

Project 101 6040

Niveaucontrole op de laboratoria van het COM

Projectleiding: ing. A.E.M. Vermunt

Rapport 91.12

Maart 1991

Invloed van de pH op het aantonen van
bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe
melk

ing. A.E.M. Vermunt

R. Bakker

P.J. Herben

ir H. Stegeman

Medewerkers: G. Loeffen, Th. Polman en H. Keukens

Goedgekeurd door: dr. F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten.

Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
sectorhoofden
projectleider
afdeling Microbiologie (8x)
afdeling Diergeneesmiddelen
programmabeheer en informatieverzorging (2x)
circulatie
bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Veehouderij en Zuivel (ir J.J. Bakker)
Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (W. Krijgsman)
Commissie van Advies van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne
(dr ir J.J. Stadhouders)
Melkcontrôlestation Noord Nederland
Melkcontrôlestation Oost Nederland
Melkcontrôlestation Zuid Nederland
Melkcontrôlestation West Nederland
Agralin

ABSTRACT

Invloed van de pH op het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk.

Influence of the pH on the detection of inhibitors in raw milk (in Dutch)

Report 91.12

Maart 1991

A.E.M. Vermunt, R. Bakker, P.J. Herben and H. Stegeman

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands.

The aim of this study was to determine whether the detection limits of some antimicrobial substances were improved by increasing the pH in the medium of the existing tube diffusion method. It appeared that, compared to pH 7.0, the detection limits of the antimicrobial substances neomycin, spiramycin, erythromycin and dapson was lowered at pH 8.0. Although the detection limits of penicillins and tetracyclines were higher, the increment was acceptable. Therefore the tube diffusion method at pH 8.0 is suitable to detect some antimicrobial substances of interest more sensitive.

Keywords: RIKILT, milk, inhibition, tube diffusion test,
Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis*

()

()

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 METHODEN EN MATERIALEN	7
2.1 Standaarden	7
2.2 Monstername praktijkmonsters rauwe melk	8
2.3 Toegepaste analysemethoden	8
2.4 Bacteriesuspensies	10
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	10
3.1 Invloed van de pH op de groei van <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	10
3.2 Invloed van diverse mediacomponenten	12
3.3 Invloed van de suspensie van <i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> bij pH 7.0	13
3.4 Detectiegrenzen bij pH 7.0, pH 8.0 en pH 8.3	17
3.5 Onderzoek praktijkmonsters	18
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	19
4.1 Biologische activiteit testsuspensie	19
4.2 pH instelling	19
4.3 Detectiegrenzen bacteriegroeiremmende stoffen	19
4.4 Onderzoek praktijkmonsters	19
LITERATUUR	20
BIJLAGEN	
1 BEREIDING VAN DE STANDAARDOPLOSSINGEN	
2 AANTONEN VAN BACTERIEGROEIREMMENDE STOFFEN BIJ pH 8.0	
ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED	

()

()

SAMENVATTING

Een hoeveelheid melk wordt toegevoegd aan een vaste voedingsbodem, waaraan sporen van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, broomcresolpurper en trimethoprim zijn toegevoegd. Normale groei van en zuurproduktie door het micro-organisme veroorzaakt een kleurverandering van de pH indicator van paars naar geel. De aanwezigheid in de melk van stoffen die remmend werken op de groei van het micro-organisme, hebben tot gevolg dat de kleur van de pH indicator paars blijft.

Nagegaan is of verhoging van de pH van de vaste voedingsbodem deze screeningsmethode gevoeliger maakt voor het opsporen van bacteriegroeiremmende stoffen welke een hogere activiteit vertonen in een basisch milieu.

Uit de gevonden resultaten blijkt, dat als de pH van het testmedium verhoogd wordt van pH 7.0 naar pH 8.0, dit de methode gevoeliger maakt voor het opsporen van bacteriegroeiremmende stoffen welke een hogere activiteit vertonen in een basisch milieu. In een aantal praktijkmonsters kon met behulp van deze methode een bacteriegroeiremmende werking worden aangetoond, welke na verder onderzoek veroorzaakt bleek te worden door Neomycine. De gevonden gehalten varieerden van 100 tot 1250 $\mu\text{g/ml}$.

()

()

1 INLEIDING

Er zijn diverse methoden voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk (1). Bij de melkcontrolestations wordt thans als screeningsmethode de zogenaamde buismethode gebruikt. De pH van het testmedium bij deze methode is 7.0.

Er wordt een hoeveelheid melk toegevoegd aan een vaste voedingsbodem, waaraan sporen van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, een pH indicator (broomcresolpurper) en trimethoprim zijn toegevoegd. Normale groei van en zuurproduktie door het micro-organisme veroorzaakt een kleurverandering van de pH indicator van paars naar geel. De aanwezigheid in de melk van stoffen die remmend werken op de groei van het micro-organisme, hebben tot gevolg dat de kleur van de pH indicator paars blijft. Bij deze pH kunnen een groot aantal antibiotica worden gedetecteerd; met name penicillines kunnen erg gevoelig worden aangetoond. Antibiotica die werkzaam zijn in een basisch milieu kunnen met deze methode niet of niet voldoende in lage concentraties worden aangetoond. Door nu een hogere pH voor het testmedium te kiezen is nagegaan of ook deze antibiotica in lagere concentraties kunnen worden opgespoord. Hiertoe is eerst een onderzoek gestart naar de invloed van de pH van het testmedium op de groei van het testorganisme. Vervolgens is onderzoek gedaan naar de detectiegrenzen van enkele antibiotica bij verschillende pH's. Verder is nagegaan wat de invloed is van de aard van de suspensies van het testorganisme (sporen versus vegetatieve cellen) op de detectiegrenzen en de testduur van de methode. Tenslotte zijn er enkele praktijkmonsters met behulp van deze methode gescreend op de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Standaarden

Ampicillin natrium	Sigma A-0168
Cephalosporin-C kalium	Sigma C-6266
Cloxacillin natrium (898 µg/mg)	Sigma C-939
Erythromycine (954 µg/mg)	Sigma E-6376
Kanamycin monosulfaat (782 µg kanamycin-base/mg)	Sigma K-1377

Neomycin sulfaat (682 neomycin-base/mg)	Sigma N-187
Spiramycine (862 $\mu\text{g}/\text{mg}$ oftewel 2758.4 units/mg)	Sigma S-9132
Streptomycin sulfaat (750 streptomycin-base/mg)	Sigma S-6501
Sulfamethazine	Sigma S-6256
Oxytetracycline-HCl (920 μg oxytetracycline-base/mg)	Sigma O-5875
4-4'Diaminodiphenylsulfon (Dapson)	Sigma D-2505
Penicillin-G kalium (1580 units penicillin-G-base/mg)	Sigma Pen-K
Benzylpenicillin kalium (1593 units/mg)	Gist Brocades

Zie voor de bereiding van de standaardoplossingen bijlage 1.

