Project 101.6040
Niveaucontrole op het kwaliteitsonderzoek van boerderijmelk; ten behoeve van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne
Projectleider: ing. A.E.M. Vermunt

Rapport 91.40 Augustus 1991

Onderzoek naar de bereiding en houdbaarheid van referentiemonsters voor de Fossomatic

ir. M.A.A.M. Naber
G.J.M. Loeffen
ing. A.E.M. Vermunt

Afdeling: Microbiologie

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
sectorhoofden
afdeling microbiologie (6x)
programmabeheer en informatieverzorging (2x)
circulatie
bibliotheek (3x)

EXTERN:
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding
Directie Veehouderij en Zuivel, ir. J.J. Bakker
Centraal Orgaan voor Melkhygiëne, L. Krijgsman
Commissie van advies van het Centraal Orgaan voor Melkhygiëne (13x)
Melkcontrolestation Noord Nederland
Melkcontrolestation Oost Nederland
Melkcontrolestation West Nederland
Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek Zuid Nederland
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Noord
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Zuid
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne West
Regionaal Orgaan voor Melkhygiëne Oost

ABSTRACT

Onderzoek naar de bereiding en houdbaarheid van referentiemonsters voor de Fossomatic.

Research on the production and conservation of reference-samples for Fossomatic.

Report 91.40 August 1991

ir. M.A.A.M. Naber
G.J.M. Loeffen
ing. A.E.M. Vermunt

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO).
P.O. BOX 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands.

29 figures, 8 references

In this report the results are presented of two studies on the influence of conservation and storage of raw milk in favour of the production of reference-samples for the calibration of Fossomatic-apparatus. A small investigation of the use of Fossomatic-standards as reference-samples was also carried out.
The first survey showed that the age of the milk is an important factor as concerned to the shelf-life. Fresh milk of individual cows gives better results than tankmilk of 24-36 hrs old.
Analysis of variance showed no difference between conservation with 0.1% potassiumdichromate and 0.1% bronopol.
The second survey shows that fresh milk of individual cows gives very good results in combination with a heat treatment (30 minutes, 63°C) and 0.1% potassiumdichromate. Analysis of variance of these samples showed that this method of conservation is significant better than conserving with 0.1% potassiumdichromate or 0.1% bronopol. The reference samples have a shelf-life of at least 2 months.
Fossomatic-standards however can not be used as reference samples.

Keywords: conservation, reference-samples, calibration, Fossomatic, potassiumdichromate.

INHOUD blz

ABSTRACT 1

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 7

2 MATERIALEN 8

3 METHODEN 9

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE PROEF 1 10
4.1 Kiemgetal 10
4.2 Celgetalbepaling met microscoop 11
4.3 Celgetalbepaling met Fossomatic 12
4.4 Z-waarde van de Fossomatic apparatuur 13

5 CONCLUSIES PROEF 1 14

6 RESULTATEN EN DISCUSSIE PROEF 2 15
6.1 Kiemgetal 15
6.2 Celgetalbepaling met microscoop 15
6.3 Celgetalbepaling met Fossomatic 16
6.4 Z-waarde van de Fossomatic apparatuur 17

7 CONCLUSIES PROEF 2 18

8 RESULTATEN FOSSOMATIC STANDARDS 19

9 EINDCONCLUSIE 19

10 LITERATUUR 20

BIJLAGE 1 T/M 19

SAMENVATTING

In dit rapport zijn de resultaten verwerkt van twee onderzoeken naar de invloed van conserveren en bewaren van rauwe melk ten behoeve van het bereiden van referentiemonsters voor het ijken van Fossomatic-apparatuur. Tevens is onderzocht of zogenaamde Fossomatic-standards als referentiemonster gebruikt kunnen worden.

Het eerste onderzoek toont aan dat de ouderdom van de melk een belangrijke factor is in de houdbaarheid van de monsters. Verse melk van individuele koeien geeft betere resultaten dan tankmelk van 24-36 uur oud. Variantie-analyse (betrouwbaarheidsinterval 95%) toonde geen significant verschil aan tussen conserveren met 0,1% kaliumdichromaat en 0,1% bronopol.

Het tweede onderzoek toont aan dat verse melk van individuele koeien zeer goede resultaten geeft in combinatie met een hittebehandeling (30 minuten, 63°C) en 0,1% kaliumdichromaat. Variantieanalyse van deze monsters toonde aan dat deze methode van conserveren significant beter was dan conserveren met 0,1% kaliumdichromaat of 0,1% bronopol. Deze referentiemonsters zijn minimaal twee maanden houdbaar.

Fossomatic standards kunnen niet als referentiemonsters gebruikt worden.

1 INLEIDING

Ten behoeve van de calibratie van Fossomatic-apparatuur die op de Melkcontrolestations aanwezig is, is onderzoek verricht naar conserveringsmethoden en houdbaarheid van referentiemonsters (10.1, 10.2). Calibratie van Fossomatic-apparatuur is nodig omdat deze apparatuur variabel instelbaar is en daardoor aangepast moet worden aan de referentiemethode (10.3). Met behulp van de microscopische celtelling wordt het celgetal bepaald van referentiemonsters melk waarmee de melkcontrolestations de Fossomatics kunnen instellen (zie ook COM 91/1003). Ten behoeve van de uniformiteit zouden deze monsters centraal (door het RIKILT-DLO) bereid moeten worden en zouden ze voor langere tijd houdbaar moeten zijn.

Gedurende het eerste onderzoek is getracht de invloed van de ouderdom van de melk aan te tonen en tot een vergelijk te komen van de twee conserveringsmiddelen bronopol en kaliumdichromaat. Uit eerdere onderzoeken en publikaties blijkt dat er goede resultaten geboekt werden met deze twee conserveermiddelen (10.4, 10.5). Uit onderzoek van de Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek Zuid-Nederland (1988) blijkt dat aanwezigheid van bronopol alleen of in combinatie met natriumazide een directe daling van het celgetal kan verhinderen. Uit onderzoek (niet gepubliceerd) van het RIKILT-DLO in maart 1988, waarbij door de melkcontrolestations MONED, West-Nederland en de Coöperatieve Vereniging voor Melkonderzoek Zuid-Nederland, met de Fossomatic gedurende ca 3 maanden het celgetal werd bepaald van monsters die geconserveerd waren met 0,2% kaliumdichromaat en monsters met 0,01% natriumazide en 0,02% bronopol, bleek dat geen duidelijk verschil te zien was tussen beide conserveringsmethoden. De in dit onderzoek gebruikte concentraties zijn mede gebaseerd op deze onderzoeken en publikaties (10.6, 10.7).

In de tweede proef werd voortgebouwd op de resultaten verkregen uit de eerste proef om tot een definitieve conserveringsmethode te komen die gebruikt kan worden om referentiemonsters te bereiden met een minimale houdbaarheid van 2 maanden. In beide proeven is tevens gekeken naar de zogenaamde Z-waarde. Dit is een belangrijk kwaliteits-criterium voor de referentiemonsters (10.8). Een achteruitgang in de kwaliteit toont zich vooral in een daling van de Z-waarde. De Z-waarde geeft de positie van de discriminator in termen van standaardafwijkingen t.o.v. de gemiddelde waarde. Een Z-waarde van 2 betekent dat 97,7 % van de oppervlakte onder de curve rechts van de discriminator gelegen is. Een Z-waarde van 1 komt overeen met 84,4 %. Als voor monsters een Z-waarde kleiner dan 2 2,2 wordt gevonden zijn ze niet geschikt om als referentiemonster te dienen.

2 MATERIALEN

2.1 Algemeen

Normale laboratorium-benodigdheden en het onderstaande in het bijzonder.

2.2 Tankmelk

De tankmelk werd betrokken van M.C.S. Oost-Nederland (MONED) te Zutphen. De melk was ongeveer 24-36 uur oud bij aankomst op het RIKILT-DLO.

2.3 Individuele koemelk

De koemelk werd betrokken van proefboerderij "De Ossekampen" te Wageningen. Deze melk was enkele uren oud bij aankomst op het RIKILT-DLO.

2.4 Fossomatic Standards

Referentiemonsters met vastgesteld celgetal werden betrokken van Foss GmbH (Hamburg, Duitsland). De conserveringsmethode van deze monsters bestaat uit een (onbekend) conserveermiddel met een (onbekende) hittebehandeling.

2.5 Bronopol oplossing (10%)

Bronopol	25 g
Gedemineraliseerd water	250 ml

2.6 Kaliumdichromaat oplossing (10%)

Kaliumdichromaat	25 g
Gedemineraliseerd water	250 ml

2.7 Fluorescentie microscoop

Zeiss standaard microscoop met fluorescentie condensor;
vergroting : 12½ * 40
lichtbron : hogedruk kwiklamp (HBO 50W)

2.8 Fossomatic 360

Foss Electric, Denemarken.

3 METHODEN

3.1 Proef 1

De precieze bereiding van de monsters en monstername-schema staan vermeld in bijlage 2.
Monster 1 t/m 5: tankmelk.
Monster 6 t/m 7: "Ossenkampen".
Van ieder monster zijn 3 behandelingen getest:
- ongeconserveerd
- geconserveerd met 0,1% bronopol
- geconserveerd met 0,1% kaliumdichromaat

3.2 Proef 2

De precieze bereiding van de monsters en monstername-schema staan vermeld in bijlage 3.
Het betrof uitsluitend verse mengmelk monsters van "de Ossekampen". Van ieder monster zijn 3 behandelingen getest:
- geconserveerd met 0,1% bronopol
- geconserveerd met 0,1% kaliumdichromaat
- geconserveerd met 0,1% kaliumdichromaat, gecombineerd met een hittebehandeling van 30 minuten bij 63 °C.

3.3 Fossomatic standards

De monsters werden in oktober 1990 via het RIKILT-DLO ter onderzoek aangeboden aan de melkcontrolestations. Gevraagd werd het celgetal te bepalen met de Fossomatic ingesteld op slope = 1,000 en bias = 0. Tevens werd gevraagd de Z-waarde van de monsters te vermelden.

3.4 Telling met microscoop

De bepaling van het celgetal met de microscoop vindt plaats volgens RIKILT-DLO voorschrift (zie bijlage 1).

3.5 Telling met Fossomatic

De bepaling van het celgetal met de Fossomatic vindt plaats volgens COM-voorschrift.

3.6 Kiemgetalbepaling

Het kiemgetal van de melk werd bepaald volgens RIKILT-DLO Standaard Voorschrift (RSV A 0016).

3.7 Verwerking van resultaten

Na ontvangst van de resultaten werden deze grafisch verwerkt (bijlage 4 t/m 19). Tevens vond statistische verwerking plaats (SPSS).

4 RESULTATEN EN DISCUSSIE PROEF 1

4.1 Kiemgetal van de gebruikte monsters melk

Het kiemgetal werd verschillende malen bepaald. In tabel 1 staan de waarden vermeld van dag 1 (ongeconserveerd) en dag 50 (geconserveerd).

Tabel 1: Kiemgetal (kve/ml) in monsters melk

Monster nummer	Her-komst	dag 1 ongecon-serveerd	dag 50 0,1% kaliumdichromaat	dag 50 0,1% bronopol
1	Moned	$5,8*10^7$	52	$3,8*10^4$
2	Moned	$1,8*10^6$	53	<1
3	Moned	$1,6*10^6$	$1,7*10^2$	$6,2*10^3$
4	Moned	$1,8*10^6$	27	<1
5	Moned	$2,0*10^6$	$1,3*10^2$	$3,0*10^3$
6	Osse-kampen	$1,4*10^4$	25	<1
7	Osse-kampen	$2,1*10^4$	12	<1

Door de conserverende werking van bronopol en kaliumdichromaat neemt het kiemgetal in de loop van de tijd af.
De kiemgetallen op dag 1 van de monsters 6 en 7 (individuele koemelk) zijn beduidend lager dan van de overige tankmelk-monsters. De (tankmelk)monsters met een hoog celgetal (>500.000 cellen/ml (1, 3 en 5), zie ook tabel 2) hebben na 50 dagen nog een relatief hoog kiemgetal.

4.2 Celgetalbepaling met microscoop

Het celgetal werd met de microscoop bepaald op dag 1 van de proef. Hiervoor werden ongeconserveerde monsters gebruikt. De resultaten worden vergeleken met de celgetallen zoals die door de melkcontrolestations bepaald zijn op dag 1 en staan vermeld in tabel 2. Het is niet mogelijk om het celgetal in met kaliumdichromaat geconserveerde monsters te bepalen door storing van de oranje kleur van kaliumdichromaat, hetgeen een geringere lichtintensiteit geeft.
De hoogte van het microscopisch celgetal komt goed overeen met het gemiddelde celgetal zoals dat bepaald is met de Fossomatic.
Alleen melkcontrolestation Noord zit aan de lage kant.

Tabel 2: Vergelijking microscopisch celgetal met celgetal melkcontrolestations (cellen/ml *1000) in monsters melk, geconserveerd met kaliumdichromaat.

monster-nummer	melkcontrolestation				gemid-deld	RIKILT
	West	Zuid	Oost	Noord		
1	540	562	580	469	538	530
2	389	415	426	372	401	410
3	1.004	1.077	1.111	997	1.047	1.080
4	279	282	288	255	276	290
5	726	800	791	701	755	780
6	304	298	307	284	298	300
7	821	864	883	791	840	850

4.3 Celgetalbepaling met Fossomatic

4.3.1 Algemeen

De meting van dag 13 van melkcontrolestation Zuid is mislukt.
Melkcontrolestation West heeft de eerste dag niet gemeten. Melkcontrolestation Noord had op dag 4, 6, 64 en 78 storing in de apparatuur en de meting van dag 8 is niet gedaan.

