Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

Microbiologisch onderzoek op Faecale Coliformen in schelpdieren en schelpdierwater en het vastleggen in een concept-protocol.

J. Vellinga

rivo-dlo



RAPPORT 95.017

December 1995

RIVO Rapport 95.017

Microbiologisch onderzoek op Faecale Coliformen in schelpdieren en schelpdierwater en het vastleggen in een concept-protocol.

Jort Vellinga
Vierde jaars student Middelbare Laboratorium Opleiding "Oosterschelde College"
Verplichte stage 7 augustus 1995 t/m 19 januari 1996, RIVO-DLO Yerseke.
Begeleidend docent "Oosterschelde College": Dhr. P.F. Dagelinckx.

December 1995.

DLO-Rijksinstituut voor Visserijonderzoek
Haringkade 1
Postbus 68
1970 AB IJmuiden
Telefoon: 0255-564646
Telefax: 0255-564644

Korringaweg 5
Postbus 77
4400 AB Yerseke
0113-572781
0113-573477

De Direktie van het RIVO-DLO is niet aansprakelijk voor gevolgschade, alsmede voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van het RIVO-DLO; opdrachtgever vrijwaart het RIVO-DLO van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Omslagfoto: Flying Focus - Castricum

2280769

Inhoudsopgave:

Dankwoord 3

Samenvatting 4

1 Inleiding 5

1.1 DLO-instituten 5

1.2 Opdrachten Sanitair Schelpdieronderzoek (Bacteriologie) 7

1.2.1 Opdracht R.W.S./R.I.K.Z., Schelpdierwateronderzoek; 30002 - 110/395 7
1.2.2 Opdracht P.V., Sanitair schelpdieronderzoek; 30002 - 361 8
1.2.3 Opdracht vanuit het bedrijfsleven, 30002 - X aantal 8

1.3 Bivalvia 9

2 Werkwijze bacteriologisch onderzoek 11

2.1 Werkwijze monstername 11

2.1.1 Monstername watermonsters 11
2.1.2 Monstername van schelpdieren 12
2.1.3 Monstername van sediment 13

2.2 Werkwijze laboratorium-onderzoek 14

2.2.1 Laboratoriumonderzoek van watermonsters 14
2.2.2 Laboratoriumonderzoek schelpdiermonsters 16
2.2.3 Laboratoriumonderzoek sediment 17

2.3 Verwerking van de resultaten 18

2.4 Bijzonderheden 18

2.4.1 Het erwtenkrabje 19
2.4.2 De borstelworm 19

3 Opdrachten 22

3.1 Het schrijven van een concept voor STERLAB certificatie 22

3.2 Onderzoek van de atypische kolonies op de Mac. Conkey agar 23

3.2.1 Determineren kolonies van K3, K4, Barbé en Verwijs 24
3.2.2 Vergelijking Rivo-agar met Hospi-agar 26
3.2.3 Eindconclusie onderzoek atypische op Mac. Conkey agar 27

4 Evaluatie stage 28

Literatuurlijst 29

Bijlage 1: Protocol voor STERLAB certificatie
Bijlage 2: Mossel verwaterplaats Yerseke
Bijlage 3: NEN 6570, Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater
Bijlage 4: Brieven en invulformulieren
Bijlage 5: Artikel uit Nieuwsbrief nr. 7 (Een mediabereider in de rol van detective)
Bijlage 6: Voorschrift voor Mac. Conkey agar nr. 3 van Oxoid
Bijlage 7: Aantallen bacteriën per monster (Mac. Conkey)

Dankwoord

Ten eerste wil ik mijn dank uitspreken aan het RIVO als instituut, dat mij een stage mogelijkheid heeft geboden op de afdeling Aquacultuur.
In het algemeen bedank ik alle medewerkers van het RIVO, lokatie Yerseke die mij op ieder moment behulpzaam waren.
In het bijzonder bedank ik de heren A.C.M. van Gool voor de direkte zowel praktische als theoretische begeleiding, drs R. Dijkema en tijdelijk drs. M.R. van Stralen als verantwoordelijk begeleiders.
Ook wil ik mijn dank uitspreken aan mevr. C. Schol die mij wegwijs heeft gemaakt met de fotoprinter.