De standaardoplossingen werden na bereiding bij $0-5^{\circ}\text{C}$ bewaard. De standaardverduunningen in melk werden bewaard bij ca -25°C of dezelfde dag van bereiding getest.

2.2 Monsternamen praktijkmonsters rauwe melk

De monsters die onderzocht zijn, zijn afkomstig van MONED (Melkcontrolestation Oost-Nederland), tot de dag van verzending zijn de monsters bewaard bij -20°C . Deze monsters werden bij de gewone screening positief bevonden. Deze monsters gaven geen remmingszone, danwel een hele kleine remmingszone met de diskmethode, terwijl met de gangbare buismethode duidelijk groeiremming werd aangetoond. Tot de datum van onderzoek werden de monsters op het RIKILT bij -80°C bewaard.

In de monsters zijn de volgende bepalingen uitgevoerd:

2.3 Toegepaste analysemethoden

2.3.1 Screeningsmethoden

2.3.1.1 Screeningsmethode bacteriegroeiremmende stoffen met behulp van de buistest.

Zowel de standaarden als de praktijkmonsters zijn gescreend met de gewone en de gemodificeerde buismethode.

Het analysevoorschrift van de gangbare screeningsmethode voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen is opgenomen in de voorschrift-

tenbundel van het COM (2). In bijlage 2 is het analysevoorschrift opgenomen van de gemodificeerde buismethode waarbij de pH is veranderd (in dit voorschrift is pH 8.0 opgenomen).

2.3.1.2 Screeningsmethode bacteriegroeiremmende stoffen met behulp van de Nieuwe Nederlandse Niertest

(Intern analysevoorschrift nr. A 435)

Hiervan is gebruik gemaakt van het voorschrift zoals dat ook toegepast wordt bij het onderzoek van nieren van slachtdieren, alleen voor de monstervoorbereiding is een andere procedure gebruikt. Van de monsters is 100 µl op schijfjes opgebracht.

2.3.2 Identificatie methoden

2.3.2.1 Agargelhoogspanningselektroforese (Intern analysevoorschrift nr. A 471)

Hiervan is gebruik gemaakt van het voorschrift zoals dat ook toegepast wordt bij het onderzoek van nieren van slachtdieren, alleen voor de monstervoorbereiding is een andere procedure gebruikt. De monsters zijn rechtstreeks opgebracht en alleen bij pH 8 onderzocht.

2.3.2.2 Bacteriespectrum methode (RIKILT RSV A 0509)

Hierbij is gebruik gemaakt van het voorschrift zoals dat ook toegepast wordt bij onderzoek van diervoeders, alleen voor de monstervoorbereiding is een andere procedure gebruikt. De monsters zijn rechtstreeks opgebracht in cylindertjes in plaats van gaatjes. Dit houdt verband met de kleinere laagdikte van de voedingsbodem (6 ml medium in een petrischaal van 9 cm diameter).

2.3.2.3 HPLC-methode

De melk wordt verdund met een fysiologische zout-natriumazide-oplossing en aangezuurd met mierenzuur.

Het monster wordt gemengd, gedialyseerd in een CF-LC (continuous flow liquid chromatography) systeem tegen een heptaan sulfonzuur/fosfaatbuffer en geconcentreerd op een RP 8 kolom. De RP 8 kolom wordt gespoeld en vervolgens worden de componenten van de kolom geëluëerd, waarna de componenten gescheiden worden op een RP 18 kolom.

Na "post column" derivatisering met o-phthalaldehyd (OPA) worden de componenten gemeten met behulp van UV (340 nm) of fluorescentie (Ex = 345 nm), Em = 445 nm).

Deze in het kort beschreven methode is nog in ontwikkeling.

2.3.2.4 Diskmethode

Alle praktijkmonsters zijn gescreend met de gewone en een gemodificeerde diskmethode.

Het analysevoorschrift van de gangbare screeningsmethode voor het aantonen van bacteriegroeiremmende stoffen is opgenomen in de voorschriftenbundel van het COM (2). In de gemodificeerde diskmethode is de pH ingesteld op 8.0.

2.4 Bacteriesuspensies

Bacillus stearothermophilus var. calidolactis

Om de invloed van de bereidingsprocedure cq. samenstelling van de testsuspensies te kunnen onderzoeken zijn bij de vier melkcontrolestations testsuspensies aangevraagd. Tevens is gevraagd naar de bereidingsdatum, of de suspensie al dan niet gepasteuriseerd is, het kiemgetal, de bewaaromstandigheden en het entingspercentage van de suspensie.

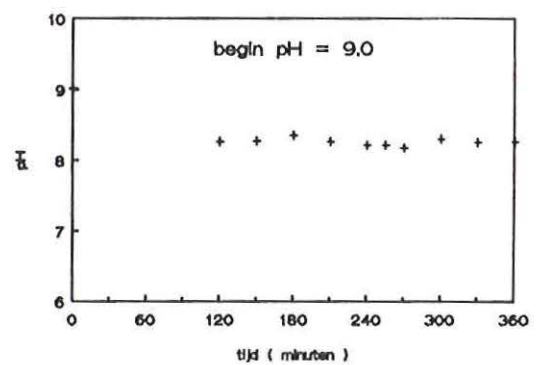
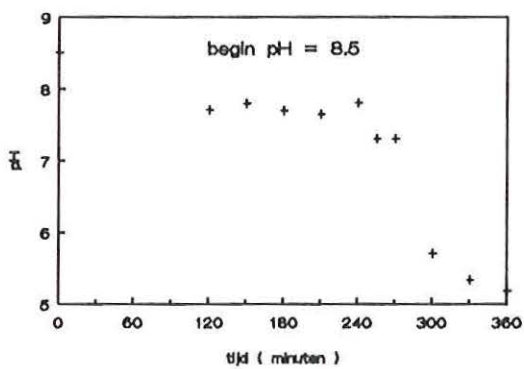
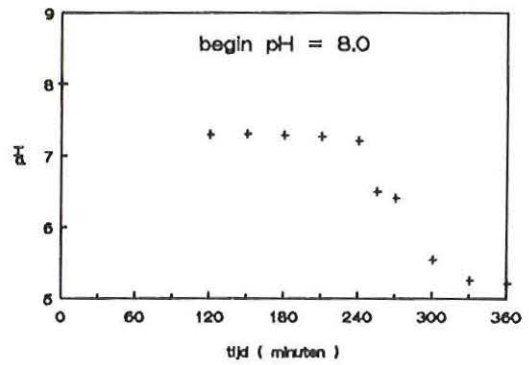
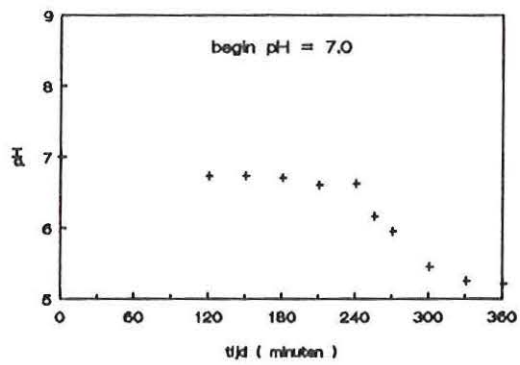
Van de suspensies is door het RIKILT nogmaals het kiemgetal bepaald volgens NEN 1507.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Invloed van de pH op de groei van *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*