4.3.2 Monster 1 t/m 5 (bijlage 4 t/m 8)

Gedurende de eerste vijftien dagen zijn de celgetallen vrij stabiel en is er weinig of geen afname. Daarna is er over het algemeen een sterke afname van het celgetal. Dit is vooral zeer duidelijk voor de monsters met hoog celgetal (1, 3 en 5). Monster 2 en 4 lijken wat stabieler. Er zijn grote verschillen tussen de melkcontrolestations onderling; niet alleen in de grootte van het celgetal maar ook in de mate van afname in het verloop van de tijd (zie tabel 3). Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat de monsters niet allemaal op dezelfde temperatuur bewaard worden waardoor grote verschillen ontstaan in houdbaarheid; wat zich ondermeer uit in dalende celgetallen. In tabel 3 staan de richtingscoëfficiënten van de regressielijnen.

Tabel 3: Richtingscoëfficiënten van de regressielijnen

mon-ster-num-mer	0,1% bronopol				0,1% kaliumdichromaat			
	West	Zuid	Oost	Noord	West	Zuid	Oost	Noord
1	-2.30	-4.58	-4.26	-2.48	-2.37	-6.01	-4.42	-1.94
2	-0.37	-5.49	-1.94	-0.66	-0.35	-1.54	-1.01	-0.12
3	-0.97	-4.30	-2.01	0.20	-1.16	-3.72	-1.44	-0.47
4	-0.67	-1.58	-1.01	-0.52	-0.26	-0.91	-0.71	-0.12
5	-1.14	-3.92	-2.95	-1.18	-1.09	-4.56	-1.96	-0.41

Het verschil tussen de conserveringsmethoden onderling is moeilijk aan te geven. Variantie-analyse van de richtingscoëfficiënten toonde aan dat er voor de monsters 1 t/m 5 geen verschil aangetoond kan worden tussen de twee gebruikte conserveringsmethoden.

4.3.3 Monster 6 en 7 (bijlage 9 en 10)

Monster 6 vertoont de kleinste afname in celgetal waarbij het monster met kaliumdichromaat het meest stabiel is. Monster 7 vertoont wat meer variatie maar vergeleken met een tankmelk-monster (3 of 5) is de afname toch minder. Vergeleken met monster 1 t/m 5 (tankmelk) is bij beide conserveringsmethoden afname van het celgetal bij monster 6 en 7 (individuele koemelk) minder sterk. In tabel 4 staan de richtingscoëfficiënten van de lijnen van monster 6 en 7. Variantieanalyse van de resultaten leverde geen significant verschil tussen de twee conserveringsmethoden.

Tabel 4: Richtingscoëfficiënten regressielijnen monsters 6 & 7

monster-nummer	0,1% bronopol				0,1% kaliumdichromaat			
	West	Zuid	Oost	Noord	West	Zuid	Oost	Noord
6	-0.13	-0.88	-0.24	0.02	-0.35	-0.49	-0.27	-0.14
7	-0.08	-1.80	-0.81	0.07	-0.71	-1.52	-0.89	-0.50

Vergeleken met monster 1 t/m 5 zijn de richtingscoëfficiënten van monster 6 en 7 significant hoger.

4.4 Z-waarde van de Fossomatic apparatuur

Een Z-waarde van 2 betekent dat 97,7 % van de oppervlakte onder de curve rechts van de discriminator gelegen is. Een Z-waarde van 1 komt overeen met 84,4 %. Ongeconserveerde monsters zijn snel bedorven omdat het kiemgetal hoog is. De Z-waarde van deze monsters ligt dan ook onder de 2 (zie tabel 5). De Z-waarde van het ongeconserveerde monster 7 ligt boven de 2. Dit duidt op een redelijke kwaliteit van het monster. De geconserveerde monsters hebben allen in het begin een hoge Z-waarde, die naarmate de proef vorderde afnam. Variantie-analyse van de Z-waarden van bronopol en kaliumdichromaat na 92 dagen leverde voor monster 1 t/m 5 geen significant verschil tussen beide conserveringsmethoden op.
Bij de monsters 6 en 7 daalt de Z-waarde significant minder snel dan bij de monster 1 t/m 5.

Tabel 5: Z-waarden

nummer	ongeconserveerd		0,1% bronopol		0,1% kaliumdichromaat	
	dag 1	dag 4	dag 1	dag 92	dag 1	dag 92
1	1,9	1,8	2,8	1,9	2,8	2,2
2	1,6	1,4	2,8	2,5	2,8	2,3
3	1,9	1,7	2,9	2,5	2,9	2,4
4	1,6	1,9	2,4	2,6	2,7	2,1
5	1,7	1,6	2,8	2,3	2,7	2,3
6	1,9	1,9	2,9	2,7	2,8	2,5
7	2,4	2,1	2,8	2,6	2,7	2,5

5 CONCLUSIES PROEF 1

Monsters gemaakt van individuele koemelk zijn beter van kwaliteit dan monsters gemaakt van tankmelk. Niet alleen is het kiemgetal in het begin van de proef lager dan dat van tankmelk, ook de Z-waarde daalt minder sterk en het celgetal neemt minder snel af.

Proef 1 verschaft geen duidelijkheid over de methode van conserveren. De proefopzet van proef 2 is zodanig gekozen dat wellicht op basis van de nieuwe resultaten wel een verantwoorde keuze van een conserveringsmethode mogelijk is.

6 RESULTATEN EN DISCUSSIE PROEF 2

6.1 Kiemgetal van de gebruikte monsters melk

Het kiemgetal werd bepaald op dag 1 en op dag 20. In tabel 6 staan de waarden vermeld.

Tabel 6: Kiemgetal (kve/ml) van de monsters melk

nummer	onverhit			verhit	
	dag 1	dag 20		dag 1	dag 20
	niet geconser-veerd	0,1% bronopol	0,1% kalium-dichromaat	niet geconser-veerd	0,1% kalium-dichromaat
1	$1,5*10^5$	$1,0*10^3$	$1,0*10^2$	$5,8*10^3$	30
2	$7,7*10^4$	$5,0*10^2$	$1,9*10^2$	$5,9*10^3$	40
3	$3,8*10^4$	$7,0*10^2$	$1,3*10^2$	$7,8*10^3$	70
4	$2,3*10^4$	$1,0*10^3$	80	$9,1*10^3$	$1,0*10^2$
5	$1,6*10^4$	$1,3*10^3$	$1,8*10^2$	$7,6*10^3$	50

Het begin-kiemgetal (dag 1) is voor alle monsters zeer laag. Door de monsters te verhitten is er nog een extra reductie van het kiemgetal. Statistische vergelijking van de kiemgetallen toonde aan dat de conserverende werking van kaliumdichromaat bij de onverhitte monsters beter is dan voor bronopol. Het kiemgetal van de verhitte monsters met 0,1% kaliumdichromaat is op dag 20 nog iets lager (significant) dan dat van de onverhitte monsters die geconserveerd zijn met kalium-dichromaat.

6.2 Celgetalbepaling met microscoop

Het celgetal werd met de microscoop op de eerste dag van de proef bepaald in ongeconserveerde monsters; tijdens de proef werd het celgetal bepaald in monsters met bronopol als conserveermiddel (tabel 7). De celgetallen van de ongeconserveerde monsters komen goed overeen met de celgetallen zoals gevonden in de verhitte monsters met 0,1% kaliumdichromaat bepaald met de Fossomatic (bijlage 11 t/m 19).

Tabel 7: Vergelijking microscopisch celgetal (ongeconserveerde monsters) met celgetal melkcontrolestations (verhitte monsters melk, geconserveerd met 0,1% kaliumdichromaat). (cellen/ml * 1000)

Monster-nummer	Melkcontrolestations				gemiddeld	RIKILT
	West	Zuid	Oost	Noord		
1	1.101	1.228	1.282	1.143	1.189	1.178
2	817	878	911	836	861	855
3	635	705	706	640	672	695
4	441	493	487	453	469	439
5	266	303	293	272	284	303

6.3 Celgetalbepaling met Fossomatic

6.3.1 Onverhitte monsters (bijlage 11 t/m 16)

Het celgetal van de monsters die geconserveerd zijn met 0,1% bronopol loopt gedurende de proef terug waarbij er onderlinge verschillen zijn tussen de melkcontrolestations. Na ± 40 dagen zijn de monsters van MCS Zuid niet goed meer; dit kan duiden op slechte bewaarcondities van de monsters waarbij dit alleen effect heeft op de monsters geconserveerd met bronopol.
De monsters met 0,1% kaliumdichromaat vertonen ook een afname in celgetal. De melkcontrolestations onderling vertonen een geringere afwijking vergeleken met 0,1% bronopol (tabel 8).

Tabel 8: Richtingscoëfficiënten van de lijnen

mon-ster-num-mer	0,1% bronopol				0,1% kaliumdichromaat			
	West	Zuid	Oost	Noord	West	Zuid	Oost	Noord
1	-1.73	-9.37	-5.03	-1.10	-2.34	-3.98	-2.91	-1.86
2	-0.64	-6.83	-2.20	-1.07	-1.27	-2.66	-1.91	-1.30
3	-1.15	-4.89	-2.51	-1.00	-0.70	-1.99	-1.52	-0.93
4	-0.37	-2.92	-1.38	-0.34	-0.42	-1.24	-0.86	-0.47
5	-0.87	-2.04	-0.99	-0.69	-0.59	-0.74	-0.54	-0.41

Variantie-analyse toonde aan dat de richtingscoëfficiënten van de monsters geconserveerd met 0,1% kaliumdichromaat significant groter zijn wat duidt op een betere conservering.

6.3.2 Verhitte monsters (bijlage 17 t/m 19)

Het celgetal van deze monsters is zeer stabiel. De afname is zeer gering zowel bij de monsters met laag als hoog celgetal (tabel 9). Aan het einde van de proef (94 dagen) zijn de monsters nog zeer goed van celgetal-niveau.

Tabel 9: Richtingscoëfficiënten van de lijnen

Monsternummer	0,1% kaliumdichromaat + ½uur 63 °C			
	West	Zuid	Oost	Noord
1	-0.25	-1.42	-0.99	-0.53
2	-0.37	-0.86	-0.53	-0.11
3	-0.15	-0.59	-0.27	0.15
4	-0.19	-0.41	-0.32	-0.01
5	-0.22	-0.38	-0.16	-0.14

Variantie-analyse toonde aan dat deze conserveringsmethode significant beter is dan 0,1% bronopol of 0,1% kaliumdichromaat.

6.4 Z-waarde van de Fossomatic apparatuur

De resultaten van de Z-waarden zijn opmerkelijk (tabel 10). De Z-waarde van de bronopol monsters is na 94 dagen bewaren van de monsters gedaald tot onder 2; de kwaliteit is niet goed meer na 3 maanden. De Z-waarde van de monsters met 0,1% kaliumdichromaat is significant beter dan die van 0,1% bronopol; de Z-waarde daalt tot iets boven 2, de kwaliteit van de monsters is dan nog redelijk. De verhitte monsters met kaliumdichromaat hebben de beste (significant betere) Z-waarden. De Z-waarde daalt iets tijdens de proef maar is nog steeds zeer goed (> 2,2) na 3 maanden.

Tabel 10: Z-waarden

nummer	0,1% bronopol onverhit		0,1% kaliumdichromaat onverhit		0,1% kaliumdichromaat verhit	
	dag 1	dag 94	dag 1	dag 94	dag 1	dag 94
1	2,46	1,57	2,51	2,00	2,72	2,56
2	2,39	1,74	2,61	2,14	2,73	2,57
3	2,47	1,77	2,64	2,23	2,72	2,57
4	2,28	1,69	2,54	2,22	2,79	2,53
5	2,25	1,76	2,66	2,03	2,63	2,47

7 CONCLUSIES PROEF 2

Conservering met kaliumdichromaat gecombineerd met verhitting geeft de beste resultaten. De monsters zijn het langst stabiel.

Het kiemgetal is laag wat de houdbaarheid ten goede komt. De Z-waarde blijft hoog wat duidt op een goede kwaliteit van de monsters. Ten aanzien van de tijdsduur van de houdbaarheid kan opgemerkt worden dat een periode van minimaal 2 maanden mogelijk is. De monsters moeten dan goed gekoeld (0-2°C) bewaard worden.

8 RESULTATEN FOSSOMATIC STANDARDS

De resultaten van het celgetal en de Z-waarde staan respectievelijk vermeld in tabel 11 en 12.

Tabel 11: Celgetal Fossomatic Standards (cellen/ml *1000)

Nummer	Foss	Noord	Zuid	Oost	West	RIKILT
A	690	658	656	657	681	696
B	290	281	294	274	292	276
C	315	255	280	270	288	303

Voor de monsters werd door Foss een houdbaarheid opgegeven van 2 maanden. De analyses werden uitgevoerd op 3 monsters die 1 maand oud waren. De microscopische celtelling komt goed overeen met het opgegeven celgetal (Foss). Ook de melkcontrolestations vinden overeenkomstige celgetallen, hoewel soms wat aan de lage kant (monster C).
De Z-waarden (tabel 12) zijn vrij goed. Melkcontrolestation Noord vindt lage Z-waarden.

Tabel 12: Z-waarden

Nummer	Noord	Zuid	Oost	West
A	2,09	2,40	3,02	3,00
B	1,83	2,26	2,89	2,78
C	1,72	2,25	2,75	2,96

Hoewel de resultaten niet slecht zijn geven de melkcontrolestations unaniem het commentaar dat de monsters slecht van kwaliteit zijn! Uit de pulshoogte analyse blijkt namelijk dat de verdeling van de cellen in de monsters zeer slecht is. De verdeling is zeer vlak waardoor het discriminatielevel moeilijk of niet bepaald kan worden; de Z-waarden kunnen daardoor heel hoog of laag uitvallen. De monsters kunnen niet dienen als referentiemonster.

9 EINDCONCLUSIE

De beste referentiemonsters worden bereid van individuele koemelk die 6-10 uur oud is op het moment van conservering. De beste conserveringsmethode van de melk is de melk eerst te pasteuriseren (30 minuten, 63 °C) en vervolgens 0,1% kaliumdichromaat toe te voegen. De houdbaarheid van deze monsters is minimaal 2 maanden, mits bewaard bij 0-2°C.