SAMENVATTING

RIVO-DLO (Rijksinstituut voor Visserijonderzoek) is één van de 12 rijksinstituten welke behoren tot de Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Op de afdeling Aquacultuur, welke gevestigd is in Yerseke, heb ik stage gelopen op het onderdeel Microbiologie. Dit houdt in dat ik verschillende bepalingen heb moeten doen ten behoeve van onder andere de sanitaire waterkwaliteit van de kustwateren en de kwantitatieve controle op het aantal faecale coliformen in schelpdieren welke voor consumptie zijn 'gevist'. Het nemen van monsters in het veld of bij de verschillende mosselverwerkingsbedrijven tot aan het verzenden van de resultaten naar de verschillende bedrijven/instellingen behoren tot deze werkzaamheden. Naast het 'normale' werk heb ik ook nog twee opdrachten uitgevoerd, namelijk: - protocol schrijven van het kwantificeren van Faecale Coliformen in schelpdiervlees en -vocht; en

- Onderzoek naar atypische kolonies op de Mac.Conkey agar.

STERLAB certificering speelt vandaag de dag een groote rol bij de verschillende laboratoria. Het certificaat geeft een degelijke kwaliteitswaarborging van het laboratorium en de uitgevoerde analyse. Om zo'n certificaat uitgereikt te krijgen moet het laboratorium aan bepaalde punten voldoen. Eén zo'n punt is het hebben van protocollen van de verschillende apparatuur en analyses. Om deze reden is aan mij de opdracht gegeven om een protocol te schrijven van het kwantificeren van faecale coliformen in schelpdiervlees en -vocht. Zie voor resultaat bijlage 1.

Omdat er steeds meer atypische kolonies groeiden op de Mac.Conkey agar, welke geleverd wordt door Hospidex (een mediabereider), is aan mij gevraagd om uit te zoeken of deze atypische ook daadwerkelijk op de Mac.Conkey agar Nr. 3 mag groeien. Om dit te onderzoeken heb ik naast de Mac.Conkey geleverd door Hospidex een zelf gemaakte Mac.Conkey in het routine onderzoek opgenomen. Hieruit blijkt dat op de Mac.Conkey geleverd door Hospidex veel meer atypische kolonies groeien dan op de zelf gemaakte Mac.Conkey.

Op de Mac.Conkey van Hospidex groeide zelfs Micrococcaceae, deze bacteriën mogen niet op deze Mac.Conkey groeien. Ook waren de kolonies van de Faecale Coliformen op de zelf gemaakte Mac.Conkey agar vele keren duidelijker van vorm en kleur.

1 INLEIDING

1.1 DLO-Instituten

De Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), bestaat al bijna dertig jaar. Sinds die tijd behoren de verschillende instituten voor land- en tuinbouwonderzoek die Nederland rijk is bij één grote organisatie die DLO heet.
DLO heeft nu twaalf onderzoekinstituten en meer dan 300 medewerkers, die werken aan een bijna ontelbaar aantal onderzoekvragen. En die vragen gaan niet alleen over land- en tuinbouw, maar ook zaken als natuurbeheer, visserij, sociale-economie en arbeid, bodem en water, bos, agrotechnologie en milieu komen aan bod.

DLO doet onderzoek in opdracht van de nationale overheid, in het bijzonder het ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, maar ook voor provinciale en gemeentelijke overheden, grotere en kleinere ondernemingen en voor de Europese Unie.
DLO hoort nu nog steeds bij het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, maar de organisatie is bezig om zich voor te bereiden op een vorm van zelfstandigheid.

Het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek is één van de twaalf onderzoeksinstituten van de DLO. De activiteiten van het instituut hebben tot doel door wetenschappelijk onderzoek op het gebied van biologie, milieu, microbiologie, biochemie, techniek en technologie bij te dragen tot het oplossen van problemen bij de exploitatie en het beheer van aquatische ecosystemen in zee, kust- en binnenwateren.
Dit onderzoek is enerzijds gericht op beantwoording van de vragen ten aanzien van het visserijbeleid en het gebruik van de zeeën en binnenwateren, zoals gesteld door de Nederlandse overheid en de Europese Unie. Anderzijds richt het RIVO-DLO zich steeds nadrukkelijker op beantwoording van vragen aan haar gesteld door het visserijbedrijfsleven.

Het RIVO-DLO kan worden onderverdeeld in vier hoofdgroepen:

- **Biologisch onderzoek**
- **Milieu, kwaliteit en voeding**
- **Techniek en technologie**
- **Aquacultuur**

Biologisch onderzoek: Het biologisch onderzoek richt zich op het instandhouden van een levensvatbare visserij in duurzame ecosystemen. Hiervoor wordt de wisselwerking bestudeerd tussen visserij en individuele visbestanden, terwijl tevens de effecten op het gehele ecosysteem, inclusief niet-commerciële soorten, vogels en zeezoogdieren, worden meegenomen.