Aangezien de test wordt uitgevoerd bij 63°C, wordt ook de pH van het testmedium ingesteld bij 63°C. Hierbij is gebruik gemaakt van een automatische temperatuurcorrigerende electrode (ATC-electrode) naast een pH electrode. Door bovengenoemde instelling is de gewenste pH tijdens de test het best benaderd.

In figuur 1 is de verandering in pH ten gevolge van de groei van het micro-organisme (*Bacillus stearothermophilus var. calidolactis*) in blanco melk weergegeven. Er is uitgegaan van 4 verschillende ingestelde begin pH's: 7.0, 8.0, 8.5 en 9.0. Voor iedere pH serie werden



Figuur 1: Verandering in pH ten gevolge van de groei van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* bij begin pH 7.0, 8.0, 8.5 en 9.0

15 buizen gemaakt. Na 120 minuten voordiffusie bij ca 20°C werd de melk afgegoten. Van een buis werd direkt de pH gemeten terwijl de andere buizen geïncubeerd werden bij 63°C. Om de 30 minuten werd een buis uit het waterbad gehaald en afgekoeld tot ca 20°C. Vervolgens werd de pH gemeten op het oppervlak van het gestold medium bij ca 20°C.

Uit grafiek 1 blijkt dat het micro-organisme goed kan groeien bij een pH 8.0 en 8.5. Bij een begin pH van 9.0 treedt geen groei, en daardoor ook geen zuurvorming op van het micro-organisme, waardoor de indicator niet ontkleurt. In eerste instantie is ervoor gekozen om bij begin pH 8.0 de detectiegrenzen voor diverse antibiotica te bepalen.

Melk reageert enigszins zuur, vandaar dat de pH ca 0.2-0.3 eenheden daalt na toevoeging van de melk.

Vandaar ook dat bij aanvang van de test de pH lager is dan de begin pH. Opmerkelijk is dat bij pH 8.0 en pH 8.5, in vergelijking met pH 7.0, de kleuromslag van de indicator van paars naar geel veel sneller verloopt. Dit betekent dat waakzaamheid geboden is tegen het einde van de test teneinde te voorkomen dat de monsters worden beoordeeld op het moment dat bij de blanco monsters reeds een kleuromslag is opgetreden.

3.2 Invloed van diverse mediacomponenten

Uit de zogenaamde sulfa plaatmethode pH 6 en 8 is gebleken dat bij een hogere pH het bacteriegroeiremmend effect van trimethoprim wordt vergroot. Het is daarom van belang de concentratie van trimethoprim zeker niet te verhogen. Trimethoprim wordt toegevoegd om de werking van de sulfa's te versterken.

Over de bewaartijd en bewaaromstandigheden van een trimethoprim-oplossing is weinig bekend. Bij proeven is gebleken dat een 10 maal geconcentreerde oplossing niet langer houdbaar is dan 2 weken bij 0-5°C. De activiteit loopt na twee weken iets terug, waardoor de totale testduur wordt verkort en de gevoeligheid mogelijk vermindert.

Para-aminobenzoëzuur reageert zuur vandaar dat de pH van het medium met para-aminobenzoëzuur ca 0.2 pH eenheden lager ligt dan van het medium zonder para-aminobenzoëzuur. Vandaar dat de pH van het medium na toevoeging van para-aminobenzoëzuur nogmaals ingesteld dient te worden op pH 8.0.

Interessant is nog te vermelden dat er gedurende de onderzoeksperiode op een gegeven moment problemen ontstonden met de detectiegrens van sulfa's en dapson: de gevoeligheid werd aanzienlijk verlaagd. Verandering van de batch Plate Count Agar (Difco 0479-01-1) bleek het probleem op te lossen.

3.3 Invloed van de suspensie van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* bij pH 7.0

In tabel 1 zijn de kenmerken van de testsuspensies, die op de diverse melkcontrolestations zijn opgevraagd, weergegeven.

Tabel 1: Kenmerken suspensies *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* van diverse melkcontrolestations

Melkcontrole- station	Pasteurisatie	Kiemgetal KVE per ml	Enting per 100 ml medium
Oost	Ja	3.8×10^6	2 ml
West	Nee	8.9×10^6	2 ml
Zuid	Nee	4.5×10^7	0.1 ml
Noord	Nee	2.0×10^7	0.8 ml
RIKILT	Ja	2.0×10^7	2 ml

Uit microscopisch onderzoek (fase-contrast), bleek dat er bij alle suspensies maar ca 10 à 20% sporen aanwezig waren en 80 à 90% vegetatieve cellen. Van alle sporensuspensies is het kiemgetal zowel voor als na pasteurisatie bepaald. Er bleek nauwelijks verschil tussen beide te zijn. Alleen de sporensuspensie van MCS Noord-Nederland gaf een halvering te zien van het kiemgetal na pasteurisatie. In deze suspensie waren voor pasteurisatie ook relatief veel beweeglijke bacteriën te zien.

Van de sporensuspensie van het RIKILT is direct na pasteurisatie

gedurende 2 maanden het kiemgetal bepaald. Het kiemgetal bleef stabiel.

Er is nagegaan wat de invloed is van de aard van de suspensie op de testduur. Hierbij zijn twee verschillende concentraties van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* toegepast. Eén concentratie betrof de concentratie zoals die op het melkcontrolestation wordt gebruikt omgerekend per 100 ml medium.

De andere concentratie betrof een concentratie zodanig dat de eindconcentratie 4×10^7 KVE per 100 ml medium bedroeg.