10 LITERATUUR

10.1 Recommended methods for somatic cell counting in milk
IDF document 168, 1984

10.2 Operators instructions (type 15700), Fossomatic 360
A/S N Foss Electric
Augustus 1986

10.3 Naber M.A.A.M. en A.E.M. Vermunt
Kwaliteitsbewaking van de bepaling van het celgetal met behulp van Fossomatic-apparatuur.
RIKILT-DLO rapport 91.39

10.4 Grappin, R et R. Jeunet
Conditions d'utilisation des méthodes automatiques de dénombrement des cellules de lait: étalonnage et conservation des échantillons de lait
Le lait (549-550), 1975, p. 650-668

10.5 Heald et al
Prelimenary evaluation of the Fossomatic cell counter for analysis of individual cow samples in a central testing laboratory
Journal of food protection (40), 1977, p. 523

10.6 Lintner, T.J. et al
Preparation and use of somatic cell count samples (SCCS) for comparision of milk somatic cell counting methods
Journal of food protection (50), 1987, p. 132-135

10.7 Lintner, T.J. et al
Somatic cell reference samples for calibration of milk somatic cell counting methods
Journal of food protection (47), 1984, p. 694-696

10.8 Crombrugge van, J.
Bruikbaarheid van de Fossomatic 360 om het celgetal in de melk te bepalen
Revue de l'agriculture/Landbouwtijdschrift 1989, vol 42, nr 2, pag. 317-327

BEPALING VAN HET AANTAL SOMATISCHE CELLEN IN MELK MET BEHULP VAN EEN MICROSCOPISCHE TELLING.

1 Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de bepaling van het celgetal in referentiemonsters mengmelk met een microscopische methode.

2 Definities

Somatische cellen: deeltjes (leukocyten en epitheelcellen) met een minimale fluorescentie-intensiteit als gevolg van kleuring van het DNA in de celkernen.

Celgetal: het resultaat van een meting volgens de beschreven werkwijze uitgedrukt als het aantal somatische cellen per ml melk.

Referentiemonsters: geconserveerde monsters melk waaraan met behulp van de hierbij beschreven methode een celgetal wordt toegekend.

3 Principe en werking

Een hoeveelheid melk wordt gemengd met een bufferoplossing van ethidiumbromide. Het ethidiumbromide kan een complex vormen met het in de celkernen aanwezige DNA. Belichting van het dan ontstane fluorochroom brengt het in een aangeslagen toestand, welke bij terugval naar het oorspronkelijke energieniveau lichtenergie gaat uitzenden bij een karakteristieke golflengte. Het aantal oplichtende cellen wordt geteld met behulp van een fluorescentiemicroscoop.

4 Reagentia

4.1 Kleurstofoplossing

- Samenstelling

Ethidiumbromide*	2,5 g
Gedemineraliseerd water	1000 ml

* Ethidiumbromide is een mutagene stof; vermijd contactbesmetting en besmetting via de lucht.

- Bereiding

Los het ethidiumbromide onder verwarmen (40-60 °C) op.
Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, in een lichtdichte fles 2 maanden houdbaar.

4.2 Bufferoplossing

- Samenstelling

Kaliumhydroxyphtalaat	5,1 g
Kaliumhydroxide	1,375 g
Gedemineraliseerd water	1000 ml

- Bereiding
Los de ingrediënten op in het water.
Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, 2 maanden houdbaar.

4.3 Standaardoplossing

- Samenstelling

Kleurstofoplossing (4.1)	200 ml
Bufferoplossing (4.2)	800 ml
Triton-X-100 concentraat	10 ml

- Bereiding

Voeg de componenten samen.
Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, in een lichtdichte fles 2 maanden houdbaar.

4.4 Werkoplossing

- Samenstelling

Standaardoplossing	1 deel
Gedemineraliseerd water	9 delen

- Bereiding

Voeg de componenten samen.
Deze oplossing is, mits in de koelkast (0-5 °C) bewaard, 2 weken houdbaar.

5 Apparatuur en glaswerk

5.1 Cultuurbuizen van glas, lengte 80 mm, inhoud 12 ml.

5.2 Waterbad van 50 °C.

5.3 Micropipet van 1000 µl
Micropipet van 100 µl (verstelbaar)

5.4 Glaspreparaten

5.5 Föhn (facultatief)

5.6 Fluorescentie-microscoop

6 Werkwijze

Verhit de buizen met melk in een waterbad van 50 °C gedurende 5 minuten. Koel af tot (kamer)temperatuur en meng goed (10 * 180° keren). Voeg met een micro-pipet 1 ml melk en 1 ml werkoplossing samen (zowel de melk als de werkoplossing dienen op het moment van pipetteren op kamertemperatuur te zijn); meng goed en plaats terug in het waterbad gedurende 1 minuut. Markeer een gebied van 5 bij 20 mm op een objectglas of leg er millimeterpapier onder waarop hetzelfde gebied gemarkeerd is.
Pipeteer met een micro-pipet 0,01 ml van het afgekoelde mengsel en verdeel dit over het oppervlak van 5 bij 20 mm met de pipetpunt. Laat drogen aan de lucht of gebruik een föhn om dit te bespoedigen. Maak een duplo-preparaat. Tel vervolgens de cellen met behulp van een fluorescentie-microscoop.
Gebruik een vergroting van 500 (12½ * 40). De DNA-kernen van de cellen fluoresceren helder oranje/rood op een donkerrode achtergrond.
Er wordt geteld in zogenaamde banen. Eén baan is 5 mm lang (de breedte van het preparaat) en 0,3 mm breed (de doorsnede van het gezichtsveld van de microscoop). Alle cellen in zo'n baan worden geteld, door de axiaalknop langzaam te verdraaien. Er worden meerdere banen over de gehele lengte van het preparaat geteld, waarbij die banen zo goed mogelijk over het preparaat verdeeld zijn.
Om representatief te zijn moeten er minstens 400 cellen per preparaat worden geteld.
Het oorspronkelijke aantal cellen kan als volgt worden berekend:

$$\frac{\text{aantal getelde cellen}}{\text{aantal banen}} * 66\ 2/3 * 200 = \text{aantal cellen per 1 ml melk.}$$

factor 66 2/3: de oppervlakte van het totaal gemarkeerde gebied = 100/1½ = 66 2/3 maal de oppervlakte van 1 baan.
factor 200 : er is 0,005 ml melk op het objectglas gebracht.

De duplo's van de celtellingen worden gemiddeld en de aldus verkregen waarde voor het celgetal wordt aan het referentiemonster toegekend.

BIJLAGE 2

11-07-1990

Definitief proefschema voor onderzoek naar de invloed van conserveren van mengmelkmonsters op resultaat celgetal analyse.

Het RIKILT bereidt, uitgaande van mengmelk van MONED met leeftijd van 24-36 uur, 5 monsters (1 t/m 5) met uiteenlopende celgetallen (100.000 - 1.000.000 cellen/ml). Een gedeelte van de monsters wordt vervolgens geconserveerd, zodat 3 verschillende soorten monsters ontstaan:

A. Ongeconserveerd
B. Geconserveerd met 0,10 % Bronopol
C. Geconserveerd met 0,10 % Kaliumdichromaat.

De monsters worden uiteindelijk gecodeerd met **1A** t/m **5A**, **1B** t/m **5B** en **1C** t/m **5C**. Daarnaast zullen 2 monsters mengmelk worden meegestuurd die afkomstig zijn van de Ossenkampen. Deze monsters zijn vrijwel direct na het melken geconserveerd. Deze monsters zullen zijn gecodeerd met **6A**, **7A**, **6B**, **7B**, **6C**, **7C**.

Voor de ongeconserveerde monsters worden 4 series **1A** t/m **7A** afgevuld. Van deze monsters wordt 4 maal een celgetalanalyse uitgevoerd op respectievelijk dag 0, 1, 4 en 6 (zie resultatenformulier). Voor de geconserveerde monsters worden 15 series **1B** t/m **7B** en **1C** t/m **7C** afgevuld. Van deze monsters wordt 15 maal een celgetalanalyse uitgevoerd (zie resultatenformulier). De monsters worden met koelelementen naar de 4 melkcontrolestations verstuurd. Het RIKILT bepaalt het kiemgetal in de 4 ongeconserveerde monsters. Bovendien wordt het celgetal in de geconserveerde monsters microscopisch bepaald. In de geconserveerde monsters zal worden nagegaanin hoeverre microscopische celtelling mogelijk is.

Bij aankomst op het melkcontrolestation dienen de monsters direct bewaard te worden bij een temperatuur van 1 °C. De eerste analyse van het celgetal vindt plaats op de dag van binnenkomst van de monsters. De 2e analyse op de 1e dag na binnenkomst etc. Dit gaat door t/m de 8e analyse op de 15e dag. Hierna worden de monsters 3 keer om de week en vervolgens om de 2 weken geanalyseerd (zie resultaten formulier).
De exacte data van alle analyses zijn aangegeven op het resultatenfor-

mulier. Iedere analyse dient vanuit een nieuw buisje plaats te vinden en bovendien dient op het melkcontrolestation het onderzoek steeds op dezelfde Fossomatic, met slope = 1 en bias = 0, te worden uitgevoerd. Wij vragen U van ieder monster alle analyseresultaten en het gemiddelde resultaat in te sturen. Daarnaast verzoeken wij U het Fossomatic-rapport waarin de Z-waarde etc. zijn opgenomen en de instellingen van slope en bias mee te sturen.

NB.

U ontvangt in totaal 238 buizen:

Ongeconserveerde monsters (A):	4 * 7 =	28
Geconserveerde monsters (B) :	15 * 7 =	105
Geconserveerde monsters (C) :	15 * 7 =	105
TOTAAL		**238**

RESULTATEN FORMULIER INVLOED VAN CONSERVERING OP HET CELGETAL

GEMIDDELD CELGETAL *1000

			MONSTERNUMMER 1.		
nr.	dag	datum	.A	.B	.C
1	0	12/07/90			
2	1	13/07/90			
3	4	16/07/90			
4	6	18/07/90			
5	8	20/07/90	-		
6	11	23/07/90	-		
7	13	25/07/90	-		
8	15	27/07/90	-		
9	22	03/08/90	-		
10	29	10/08/90	-		
11	36	17/08/90	-		
12	50	31/08/90	-		
13	64	14/09/90	-		
14	78	28/09/90	-		
15	92	12/10/90	-		

OPMERKINGEN:

Volledig ingevulde formulieren insturen naar:

RIKILT
t.a.v. ing A.E.M Vermunt
Postbus 230
6700 AE Wageningen

Wageningen,
26-11-1990

Definitief proefschema voor de voortzetting van het onderzoek naar de invloed van conserveren van mengmelkmonsters op resultaat celgetal analyse.

Het RIKILT bereidt, uitgaande van verse mengmelk van proefboerderij "de Ossekampen", 5 monsters (1 t/m 5) met uiteenlopende celgetallen (100.000 - 1.000.000 cellen/ml). De monsters worden vrijwel direct na het melken zó geconserveerd, dat 3 verschillende soorten monsters ontstaan:

A. Geconserveerd met 0,10 % Bronopol
B. Geconserveerd met 0,10 % Kaliumdichromaat
C. Geconserveerd met 0,10 % Kaliumdichromaat, gecombineerd met een hittebehandeling (30 minuten 63 °C).

De monsters worden uiteindelijk gecodeerd met **1A** t/m **5A**, **1B** t/m **5B** en **1C** t/m **5C** waarvan 16 series worden afgevuld. Van deze monsters wordt 16 maal een celgetalanalyse uitgevoerd (zie resultatenformulier). De monsters worden gekoeld verpakt en op 26 november aan de lableiders, die op de contactdag op het RIKILT aanwezig zijn, meegegeven. Het RIKILT zal het kiemgetal bepalen in ongeconserveerde monsters. Bovendien wordt het celgetal in de geconserveerde monsters microscopisch bepaald.

Bij aankomst op het melkcontrolestation dienen de monsters direct bewaard te worden bij een temperatuur van 1 °C. De eerste analyse van het celgetal vindt plaats op dag 1. De 2e analyse op de 3e dag etc. Dit gaat door t/m de 4e analyse op de 10e dag. Hierna worden de monsters elke week geanalyseerd.
De exacte data van alle analyses zijn aangegeven op het resultatenformulier. Iedere analyse dient vanuit een nieuw buisje plaats te vinden en bovendien dient op het melkcontrolestation het onderzoek steeds op dezelfde Fossomatic, met slope = 1 en bias = 0, te worden uitgevoerd.
Wij vragen U van ieder monster het gemiddelde resultaat in te sturen. Daarnaast verzoeken wij U het Fossomatic-rapport waarin de Z-waarde

etc. zijn opgenomen en de instellingen van slope en bias mee te sturen.
Voor eventuele vragen kunt U contact opnemen met Dhr Loeffen (08370-75518) of Dhr Naber (08370-75516).

NB.

