Stomacher/masticator*.—IUL Instruments (IUL, S.A., Torrent de l'Estadella 22, 08030 Barcelona, Spain; Tel: +34-93-274-0232; www.iul-inst.com), or equivalent, for macerating test portions.