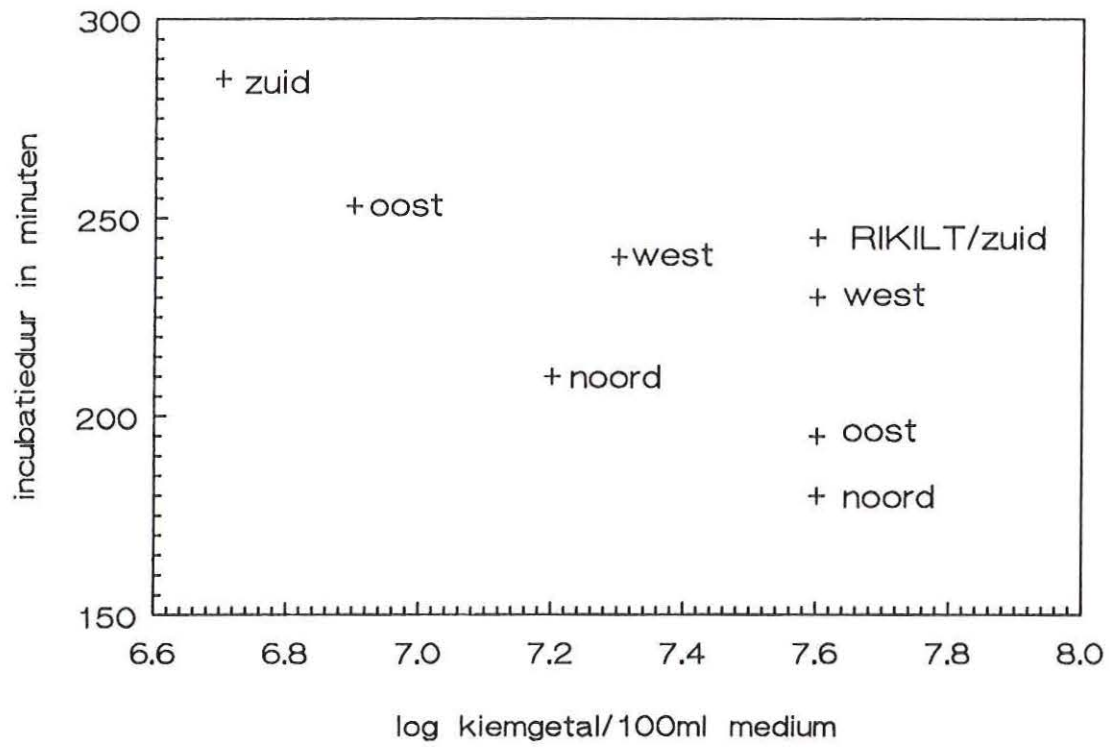
Deze concentratie zou bij gelijke biologische activiteit van de bacteriecellen eenzelfde testduur op moeten leveren. De resultaten zijn weergegeven in tabel 2 en figuur 2. De pH van het testmedium was ingesteld op 7.0.

De biologische activiteit van een bepaalde suspensie is heel stabiel. Uit eigen onderzoek bleek dat de testduur van dezelfde bacteriesuspensie over een periode van enkele maanden slechts een spreiding had van maximaal 5 minuten.

Tabel 2: Invloed van de aard van de bacteriesuspensie op de testduur

Lab	Toegevoegd aantal ml suspensie per 100 ml medium		Eindconcentratie <i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> 100 ml medium	Testduur 1)
RIKILT	2	ml	4×10^7	4 uur en 5 minuten
Oost	10,5	ml	4×10^7	3 uur en 15 minuten
West	4,5	ml	4×10^7	3 uur en 50 minuten
Zuid	0,89	ml	4×10^7	4 uur en 5 minuten
Noord	2	ml	4×10^7	3 uur
RIKILT	2	ml	4×10^7	4 uur en 5 minuten
Oost	2	ml	$7,6 \times 10^6$	4 uur en 13 minuten
West	2	ml	$1,8 \times 10^7$	4 uur
Zuid	0,1	ml	$4,5 \times 10^6$	4 uur en 45 minuten
Noord	0,8	ml	$1,6 \times 10^7$	3 uur en 30 minuten

1) Testduur: Dit is de tijd die nodig is om de de kleur van de blancomonsters van paars naar geel te doen omslaan.



Figuur 2 Invloed van het kiemgetal in het testmedium op de incubatieduur.

Uit tabel 2 blijkt dat de suspensies van M.C.S. Oost en Noord biologisch zeer actief zijn. Het is uit eerder onderzoek bewezen dat snelle groei en/of veel zuurproduktie en dus een korte testduur ten koste gaat van de aantoonbaarheid van groeiremmende stoffen. De motivering om de testduur op ca 4 uur te houden is van praktische aard. (Te korte testduur gaat ten koste van de gevoeligheid van de methode en te lange testduur is een praktisch probleem bij een 8-urige werkdag).

Er moet wel opgemerkt worden dat de test is uitgevoerd met volle U.H.T. melk vrij van bacteriegroeiremmende stoffen. Indien gewerkt wordt met rauwe melk vrij van bacteriegroeiremmende stoffen wat in feite de negatieve melkmonsters zijn, kan de kleuromslag iets sneller verlopen.

Of de korte testduur veroorzaakt wordt door een korte generatietijd, een grote zuurproduktie, een snelle start van de groei (korte lagfase) of een combinatie van deze drie, is niet uit deze experimenten af te leiden.

Vervolgens zijn experimenten uitgevoerd met blanco monsters, waarbij zowel het entingspercentage is gebruikt dat door de melkcontrolestations werd gehanteerd, als een standaardentingspercentage waarbij de eindconcentratie aan bacteriecellen en/of sporen 4.0×10^7 cellen per 100 ml medium bedroeg. Steeds is de incubatieduur bepaald, en is nagegaan of 0.003 IE Penicilline/ml, 0.001 IE Penicilline/ml en Dapsone 0.015 $\mu\text{g/ml}$ bepaald kon worden.

Dat het entingspercentage invloed heeft op de detectiegrenzen van Penicilline en Dapsone is af te lezen uit tabel 3.

Tabel 3 Invloed van concentratie van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* op de aantoonbaarheid van Penicilline en Dapsone.

Lab	Concentratie	Blanco	Penicilline				Dapsone	
	<i>B. stearothermophilus</i>		0.003	0.001			0.015	
	var. <i>calidolactis</i> /		IE/ml	IE/ml			µg/ml	
	100 ml medium							
RIKILT	4×10^7	- -	+	+	+	+	-	-
Oost	4×10^7	- -	-	-	-	-	±	±
Oost	7.6×10^6	- -	-	-	-	-	+	+
West	4×10^7	- -	+	+	-	-	+	+
West	1.8×10^7	- -	+	+	±	±	+	+
Zuid	4×10^7	- -	+	+	-	-	+	+
Zuid	4.5×10^6	- -	+	+	±	±	+	+
Noord	1.6×10^7	- -	-	-	-	-	±	±

+ = positief

± = zwak positief

- = negatief

Opgemerkt dient te worden dat de experimenten steeds exact volgens het COM-voorschrift zijn uitgevoerd. Dit kan mogelijke verschillen met de detectiegrenzen gevonden bij de melkcontrolestations verklaren.