U ontvangt in totaal 240 buizen:

Geconserveerde monsters (A) :	16 * 5 =	80
Geconserveerde monsters (B) :	16 * 5 =	80
Geconserveerde monsters (C) :	16 * 5 =	80
TOTAAL		**240**

RESULTATEN FORMULIER INVLOED VAN CONSERVERING OP HET CELGETAL

GEMIDDELD CELGETAL *1000

			MONSTERNUMMER 1.		
nr.	dag	datum	.A	.B	.C
1	1	27/11/90			
2	3	29/11/90			
3	7	3/12/90			
4	10	6/12/90			
5	17	13/12/90			
6	24	20/12/90			
7	31	27/12/90			
8	38	3/01/91			
9	45	10/01/91			
10	52	17/01/91			
11	59	24/01/91			
12	66	31/01/91			
13	73	7/02/91			
14	80	14/02/91			
15	87	21/02/91			
16	94	28/02/91			

OPMERKINGEN:

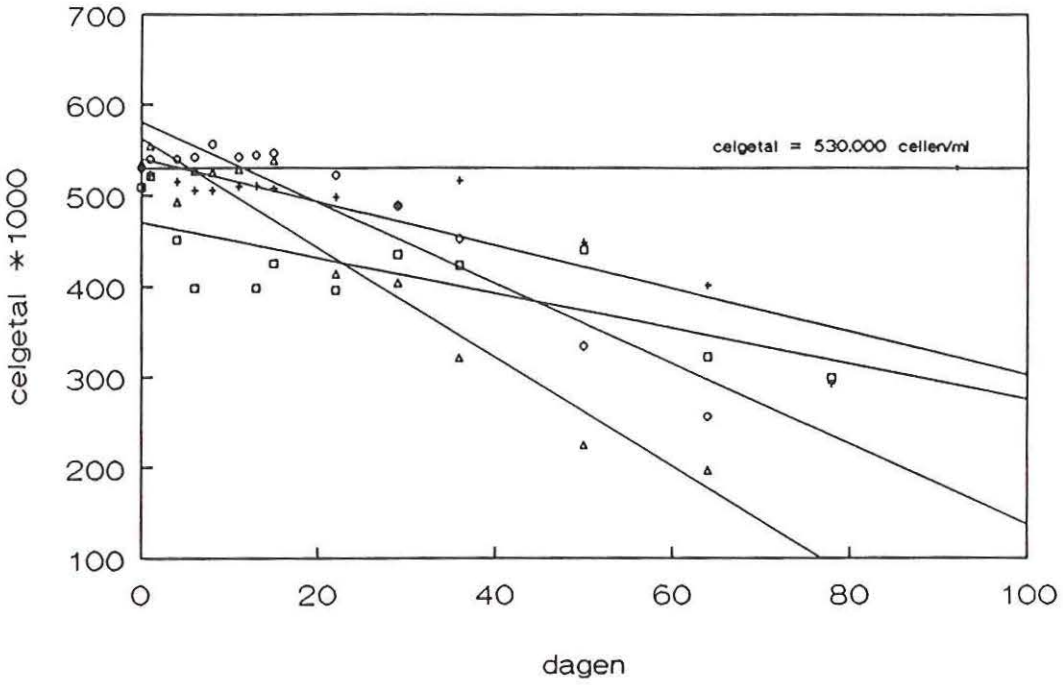
Volledig ingevulde formulieren insturen naar:

RIKILT
t.a.v. ing A.E.M Vermunt
Postbus 230
6700 AE Wageningen

monster 1 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

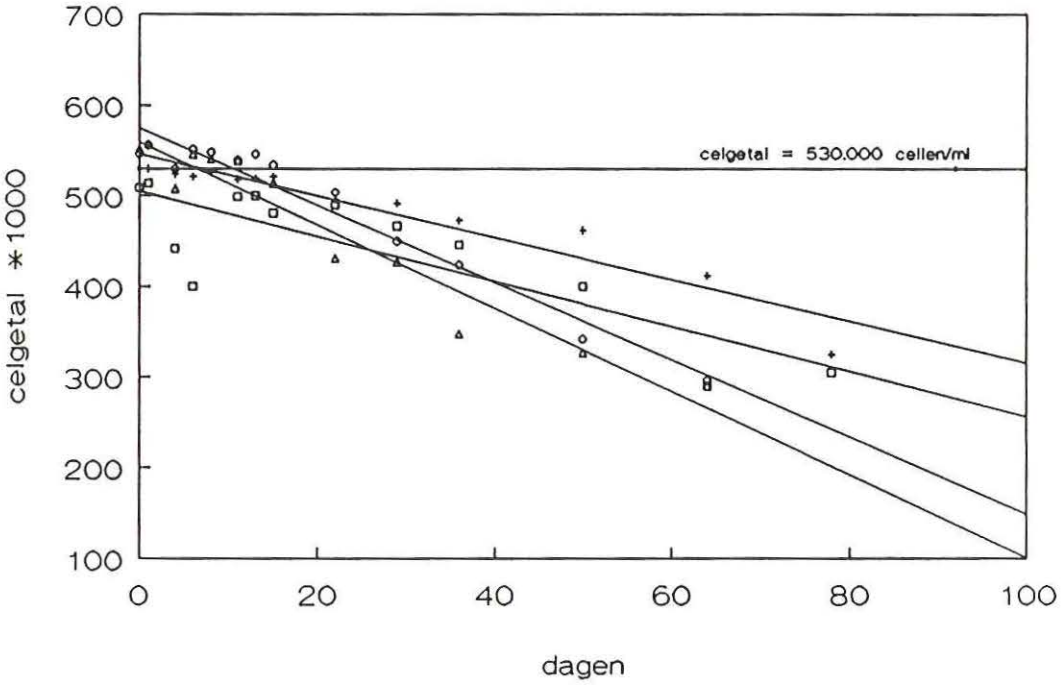
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 1 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

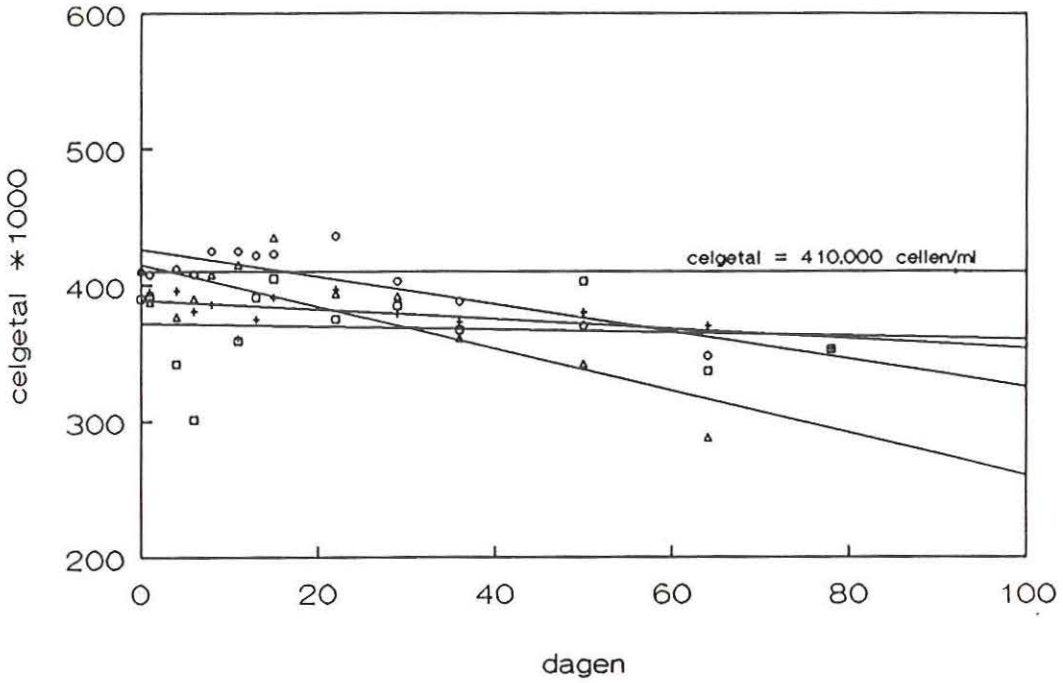
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 2 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

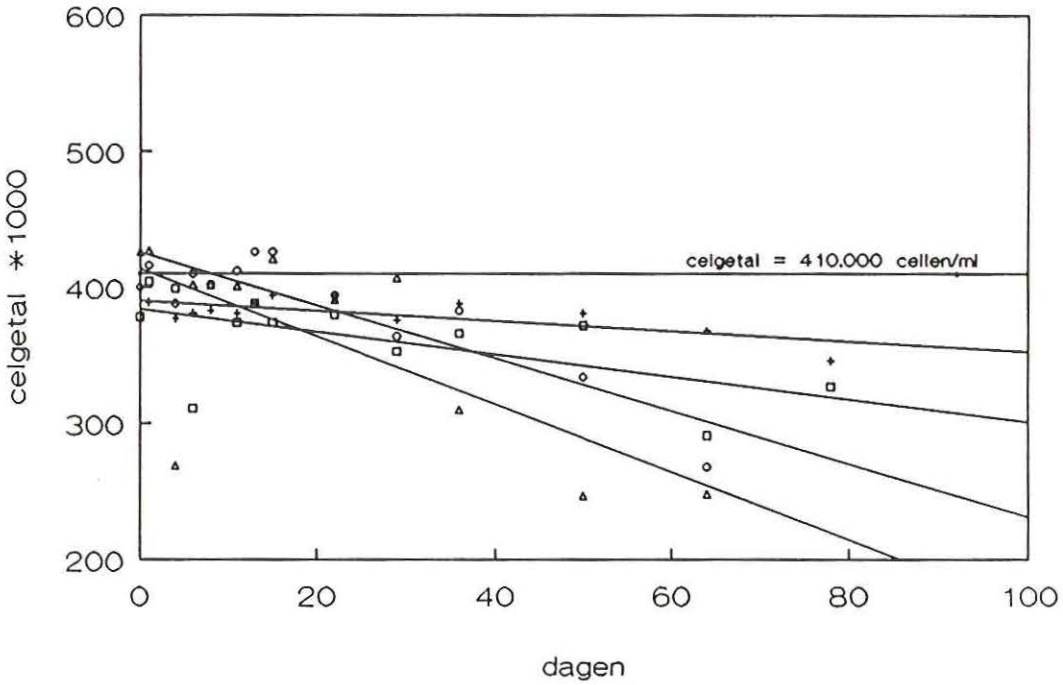
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 2 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

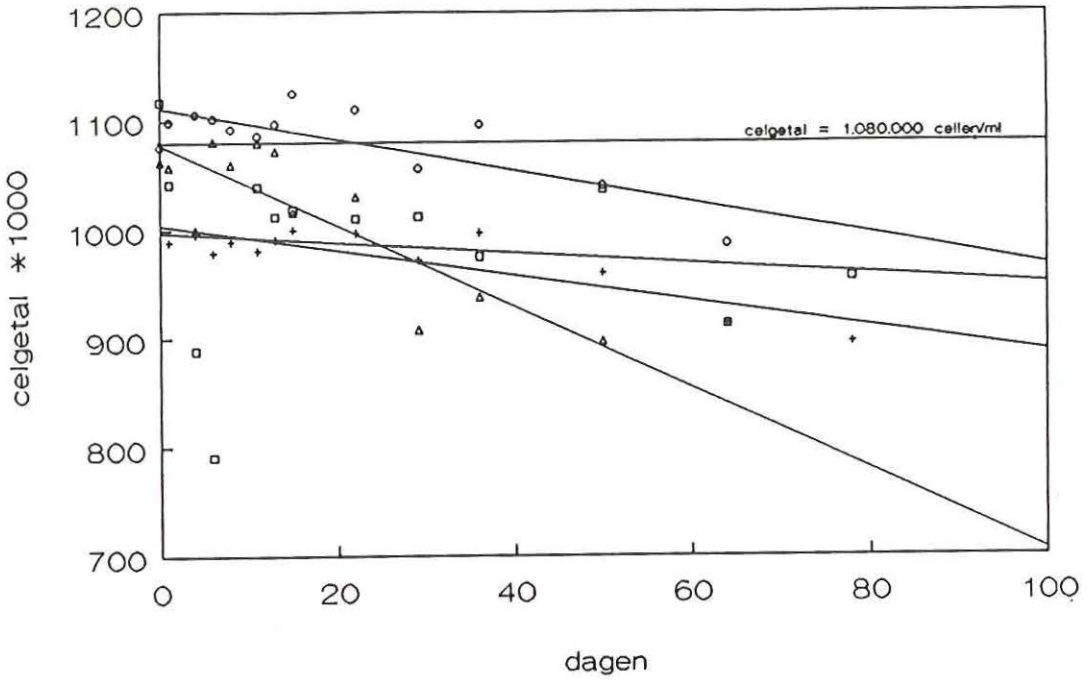
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 3 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

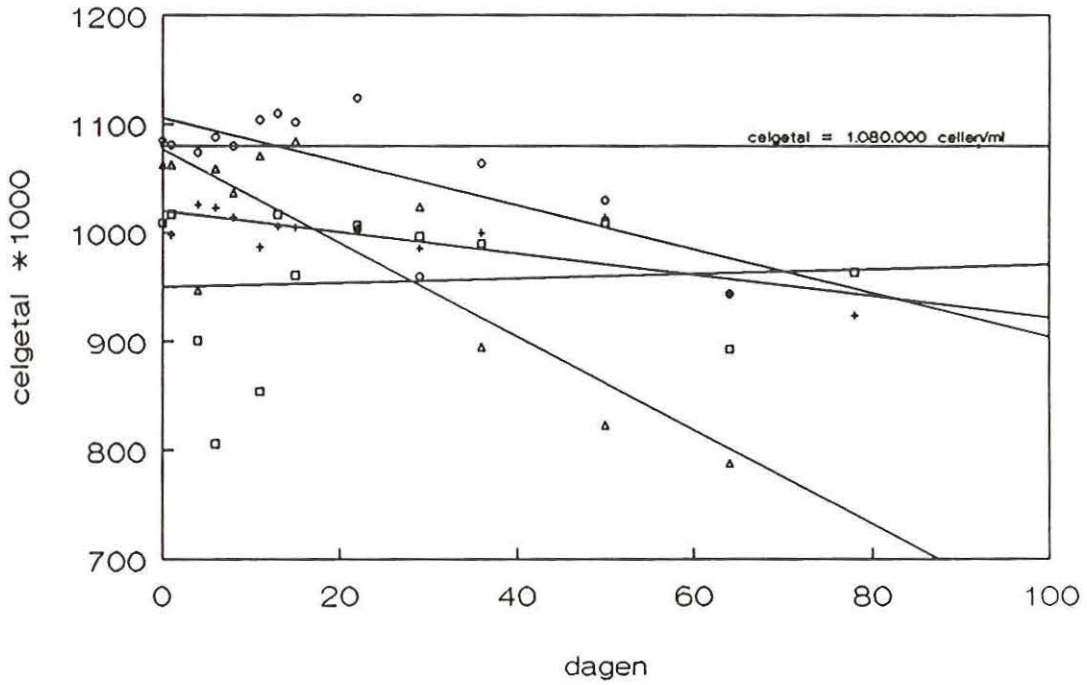
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 3 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