Het uiteindelijke doel is om de beherende instanties in het zoute en zoete water te adviseren omtrent de consequenties van mogelijke beleidsmaatregelen. De basis voor het onderzoek is gelegen in het monitoren van veranderingen op lange termijn in vispopulaties, enerzijds door bemonstering van de commerciële vangst en anderzijds door bestandsopnamen met onderzoeksschepen. Deze veranderingen worden in verband gebracht met veranderingen in de visserij tegen de achtergrond van zowel natuurlijke variaties als de invloed van andere factoren. De mariene monitoring-programma's worden in internationaal verband gecoördineerd.

Milieu, kwaliteit en Voeding: Het milieuonderzoek richt zich op het vaststellen van de effecten van waterverontreiniging en andere menselijke activiteiten op vispopulaties en andere aquatische organismen, alsmede het vaststellen van de effecten van microverontreinigingen en biotoxinen op de kwaliteit van visserijprodukten met als vertrekpunt bescherming van de volksgezondheid. De visserijaktiviteiten met betrekking tot kwaliteit en veiligheid van visserijprodukten zijn gericht op de sensorische, chemische, fysische en microbiologische aspecten van de visserijprodukten vanaf de vangst via verwerking en de opslag tot de consument.

Techniek en technologie: In de afgelopen decennia maakt de Nederlandse visserij steeds meer gebruik van high-tech technieken zowel aan boord als aan de wal. De visserij-technische verwerkingsapparatuur, alsmede de indeling van de schepen en de verwerkingsindustrie zijn met steun van het onderzoek nagenoeg geheel in lijn gebracht met de gangbare richtlijnen. De onderzoekactiviteiten betreffen het ontwikkelen van selectievere en vangstvriendelijkere vistuigen alsmede onderzoek aan de integrale kwaliteitsketen, zoals de kwaliteit van de arbeidsomstandigheden, de kwaliteit van verwerkingsprocessen en -produkten en de beïnvloeding van kwaliteit van het milieu.

Aquacultuur: De afdeling Aquacultuur is gevestigd in de RIVO-DLO dependance in Yerseke en de hoofdvestiging in IJmuiden. De werkzaamheden in Yerseke zijn gericht op het schelpdierbedrijf. Onderzoek wordt uitgevoerd op het gebied van de bodemcultuur van mosselen en oesters en van de visserij op wild mosselzaad en kokkels. Jaarlijkse opnamen worden uitgevoerd van grootte en samenstelling van commerciële schelpdierbestanden en advies hieromtrent wordt uitgebracht aan de overheid en aan het schelpdierbedrijf, onder andere ten dienste van quotering en openstelling van visgebieden.

Verder wordt in een monitoring-programma de sanitaire waterkwaliteit in de Nederlandse produktiegebieden voor schelpdieren onderzocht. Het water wordt onderzocht op aanwezigheid van bacteriën, toxische-fytoplanktonsoorten en fytoplanktontoxinen in schelpdieren. De sanitaire kwaliteit van zowel het proces-water als het eindprodukt van een aantal verwerkingsbedrijven van verse mosselen en oesters wordt regelmatig onderzocht. In samenwerking met andere afdelingen van het RIVO-DLO, wordt ook onderzoek gedaan en advies uitgebracht op het gebied van produktkwaliteit en procestechnologie bij de schelpdierverwerkende industrie. (staf-afdeling In- en Externe Communicatie DLO)

1.2 Opdrachten Sanitair schelpdieronderzoek (Bacteriologie)

Onderstaand wordt een overzicht gegeven van de bestaande opdrachten welke worden uitgevoerd door RIVO-DLO afdeling Aquacultuur onderdeel bacteriologie, met de bijbehorende proefnummers.

1.2.1 Opdracht R.W.S./R.I.K.Z., Schelpdierwateronderzoek; 30002 - 110/395

In 1988 is het RIVO-DLO begonnen met schelpdierwateronderzoek op 8 locaties in de Waddenzee en de Zuidelijke Delta om een waterkwaliteitsbeeld te geven van locaties waar schelpdieren worden gekweekt, gevist en verwaterd. Met behulp van het indicator-organisme mossel (Mytilus edulis) worden Faecale Coliformen (F.C.) als indicator gebruikt voor wat betreft aanwezigheid verontreinigingen van faecale oorsprong. Een kwartaalbemonsteringsprogramma vindt plaats op locaties in de Waddenzee, Kop van Goeree, Grevelingen, Oosterschelde en Westerschelde. In 1996 wordt het programma uitgebreid de volgende lokaties: Hoedekenskerke, Domburg, Haamstede, Doove balg en Dantziggat. Doove balg en Dantziggat zijn lokaties in de Waddenzee. Het RIVO, afdeling Aquacultuur heeft in overleg met Dienst Binnenwateren/RIZA en RWS/RIKZ de keuze van de meetpunten en het aantal monsters per meetpunt vastgelegd.