3.4 Detectiegrenzen bij pH 7.0, pH 8.0 en pH 8.3

Nadat eerst de detectiegrenzen bij pH 7.0 en 8.0 zijn bepaald, is vervolgens nagegaan wat de detectiegrenzen voor dezelfde bacteriegroei-remmende stoffen zijn bij pH 8.3. De resultaten hiervan staan in tabel 4.

Tabel 4: Detectiegrenzen ($\mu\text{g/ml}$) van een aantal bacteriegroeiremmende stoffen bij verschillende pH's

ANTIBIOTICUM	ingestelde pH van het medium		
	pH 7.0	pH 8.0 *	pH 8.3 *
Streptomycine	1.8	0.3	0.8
Oxytetracycline	0.22	0.25	0.9
Benzylpenicilline (in IE)	0.002	0.003	0.005
Neomycine	8.0	0.05	0.09
Ampicilline	0.001	0.002	0.012
Cloxacilline	0.02	0.025	0.04
Spiramycine	>0.5	0.5	0.03
Dapsone	0.02	<0.0025	0.0002
Sulfamethazine	1.0	0.4	0.2
Kanamycine **	2.0	3.0	4-7.5
Erythromycine **	0.08	<0.02	0.02
Cephalosporin C **	2.0	<1.0	2.0

* De pH bovenaan de tabel is de pH ingesteld bij 63 °C in vloeibare toestand. De pH bij aanvang van de incubatie (na voorincubatie en afgieten van de melk) ligt ca. 0.3 pH eenheden lager.

** Deze waarde is slechts eenmaal bepaald.

3.5 Onderzoek praktijkmonsters.

Om na te gaan wat de resultaten van de gemodificeerde buismethode zijn voor praktijkmonsters, zijn een aantal monsters afkomstig van Melkcontrolestation Oost-Nederland (MONED) onderzocht. De resultaten hiervan staan in tabel 5.

Bij de bacteriespectrum zijn alleen de monsters 4 - 6 en 7 onderzocht, omdat deze bij de elektroforese de grootste activiteit vertoonden.

TABEL 5 RESULTATEN MONED-MONSTERS

Monster	Buismethode pH 7,0		Discmethode pH 7,0	Buismethode pH 8,3		Discmethode pH 8,0	NNNT ^C	Agarhoogspannings- electroforese ^D	bacteriespectrum	HPLC neomycine (µg/kg)
1	-	-	-	+	+	+zwak	-	+	no	180
2	-	-	-	+	+	-	-	+	no	130
3	-	-	-	-	+	-	-	+ ^E	no	< 100
4	+ ^A	+ ^A	+ ^B	+	+	+	-	+	zwak (ⁿ tetracycline) ^F	550
5	-	-	-	+	-	+zwak	-	+	no	280
6	-	-	-	-	+	-	-	+ ^E	-	< 100
7	+ ^A	+ ^A	+ ^B	+	+	+	-	+	ⁿ tetracycline ^F	1250
8	-	-	+ ^B zwak	+	+	-	-	+	no	220
9	-	-	-	+	+	-	-	+	no	140
10	-	-	-	+	+	-	-	+	no	< 100

- = geen groeiremming

+ = groeiremming

no = niet onderzocht

A Bevestiging: geen sulfa.

B Bevestiging: remming verdwijnt niet met geconcentreerde / verdunde penase.

C NNNT = Nieuwe Nederlandse Niertest. Gebruik gemaakt van B. subtilis BGA pH 7,0.D In de agargelhoogspanningselectroforese is gebruik gemaakt van B. subtilis BGA op pH 8,0.

E Monsternrs. 3 en 6 geven hetzelfde beeld, doch duidelijk een ander beeld dan de monsters 1-2-4-5-7-8-9-10 die ook weer eenzelfde beeld geven.

F Uit hoogspanningselectroforese blijkt dat waarschijnlijk behalve een tetracycline (gevonden in bacteriespectrum) nog een ander antibioticum aanwezig is.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

4.1 Biologische activiteit testsuspensie

Uit de experimenten is gebleken dat er bij eenzelfde concentratie bacteriecellen tijdens de test toch een verschil in testduur en gevoeligheid voor Penicilline en Dapsone optreedt. Daarom is het noodzakelijk dat voor een verdere standaardisatie van de methode op alle melkcontrolestations en het RIKILT dezelfde testsuspensie wordt gebruikt.

Een centrale bereiding van de testsuspensie zou te preferen zijn.

4.2 pH instelling

Uit het onderzoek is gebleken dat de pH het best ingesteld kan worden bij 63°C met gebruikmaking van een automatische temperatuurscorrecterende electrode (A.T.C-electrode). Door toevoeging van het melkmonster daalt de pH ca. 0.3 eenheden, maar blijft toch nog voldoende hoog om de "basische antibiotica" in lage(re) concentraties aan te tonen dan bij pH 7.0.

4.3 Detectiegrenzen bacteriegroeiremmende stoffen

Uit tabel 4 volgt dat voor een aantal antibiotica en chemotherapeutica de detectiegrens inderdaad verlaagd wordt als de pH van 7 naar 8 gebracht wordt (Streptomycine, Neomycine, Spiramycine, Dapsone, Sulfamethazine, Erythromycine en Cephalosporine). Als de pH nog verder verhoogd wordt, naar 8.3, dan wordt voor sommige antibiotica en chemotherapeutica de detectiegrens weer verhoogd en alleen voor Spiramycine, Dapsone en Sulfamethazine wordt de detectiegrens verlaagd. Daarom wordt voorgesteld de gemodificeerde buismethode uit te voeren bij begin pH 8.0.

4.4 Onderzoek praktijkmonsters

Uit tabel 5 volgt dat lage concentraties bacteriegroeiremmende stoffen die niet of nauwelijks meer positief gescreend worden met de traditionele methode (pH 7.0), nog wel positief gescreend worden bij pH 8.3. Uit een vervolg onderzoek met behulp van agargelhoogspan-

ningselectroforese bleek dat deze groeiremming met uitzondering van monster 3 en 6 veroorzaakt werd door Neomycine. Met behulp van HPLC zijn vervolgens de gehalten bepaald, welke goed overeenstemmen met het beeld verkregen door agargelhoogspanningselectroforese.