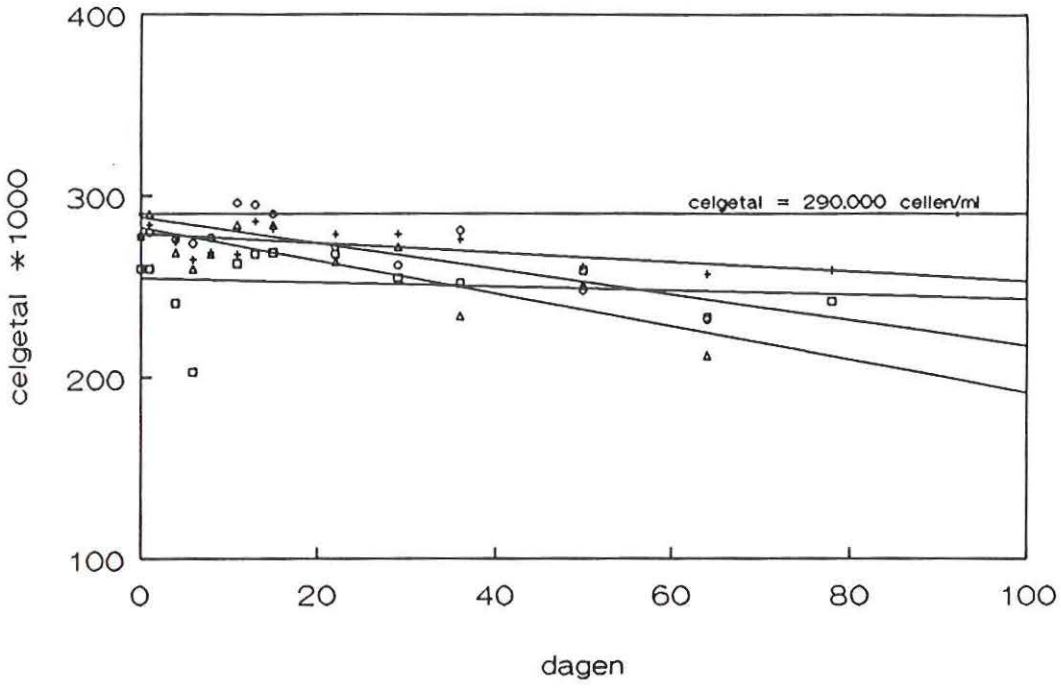
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 4 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

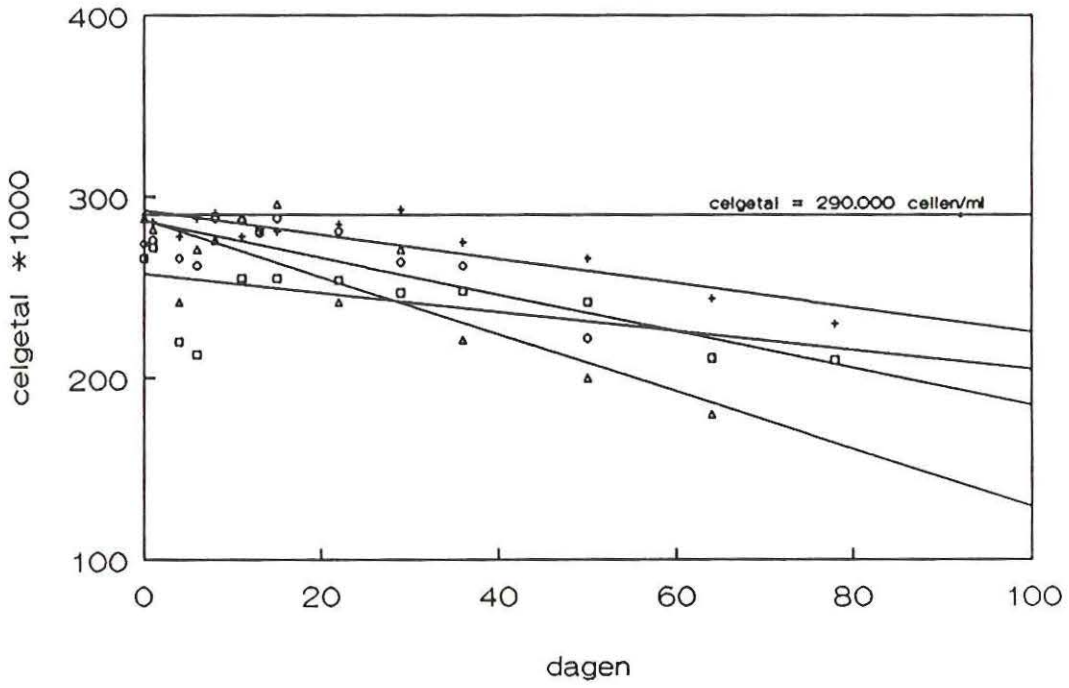
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 4 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

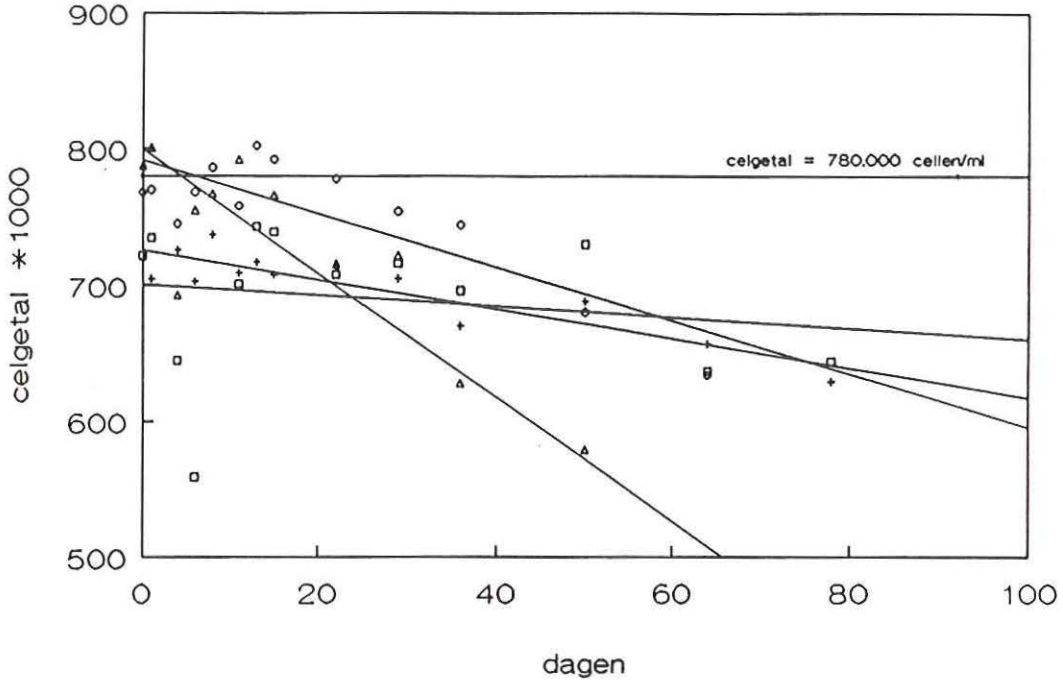
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 5 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

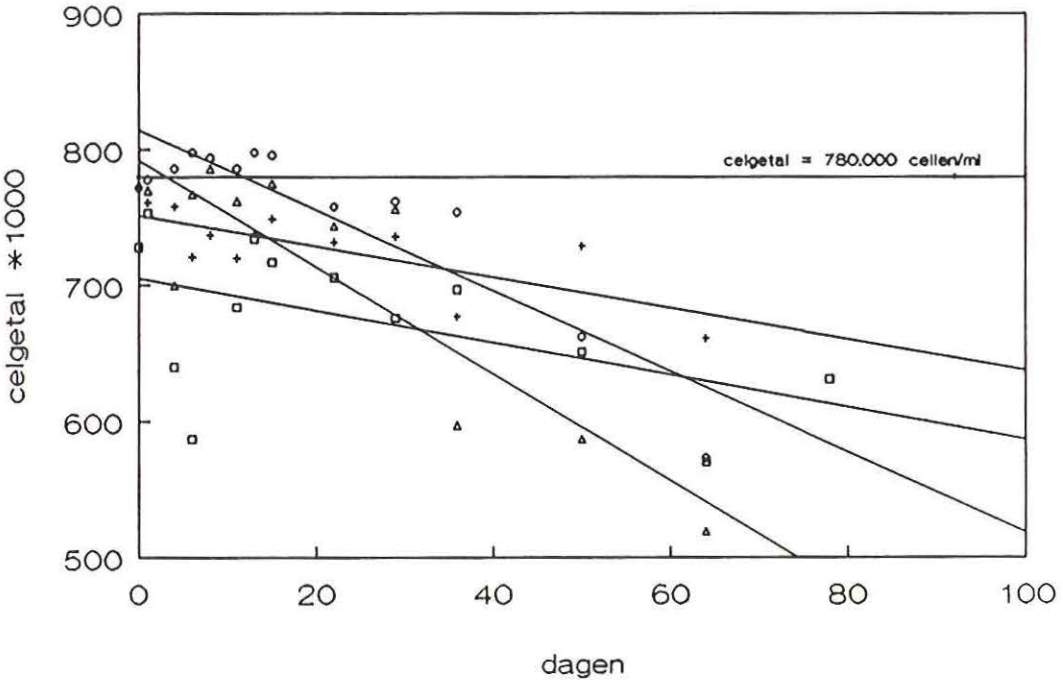
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 5 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

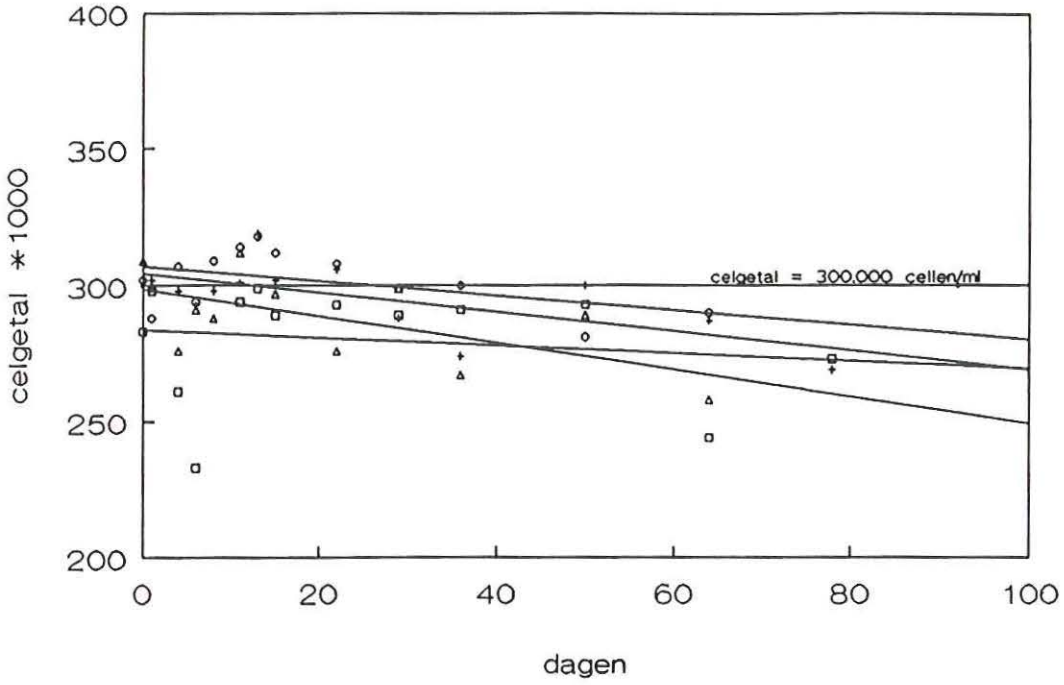
+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 6 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

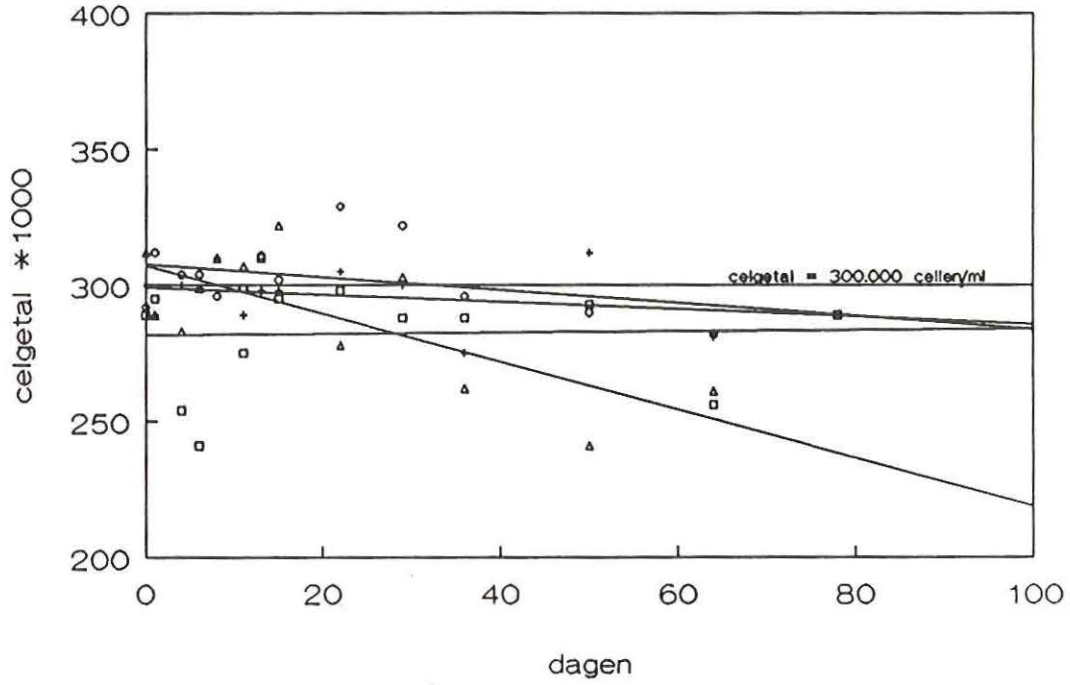
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 6 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