Met medewerking van onderzoeks- en inspectievaartuigen worden de monsterlocaties bezocht. Op sommige locaties werden, bij afwezigheid van mosselen, t/m 1993 daartoe speciaal ontworpen mosselrekken geplaatst. Ieder kwartaal werden mosselen eruit genomen, om op deze manier toch een kwaliteitsbeeld te geven betreffende de aanwezigheid van F.C.. De locaties die daarvoor in aanmerking kwamen zijn: de Zoutkamperlaag en de Kop van Goeree.
In september 1993 heeft Raf Hulsman, een stagiare van de Internationale Agrarische Hogeschool "Larenstein", een rapport geschreven met de titel 'Akkumulatie van faecale coliformen in de mossel'.

Met de gevonden periode van 4 uur uithangen van mosselen, is een acceptabele handelwijze ontwikkeld die nu toegepast wordt op de twee eerder genoemde locaties.
Voordeel van deze methode boven de te plaatsen mosselrekken is dat het minder getijde afhankelijk is en minder tijd vergt. In overleg met de vaartuigen worden de nodige activiteiten ontwikkeld om de monsters naar Yerseke te krijgen waar ze in het laboratorium worden verwerkt. Volgens de opdracht-spelregels dienen de monternames te geschieden in de eerste twee weken van de laatste maand van het kwartaal (maart, juni, september en december). Na monstering dienen de monsters binnen 24 uur geanalyseerd te zijn om een goede betrouwbaarheid te garanderen. Na elk kwartaal worden de resultaten inclusief facturering in een rapportje gezet en gezonden naar het Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ) in Den Haag.

1.2.2 Opdracht P.V., Sanitair schelpdieronderzoek; 30002 - 361

In opdracht van Produktschap Vis (PVis) en het ministerie van LNV is er controle op de bacteriologische en fytosanitaire waterkwaliteit en biotoxinen in schelpdierproductiegebieden.
Het bacteriologisch onderzoek (F.C. haast wekelijks; Salmonella in de maanden juli, september en november) vloeit voort uit de door de Raad van de Europese Gemeenschap opgestelde Richtlijn betreffende de vereiste kwaliteit van schelpdierwater. Deze richtlijn is in de Nederlandse wetgeving geïntroduceerd middels het besluit "Kwaliteitsdoelstellingen en metingen oppervlaktewateren" van 3 november 1983.
De locaties zijn gelegen in: Waddenzee(mosselen), Noordzee(spisula's), Voordelta(kokkels), Grevelingen(oesters), Oosterschelde(mosselen), Westerschelde (kokkels), in Rayon Yerseke(Oesterputten(oesters)) en de bedrijfsgeul (waar mosslen worden uitgehangen).
Een deel van de monstername worden door schepen van Directie Visserijen en onderzoeksschepen van het RIVO uitgevoerd. Het overige deel wordt door RIVO medewerkers gedaan. Wekelijks worden de resultaten gefaxt naar het Rijksdienst keuring van Vlees en Vis (RVV) en het PVis. Bij overschrijding van de norm (300 F.C. per 100 ml schelpdiervlees + vocht) worden de volgende bedrijven/ instellingen hierover bericht: AID; RIVO-DLO (IJmuiden); RVV (Voorburg en Yerseke); PVis (Yerseke en Rijswijk) en LNV, Direktie Visserijen (Den Haag).

1.2.3 Opdracht vanuit het bedrijfsleven, 30002 - X aantal.

De laatste jaren is er steeds meer vanuit het mossel- en oesterbedrijf behoefte aan procescontrole van zowel het water als de schelpdieren.

Proceswater: Watermonsters vóór en ná U.V. behandeling worden geanalyseerd op faecale coliformen i.v.m. goede werking U.V.-apparatuur. Tevens is er controle op het water, wat als verwaterwater en koelwater wordt gebruikt. Deze moeten voldoen aan de norm <14 F.C./ 100 ml.
Watermonsters uit Oesterputten worden geanalyseerd alwaar oesters worden bewaard alvorens ze de markt op gaan.