LITERATUUR

1 International Dairy Federation- Milk and milk products - Detection of inhibitors (reference, routine and confirmation methods). Bulletin of the International Dairy Federation E-Doc 431 1990.

2 Voorschriftenbundel COM: Voorschriften voor het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk. Centraal Orgaan voor Melkhygiëne, Postbus 74, 4200 AB Gorinchem.

BIJLAGE 1

Bereiding van de standaardoplossingen.

Ampicillin, Penicillin-G, Cloxacillin en Benzylpenicillin oplossen in gedemineraliseerd water.

Sulfamethazine, Dapson, en Kanamycine oplossen in 5 ml ethanol en aanvullen met gedemineraliseerd water (Kanamycine eventueel onder verwarmen of m.b.v. een ultra sonebad).

Spiramycin en Neomycin oplossen in 5 ml fosfaatbuffer pH 8.0 en aanvullen met gedemineraliseerd water.

Streptomycin oplossen in 5 ml tri-ethanolaminebuffer pH 8.0 en aanvullen met gedemineraliseerd water.

Oxytetracycline oplossen in 2 ml 0.1M HCl en aanvullen met gedemineraliseerd water.

Cephalosporin-C oplossen in fosfaatbuffer pH 6.0

Erythromycine oplossen in 5 ml methanol en aanvullen met fosfaatbuffer pH 8.0

AANTONEN VAN BACTERIEGROEI-REMMEDE STOFFEN BIJ pH 8.0

ONDERWERP EN TOEPASSINGS-GEBIED

Dit voorschrift beschrijft de bepaling van de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen in boerderijmelk ten behoeve van de uitbetaling aan de veehouders.

SCREENINGSMETHODE

1 ONDERWERP EN TOEPASSINGS-GEBIED

Deze methode beschrijft het aantonen van residuen van bacteriegroeiremmende stoffen in rauwe melk indien de concentraties hoger zijn dan in onderstaande tabel vermeld.

Aantoonbare concentraties van verschillende bacteriegroeiremmende stoffen.

	Gevoeligheid van de methode	
	Geheel negatief	Geheel positief
Streptomycine sulfaat	0.2	0.4
Benzylpenicilline *)	0.001	0.003
Ampicilline	0.0005	0.002
Cloxacilline	0.01	0.02
Oxytetracycline.HCL	0.2	0.4
Neomycinesulfaat	0.03	0.05
4,4-diaminodiphenylsulfon(DDS)	<0.0025	0.015
Sulfamethazine (Sulfamidine)	0.2	0.4
Spiramycine (1mg=2220 U)	0.4	0.6

*) Benzylpenicilline is uitgedrukt in IE/ml, alle andere preparaten in µg/ml.

2 DEFINITIE

De melk wordt geacht residuen van bacteriegroeiremmende stoffen te bevatten, indien de kleur van het medium niet verandert bij toepassing van de hier beschreven werkwijze.

3 BEGINSEL

Een hoeveelheid melk wordt toegevoegd aan een vaste voedingsbodem, waaraan sporen van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149, een pH indicator (broomcresolpurper) en trimethoprim zijn toegevoegd. Normale groei van en zuurproduktie door het micro-organisme veroorzaakt een kleurverandering van de pH indicator van paars naar geel. De aanwezigheid in de melk van stoffen die remmend werken op de groei van het micro-organisme, hebben tot gevolg dat de kleur van de pH indicator paars blijft.

4 MEDIA, REAGENTIA EN TESTORGANISME.

De bestanddelen van de media moeten geschikt zijn voor bacteriologisch onderzoek. Het gebruikte water moet in glas gedestilleerd zijn of gedemineraliseerd water zijn van ten minste gelijke zuiverheid. Het mag geen stoffen bevatten die remmend zijn voor micro-organismen.

4.1 Media

4.1.1 Basismedium *)

- Samenstelling

Gistextract	2.5 g
Trypton	5.0 g
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	1.0 g
Agar	10-15 g
Water	1000 ml

*) In de handel verkrijgbaar onder de naam Plate Count Agar.

- Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. De P.C.A. voor de proefcultuur (4.1.9.) hoeft niet gesteriliseerd te worden en kan na opkoken bij 100 °C en afkoeling tot 63 °C worden ingesteld op pH 8.0 ± 0.1 met NaOH 1 M. bij 63 °C. Indien men aan een nieuwe batch P.C.A. begint, moet eerst vastgesteld worden of met deze batch de juiste gevoeligheden bepaald kunnen worden. (zie batchcontrole bijlage A)

N.B. Van de P.C.A. voor de voorraadcultuur (4.1.7.2) wordt de pH van de oplossing zodanig ingesteld dat deze na sterilisatie 7.0 ± 0.2 bedraagt, gemeten bij 25 °C. Verdeel in hoeveelheden van 7 ml in cultuurbuizen, om schuine agars te maken, of in hoeveelheden van ten hoogste 1000 ml in flessen. Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 minuten bij 121 ± 1 °C.

4.1.2. Voedingsbodem voor het kweken van het testorganisme (4.1.7.1) *)

- Samenstelling

Vleesextract	3.0 g
Pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
Water	1000 ml

*) In de handel verkrijgbaar onder de naam Nutriënt Agar.

- Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie 7.4 ± 0.1 bedraagt bij 25 °C. Verdeel in hoeveelheden van 7 ml in cultuurbuizen en steriliseer gedurende 15 minuten bij

121 ± 1 °C. Laat in schuine stand stollen. Deze buizen zijn, in het donker bij een temperatuur van $0-5$ °C bewaard, gedurende 4 weken houdbaar.

4.1.3 Sporulatiemedium

- Samenstelling

Vleesextract	3.0 g
Pepton	5.0 g
Mangaansulfaat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	31.3 mg
Agar	15.0 g
Water	1000 ml

- Bereiding

Los de ingrediënten onder verwarming op in het water. Stel de pH van de oplossing zo in dat deze na sterilisatie 7.4 ± 0.1 bedraagt, gemeten bij 25 °C. Steriliseer het aldus bereide medium gedurende 15 minuten bij 121 ± 1 °C. Koel het medium af in een waterbad tot 45 ± 1 °C. Giet het afgekoelde medium uit in petrischalen met een diameter van ca. 14 cm in hoeveelheden van ca. 75 ml. Laat het medium stollen.

4.1.4 Trimethoprimoplossing

Trimethoprim	5 mg
Ethanol 96%	5 ml
Water	tot 100 ml

Los de trimethoprim op in ethanol, vul aan met water tot 100 ml en meng.