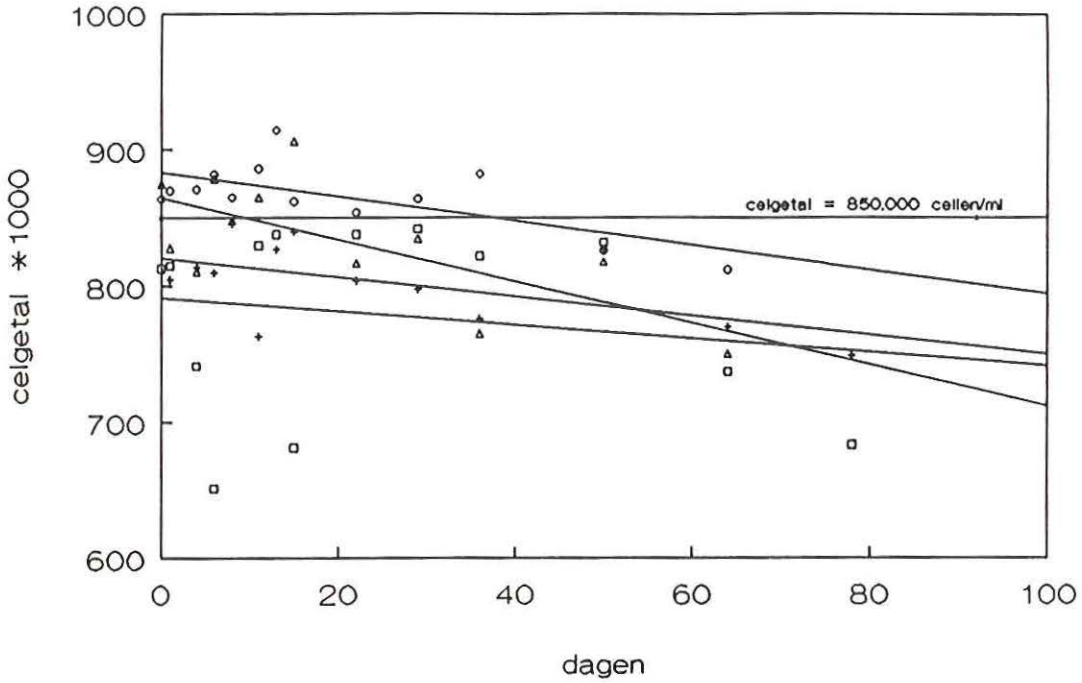
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 7 0.1% Kaliumdichromaat

12-7-1990 t/m 12-10-1990

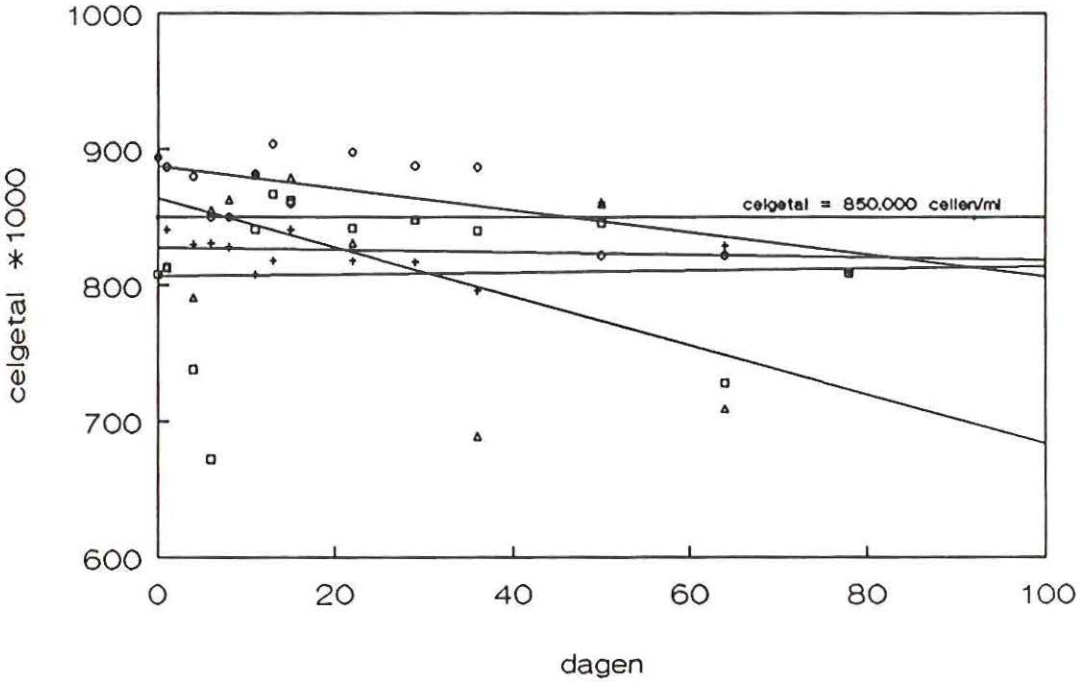
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 7 0.1% Bronopol

12-7-1990 t/m 12-10-1990

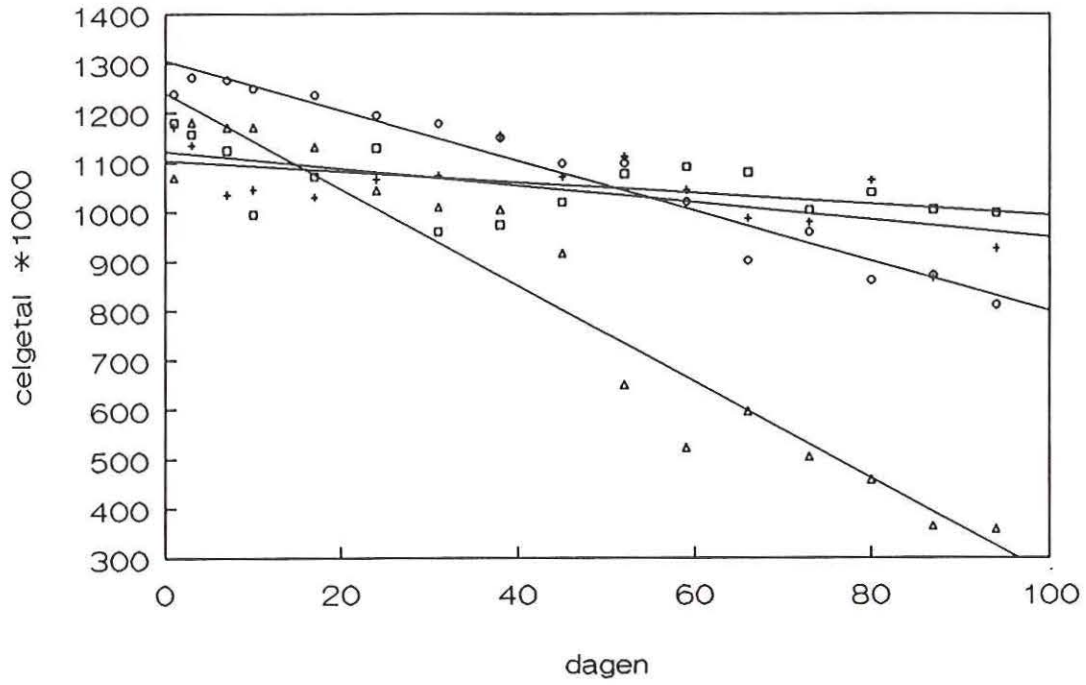
\+ west Δ zuid ○ oost □ noor



monster 1 0.1% bronopol

27-11-90 t/m 28-02-91

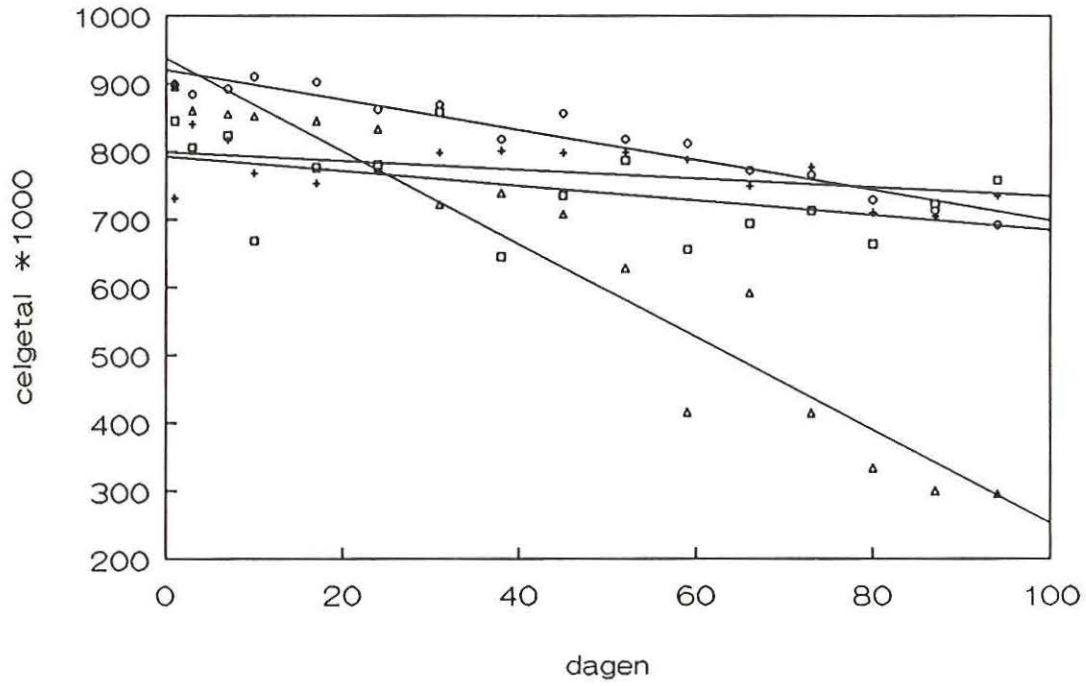
\+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 2 0.1% bronopol

27-11-90 t/m 28-02-91

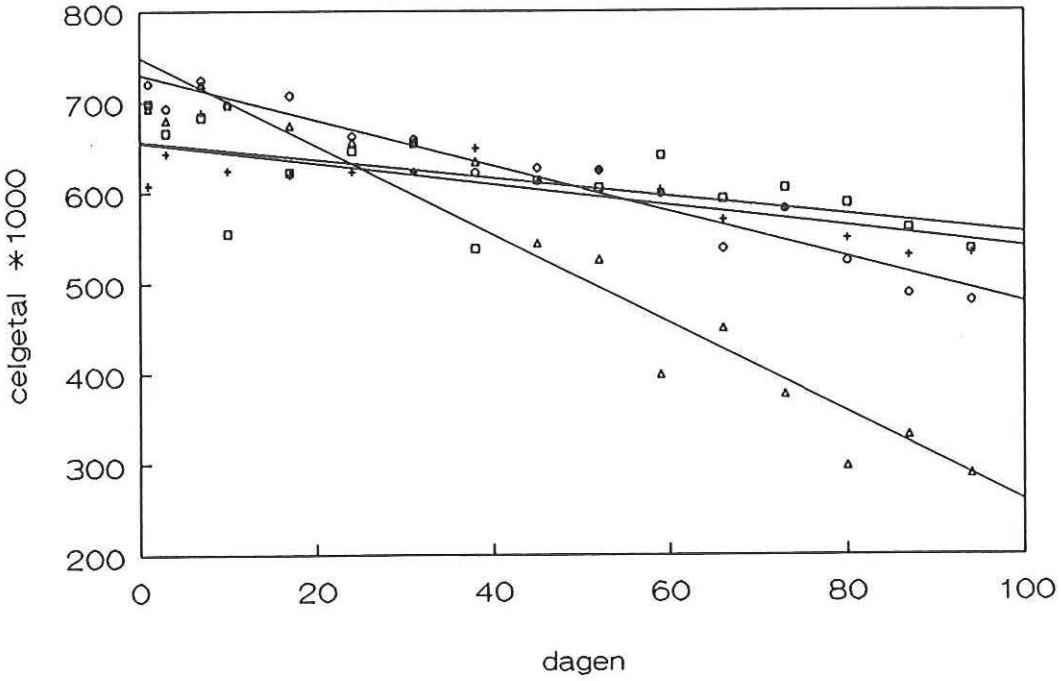
\+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 3 0.1% bronopol