Deze trimethoprimoplossing is maximaal een week houdbaar bij 4 °C. Op dezelfde dag dat de oplossing gebruikt wordt, wordt met steriel demiwater een verdunning gemaakt van 1:10 zodat de uiteindelijke concentratie $5 \mu\text{g}$ per ml bedraagt. Deze verdunning dient steeds vers bereid te worden.

4.1.5 Broomcresolpurperoplossing

Broomcresolpurper	250 mg
Ethanol 96%	5 ml
Water	tot 100 ml

Los de broomcresolpurper op in ethanol, vul aan met water tot 100 ml en meng.

4.1.6 Zoutoplossing

Natriumchloride (NaCl)	8.5 g
Water	1000 ml

Los het zout op in het water en steriliseer de oplossing gedurende 20 minuten bij $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.1.7 Testorganisme

4.1.7.1 *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, stam C953 (Nizo collectie).

4.1.7.2 Maak een voorraadcultuur om het testorganisme te kunnen bewaren. Het testorganisme wordt gekweekt op een schuine agar met basismedium (4.1.1). Het oppervlak wordt, met een entoogje, geënt met het testorganisme. Bebroed aëroob gedurende 48 uur bij $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na bebroeding wordt de buis met een steriele rubber stop afgesloten. De zo verkregen voorraadcultuur kan ca. 3 maanden in een koelkast bij 5°C worden bewaard.

4.1.8 Sporesuspensie

4.1.8.1 Ent het tot sporulatie te brengen testorganisme (4.1.7.1) over in cultuurbuizen met schuingestolde voedingsbodem (4.1.2). Bebroed de beënte cultuurbuizen gedurende 24 uur bij $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- 4.1.8.2 Neem de cultuur op in 2 ml zoutoplossing (4.1.6) per cultuurbuis door het bacteriemateriaal met behulp van een steriele entnaald van de voedingsbodem af te halen en met de vloeistof te mengen.
- 4.1.8.3 Breng 1 ml van de bacteriesuspensie (4.1.8.2) op een petrischaal met sporulatiemedium (4.1.3). Spreid de suspensie met behulp van een Drigalsky spatel gelijkmatig over de voedingsbodem uit.
Ent op deze wijze een voldoende aantal petrischalen.
Verpak deze petrischalen in een plastic zak en bebroed ze gedurende 3 dagen bij $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 4.1.8.4 Breng na bebroeden (4.1.8.3) 5 ml zoutoplossing op iedere plaat en suspendeer het bacteriemateriaal in de vloeistof met behulp van een steriele Drigalsky spatel. Verzamel de suspensie in grote steriele centrifugebuizen (5.1.6) en controleer de suspensie met behulp van de microscoop (5.1.5) op reinheid en sporulatie.
- 4.1.8.5 Centrifugeer de suspensie gedurende 10 minuten bij 3000 tpm. Pipetteer de bovenstaande vloeistof af. Suspendeer het sediment opnieuw in ca. 10 ml zoutoplossing (4.1.6) en centrifugeer weer gedurende 10 minuten bij 3000 tpm. Pipetteer de bovenstaande vloeistof af.
Herhaal het wassen en centrifugerende van de suspensie totdat de bovenstaande vloeistof helder is. Suspendeer vervolgens het sediment in ca. 10 ml zoutoplossing (4.1.6).
- 4.1.8.6 Verhit de aldus verkregen suspensie gedurende 10 minuten in een waterbad bij $80 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Koel snel af onder stromend water en bewaar de sporesuspensie bij $0-5^{\circ}\text{C}$.
Verricht m.b.v. een telkamertje een grove telling en maak met zoutoplossing (4.1.6) een verdunning tot ca 10^7 .
Bepaal van deze gebruiksoptelling het kiemgetal. De aldus verkregen sporesuspensie is mits bewaard bij $0-5^{\circ}\text{C}$ een jaar houdbaar.

4.1.9 Bereiding van de proefcultuur

Voeg maximaal 24 uur voor gebruik aan 100 ml vloeibaar basismedium met een pH van 8.0 ± 0.1 (4.1.1) van ca. 63°C aseptisch toe:

2 ml verdunde trimethoprimoplossing (4.1.4)

2 ml broomcresolpurperoplossing (4.1.5)

2 ml sporensuspensie (4.1.8.6)

Meng en verdeel in buizen (5.2.3) in hoeveelheden van $1 \pm 0,05$ ml en laat stollen. Deze buizen zijn mits bewaard bij $2-8^{\circ}\text{C}$ 24 uur houdbaar.

4.2 Standaardoplossingen

4.2.1 Penicilline (Kalium-benzylpenicilline Gist Brocades)

(Deze wordt boven silicagel bij $0-5^{\circ}\text{C}$ bewaard).

4.2.1.1 Bereid als volgt een stock-oplossing. Laat vóór het afwegen de penicilline ten minste één uur bij kamertemperatuur staan. Bereid een oplossing van 100 ± 1 IE penicilline per ml door een hoeveelheid van ten minste 10 mg met bekende activiteit (uitgedrukt in IE/mg) af te wegen tot op 0,1 mg nauwkeurig en in een maatkolf op te lossen in steriel demiwater. Deze oplossing moet 100 IE/ml bevatten en is in het donker bewaard bij $0-5^{\circ}\text{C}$, maximaal 2 weken houdbaar.

Voorbeeld:

Een penicilinepreparaat met 1590 IE per mg. Om een oplossing van 100 IE/ml te verkrijgen kan $12.6 \pm 0,1$ mg worden afgewogen en opgelost tot 200 ml steriel demiwater. Immers $12.6 * 1590 = \pm 20000$ IE. Dit wordt met steriel demiwater aangevuld tot 200 ml zodat de eindconcentratie 100 IE per milliliter is.

4.2.1.2 Maak een verdunde oplossing van penicilline door 1 ml van de stock-oplossing (4.2.1.1) te verdunnen met steriel demiwater tot 100 ml. Deze oplossing bevat 1 IE/ml.

4.2.1.3 Maak een standaard controle oplossing die 0.0067 IE penicilline per ml bevat, door met een micropipet 0,67 ml van

de oplossing (4.2.1.2) aan te vullen tot 100 ml met volle melk (4.3) en te mengen.

N.B. Alle oplossingen behalve de stockoplossing (4.2.1.1) dienen vers bereid te worden.

4.2.2 Sulfonamiden standaarden

4.2.2.1 4,4'-Diaminodiphenylsulfon (Dapson) Sigma D-2505.

(Deze wordt boven silicagel bij 0-5 °C bewaard).

4.2.2.1.1 Laat voor het afwegen de Dapson ten minste één uur bij kamertemperatuur staan. Maak een stock-oplossing door $20 \pm 0,1$ mg dapson op te lossen in 10 ml 96% ethanol en aan te vullen tot 100 ml met steriel demiwater. Deze oplossing bevat 200 $\mu\text{g/ml}$, en is mits bewaard bij 0-5 °C 2 weken houdbaar.