27-11-90 t/m 28-02-91

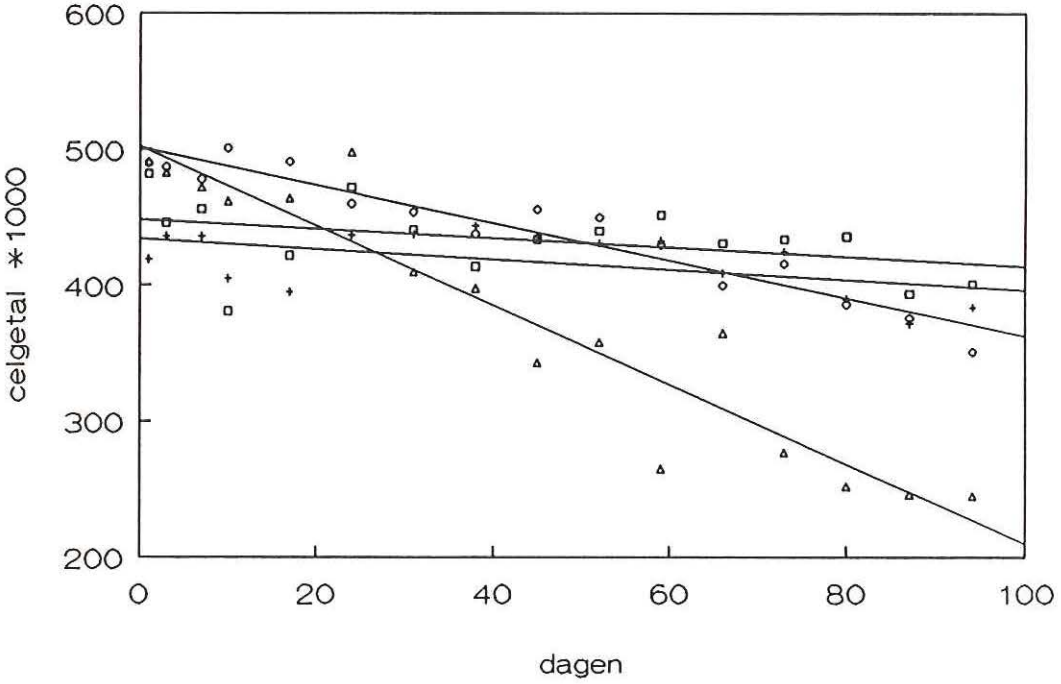
+ west Δ zuid ○ oost □ noord

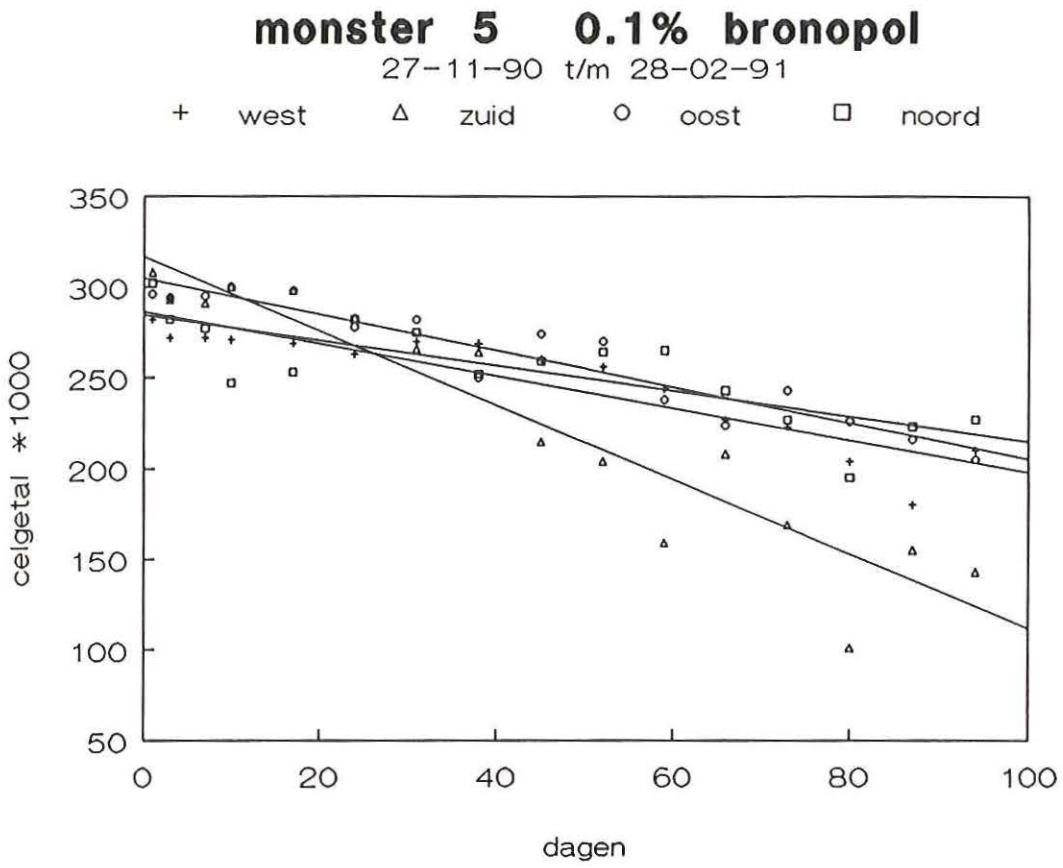


monster 4 0.1% bronopol

27-11-90 t/m 28-02-91

+ west Δ zuid ○ oost □ noord

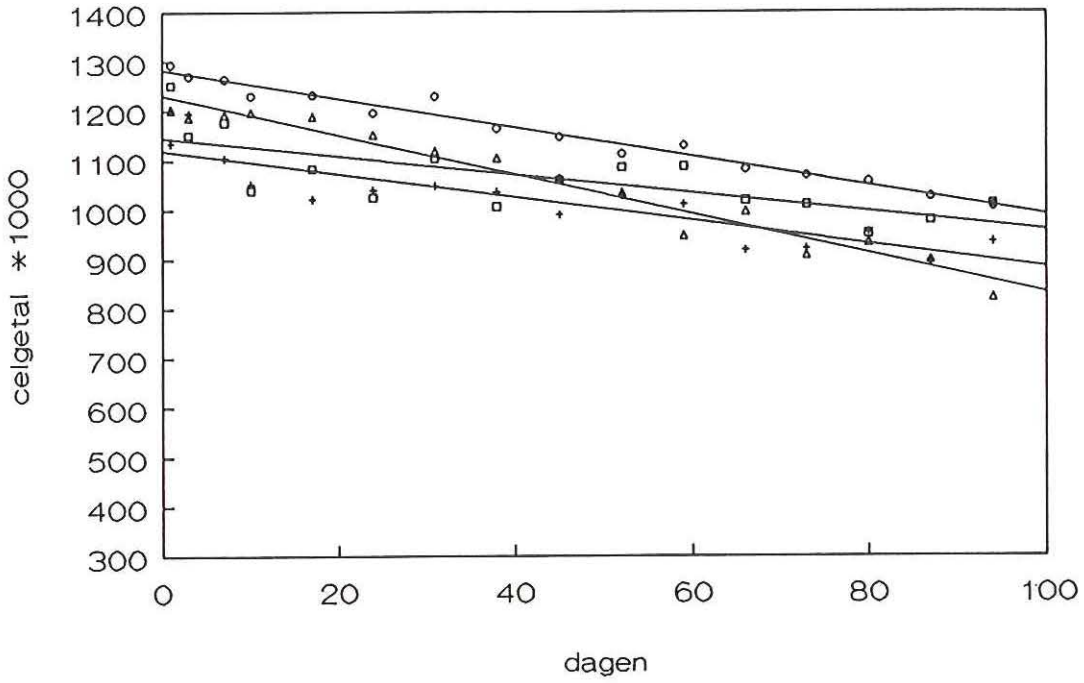



monster 5 0.1% bronopol
27-11-90 t/m 28-02-91
+ west
Δ zuid
○ oost
□ noord
celgetal *1000
350
300
250
200
150
100
50
0
20
40
60
80
100
dagen

monster 1 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

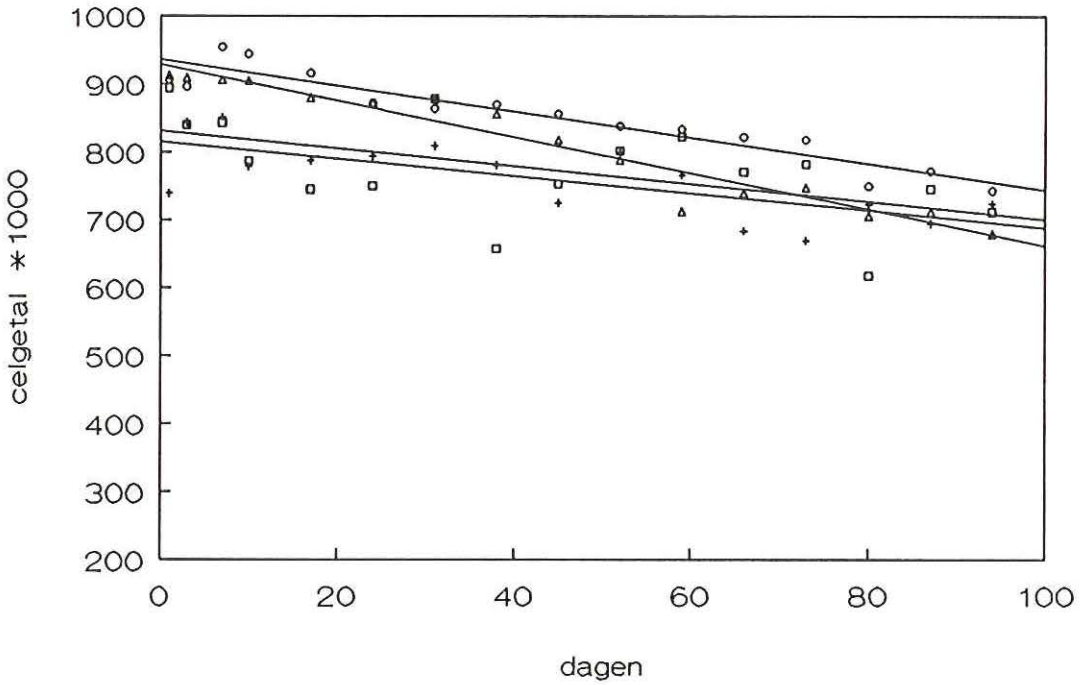
+ west △ zuid ○ oost □ noord



monster 2 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

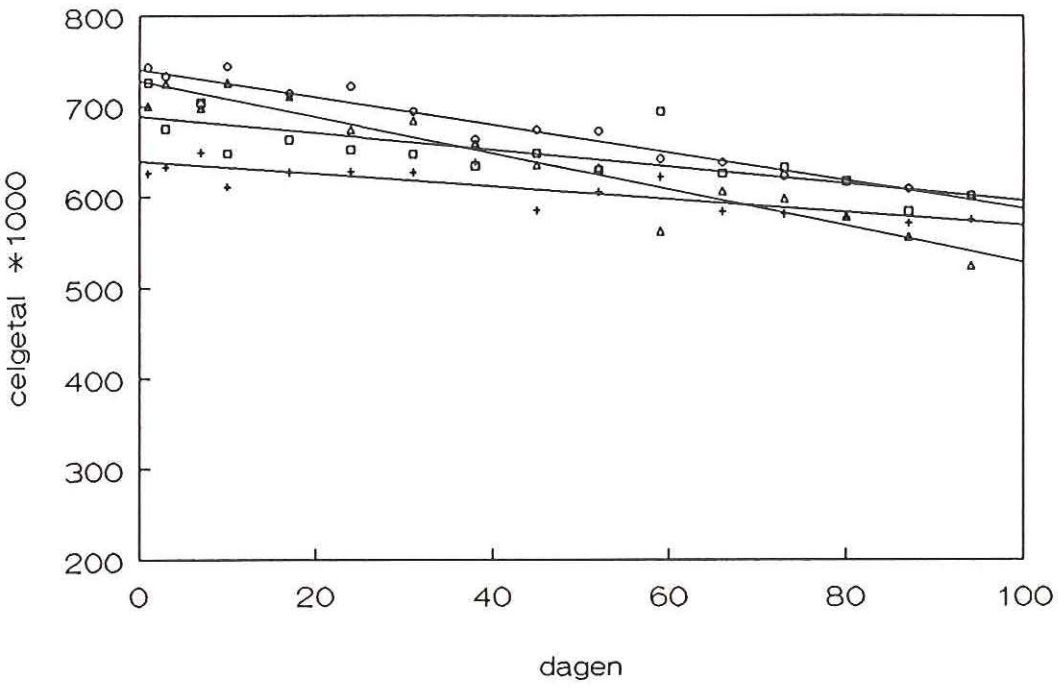
+ west △ zuid ○ oost □ noord



monster 3 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

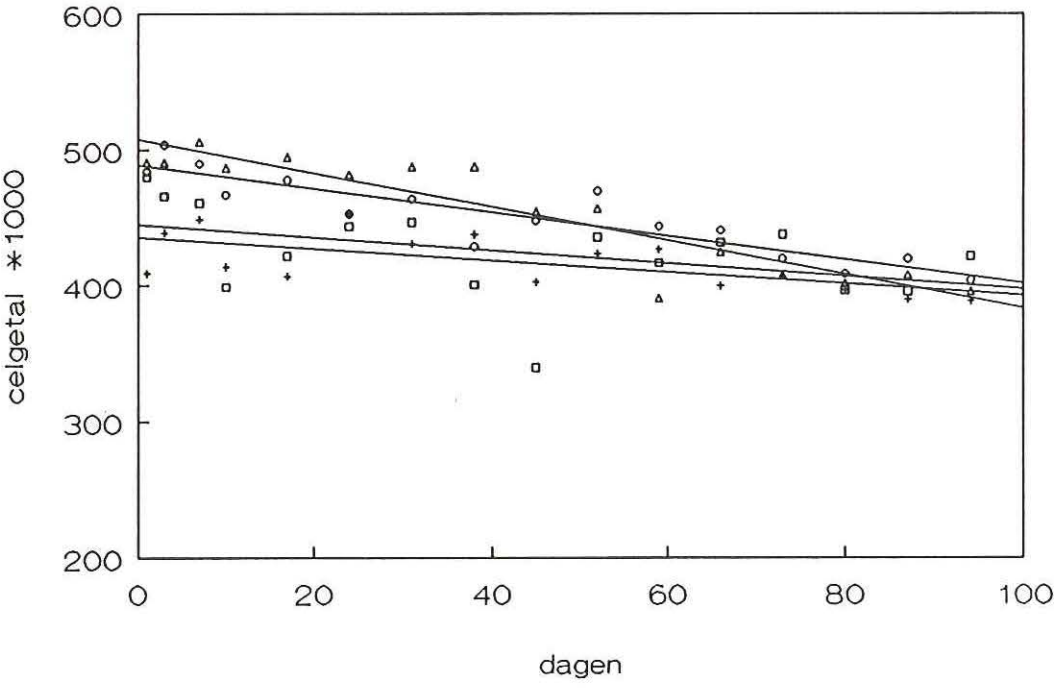
+ west △ zuid ○ oost □ noord

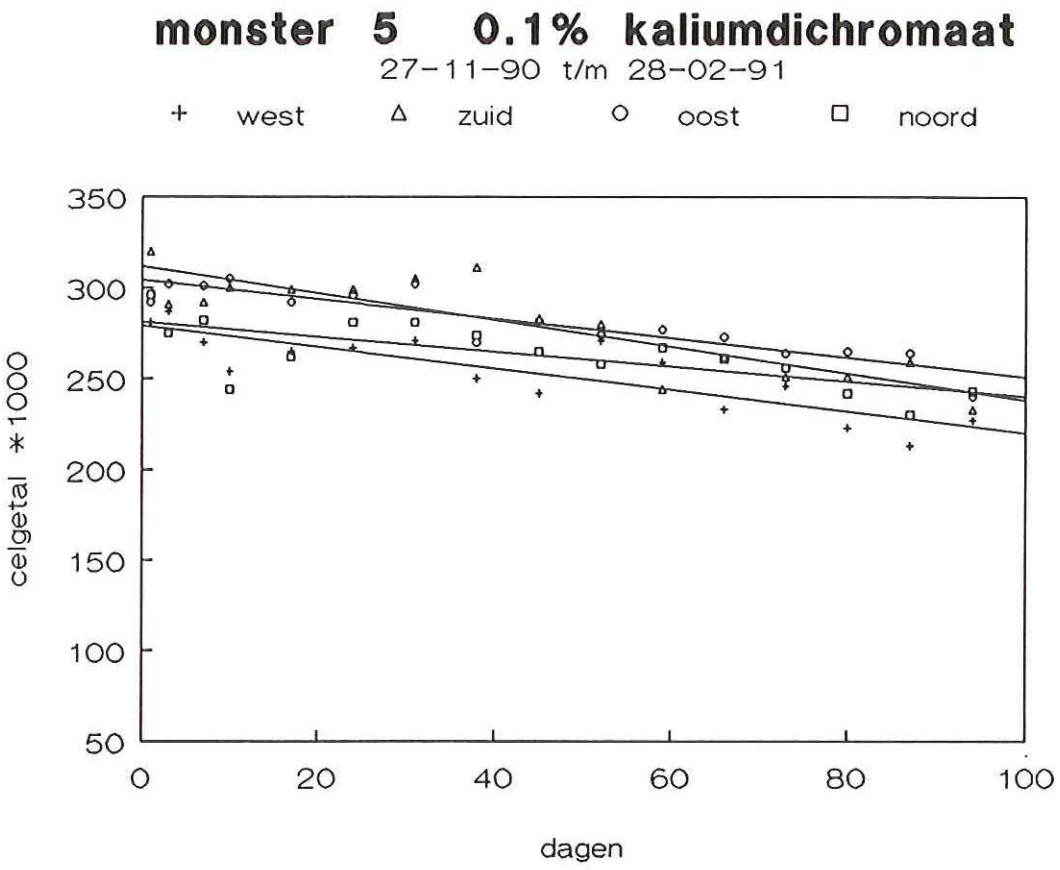


monster 4 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

+ west △ zuid ○ oost □ noord

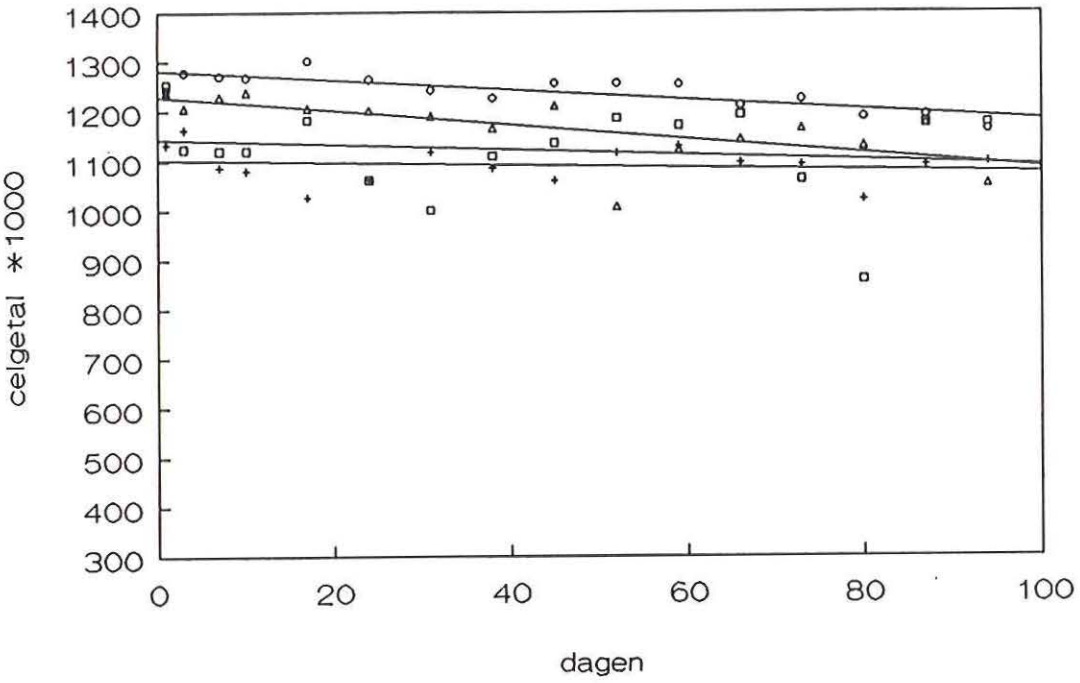



monster 5 0.1% kaliumdichromaat
27-11-90 t/m 28-02-91
+ west
△ zuid
○ oost
□ noord
350
300
250
200
150
100
50
celgetal *1000
0
20
40
60
80
100
dagen

monster 1 verhit 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

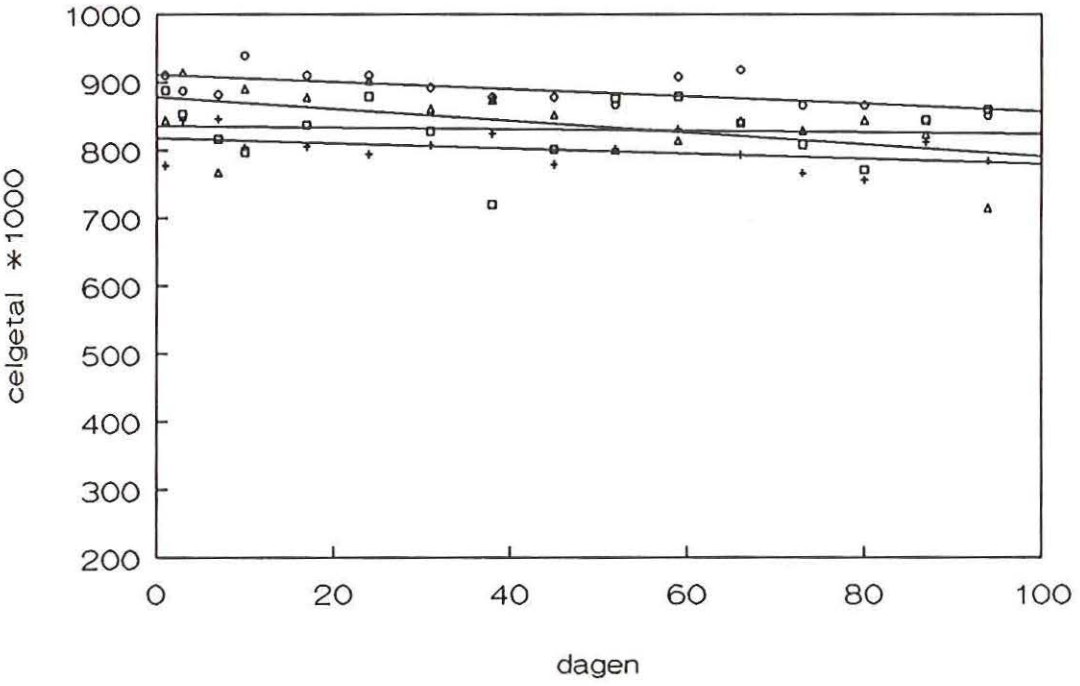
+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 2 verhit 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

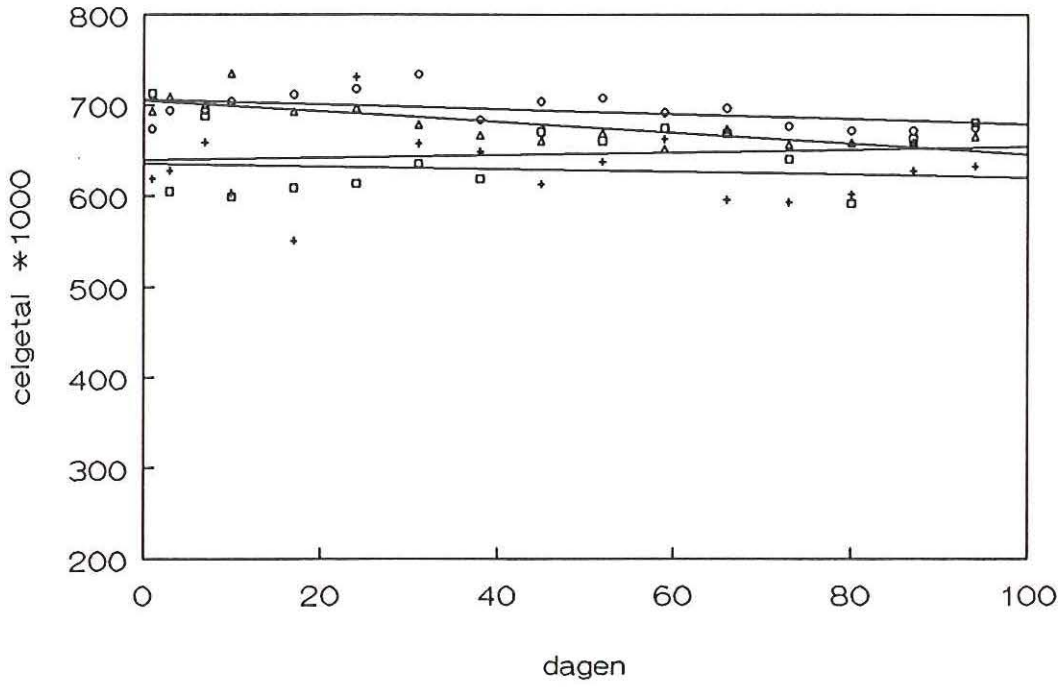
+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 3 verhit 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-2-91

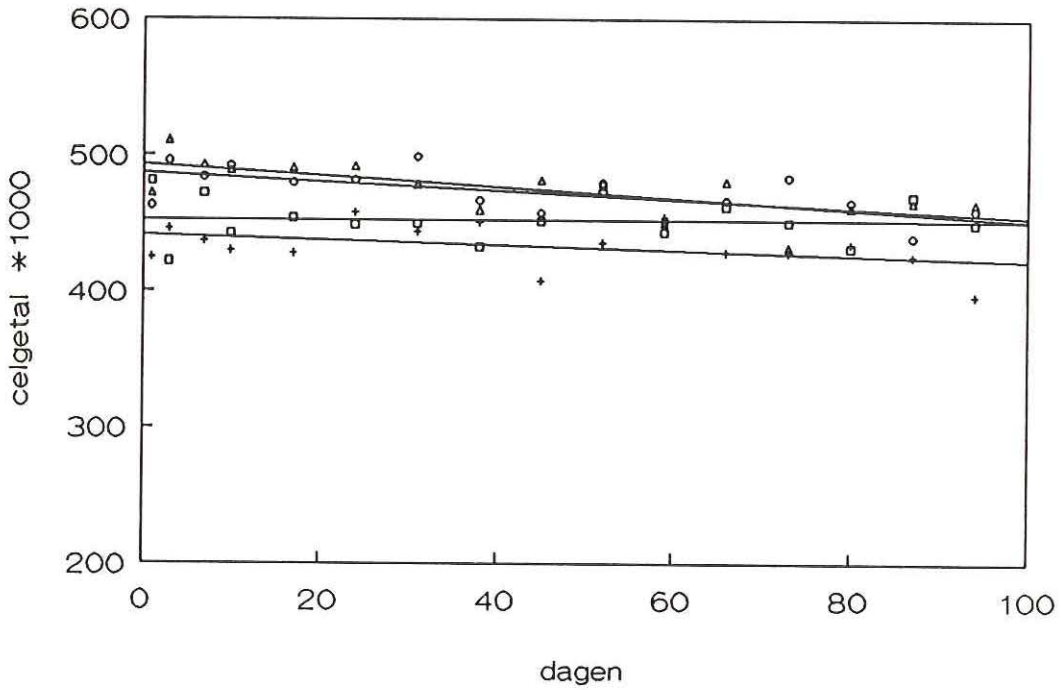
+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 4 verhit 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

+ west Δ zuid ○ oost □ noord



monster 5 verhit 0.1% kaliumdichromaat

27-11-90 t/m 28-02-91