4.2.2.1.2 Maak een verdunde oplossing van 2 $\mu\text{g/ml}$ dapson door 1 ml van de stock-oplossing (4.2.2.1.1) aan te vullen tot 100 ml met steriel demiwater.

4.2.2.1.3 Maak een standaard controle-oplossing van 0.02 $\mu\text{g/ml}$ door 1 ml van oplossing (4.2.2.1.2) aan te vullen tot 100 ml met volle melk (4.3).

N.B. Alle oplossingen behalve de stockoplossing (4.2.2.1.1) dienen vers bereid te worden.

4.2.2.2 Sulfamethazine standaard (Sulfa) Sigma S-6256

(Deze wordt boven silicagel bij 0-5 °C bewaard).

4.2.2.2.1 Laat voor het afwegen de Sulfa tenminste één uur bij kamertemperatuur staan. Maak een stockoplossing door 20 ± 0.1 mg sulfa op te lossen in 20 ml 96% ethanol en aan te vullen tot 200 ml met steriel demiwater. Deze oplossing bevat 100 $\mu\text{g/ml}$, en is mits bewaard bij 0-5 °C 2 weken houdbaar.

4.2.2.2.2 Maak een standaard controle-oplossing van 1 $\mu\text{g/ml}$ door 1 ml van de stock-oplossing aan te vullen tot 100 ml met volle melk (4.3).

N.B. Alle oplossingen behalve de stockoplossing (4.2.2.2.1) dienen vers bereid te worden.

4.3 Melk:

Steriele volle UHT melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen.

5 APPARATUUR EN GLASWERK

Gebruikelijke benodigdheden voor microbiologische laboratoria en in het bijzonder de onderstaande:

5.1 Apparatuur.

5.1.1 Broedstoven met geforceerde luchtcirculatie, waarin een temperatuur van 63 ± 1 °C kan worden gehandhaafd.

5.1.2 Waterbad met geforceerde circulatie waarin een temperatuur van 63 ± 0.5 °C kan worden gehandhaafd en een goede circulatie rondom iedere buis gegarandeerd kan worden na plaatsing van het rek met buizen in het waterbad.

5.1.3 Pipetteerapparaat voor het gelijktijdig pipetteren van hoeveelheden van 0.3 ml melk.

5.1.4 Apparaat voor het mengen van de monsters.

Het apparaat moet zodanig zijn geconstrueerd dat de afstand van het draaipunt tot het monster maximaal 40 cm bedraagt. Het apparaat moet zodanig worden ingesteld dat de monsters in 25 ± 5 sec tienmaal over een hoek van 180° vanuit vertikale stand worden gekanteld.

5.1.5 Microscoop met fasecontrast.

5.1.6 Centrifuge voor het centrifugeren bij 3000 tpm met bijbehorende grote steriele centrifugebuizen (volume 50 ml).

5.1.7 Rekken voor het plaatsen van buizen. Er moet voldoende circulatie rondom iedere buis plaats kunnen vinden.

5.2 Glaswerk

5.2.1 Petrischalen met een diameter van 9 en 14 cm.

5.2.2 Steriele Drigalsky spatels.

5.2.3 Rondbodembuizen, met een inwendige middellijn van ongeveer 17/18 mm, een lengte van 80 mm en voorzien van een gelijkvormige bodem.

6 WERKWIJZE

6.1 Meng de monsters op de dag van onderzoek door ze met het mengapparaat in 25 ± 5 sec. tienmaal vanuit de verticale stand over een hoek van 180° te kantelen.

Opmerking: Deze mengprocedure is alleen nodig wanneer de monsters niet reeds ten behoeve van andere onderzoeken op deze wijze zijn gemengd.

6.2 Voorspoelen van het pipetteerapparaat.

Spoel onmiddellijk voorafgaande aan het pipetteren de pipetten grondig door met leidingwater van drinkwaterkwaliteit. Herhaal het voorspoelen bij elke pipetteercyclus.

6.3 Breng van elk monster met het pipetteerapparaat (5.1.3) 0.3 ml over in een buis met proefcultuur (4.1.9). Laat deze buizen gedurende 1 uur bij kamertemperatuur staan (voordiffusie). Giet de bovenstaande vloeistof af. Bebroed vervolgens de buizen in een broedstoof (5.1.1) of een waterbad (5.1.2) totdat de paarse kleur van de buizen met controlemelk (4.3) gaat veranderen. Controleer daartoe, na ca. 3 1/2 uur incuberen, regelmatig de buizen. De test wordt gestopt als de buizen met controlemelk (4.3.) geel zijn.

N.B. Onderin de buis met controle melk kan dan nog een zeer weinig licht paars aanwezig zijn. De buizen worden uit het waterbad gehaald en beoordeeld nadat ze ca. 15 minuten bij kamertemperatuur hebben gestaan.

- 6.4 Voer de handeling in 6.3 ten minste in duplo uit met de standaardoplossingen van 0,0067 IE penicilline per ml (4.2.1.3), 0,02 μ g dapson per ml (4.2.2.1.3), 1 μ g sulfa per ml (4.2.2.2.2) en met controlemelk (4.3). Plaats de buizen met standaardoplossingen en controlemelk zo goed mogelijk verdeeld tussen de buizen met monsters melk.

7 INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

- 7.1 Een paarse kleur van het medium in de buis duidt op de aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen. De kleur van de buizen met controle-oplossingen penicilline, dapson en sulfa moeten paars blijven. De buizen met controlemelk moeten geel zijn verkleurd.
- 7.2 Een gele kleur van het medium in de buis duidt op de afwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.
- 7.3 Indien één van de controle-oplossingen niet aangetoond wordt, wordt de betreffende controle opnieuw ingezet met een vers bereide oplossing. Is de betreffende standaard dan nog negatief, dan zijn de resultaten van de gehele proef niet betrouwbaar. Men dient dan na te gaan waarom die standaard een negatief resultaat geeft. (sporensuspensie en/of glaswerk ect.)

BIJLAGE A

BATCHCONTROLE

Ter controle van een nieuwe batch "Plate Count Agar", wordt de kleuromslag van de controle-oplossing van penicilline, dapson, sulfa en de controlemelk vergeleken met die van de oude batch. Tevens wordt gecontroleerd of de testduur ook niet te veel verschilt van die van de oude batch. Indien dit niet overeenkomt dient men een andere batch te gebruiken.

Opgesteld door: Dr ir J.J. Stadhouders

ing. A. Vermunt

R. Bakker

P.J. Herben