Schelpdieren: Schelpdieren worden aangeboden of door het RIVO gemonsterd om eveneens geanalyseerd te worden op faecale coliformen.
Als men het over bacteriologisch onderzoek van schelpdieren heeft dan bedoelen ze twee-kleppige schelpdieren. Twee-kleppige schelpdieren hebben zoals hun naam al zegt een schelp bestaande uit twee kleppen en behoren dus tot de klasse van Bivalvia ,Tweekleppige. (A.C.M van Gool 1995)

1.3 Bivalvia

In West-Europa zijn de Bivalvia in commercieel opzicht de belangrijkste groep weekdieren. Wereldwijd komen ongeveer 10.000 soorten tweekleppigen voor, waarvan de meeste in de kustgebieden leven. De meeste vertegenwoordigers van de groep leven ingegraven in de bodem en houden via twee adembuizen of sipho's contact met de buitenwereld. Sommige boren gangen in hout, veen of zachte gesteenten; ook zijn er die zich met uit eiwit bestaande byssusdraden aan een vaste ondergrond of aan voorwerpen vastspinnen. Mosselen bijvoorbeeld, kunnen zich aan elkaar vastspinnen tot 'matten' op de zeebodem, maar zo nodig maken ze zich met behulp van hun voet los en verplaatsen zich. Naarmate ze ouder worden, zijn ze honkvaster. Weer andere, zoals oesters, hechten zich met een soort cement vast aan rotsen of andere schelpen.

Er zijn diverse manieren om tweekleppigen te vissen. De oudste en nog steeds, vooral in Zuid-Europa, veel toegepaste methode is het met de hand verzamelen in de getijdezone of in ondiep water.
Op droogvallende bodems gebeurt dit met een schep of een soort spatel. In ondiep water wordt vaak een zogenaamde 'slagrijf' gebruikt, een soort langstelige hark met lange tanden waarachter een netje is bevestigd. In dieper water en bij gemechaniseerde visserij wordt met sleepnetten, zogenaamde 'korren' gevist. (Bas de Groot, Renger Dijkema, Frank Redant, 1988)

De tweekleppige schelpdieren die het meest voor bacteriologisch onderzoek worden aangeboden zijn:

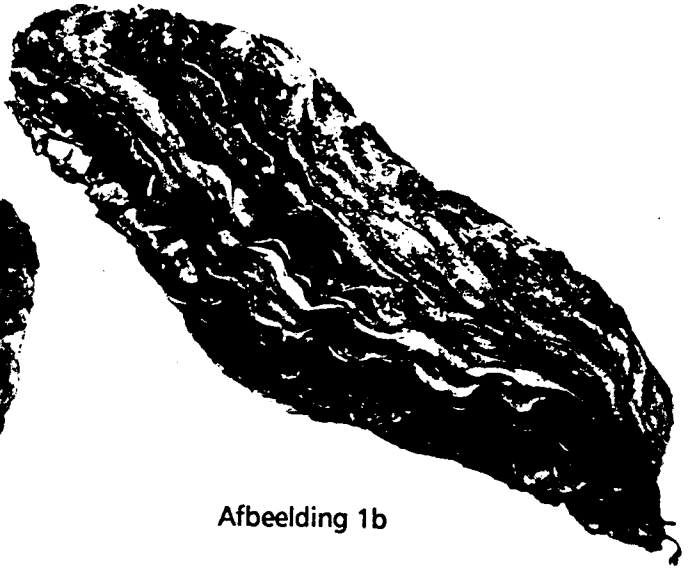
- de Europese platte oester (Ostrea edulis), afb 1a;
- de Japanse oester (Crassostrea gigas), afb. 1b;
- de Kokkel (Cerastoderma edule), afb 1c;
- de gewone mossel (Mytilus edulis), afb. 1d;
- soms de afgeknotte strandschelp (Spisula subtuncata)

Zie, voor omschrijving van deze schelpdieren, bijlage 1 protocol: Telplaatmethode voor het kwantificeren van Faecale colibacteriën in mosselvlees- en vocht.

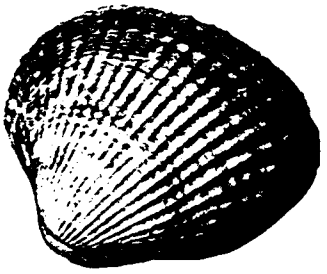
Schelpdieren slaan bacteriën, fyto-plankton en andere microörganismen op in hun schelp. Wanneer we het mosselvlees en -vocht bacteriologisch onderzoeken geven de resultaten de toestand van het milieu weer, waaruit de mossel is gevist. Een watermonster is daarentegen een moment opname, waardoor de resultaten in bepaalde zin onbetrouwbaarder zijn.



Afbeelding 1a



Afbeelding 1b



Afbeelding 1c



Afbeelding 1d

2 WERKWIJZE ONDERZOEK

Het bacteriologisch onderzoek op de afdeling Aquacultuur bestaat in principe uit 3 delen, namelijk: - Monstername;
- Laboratoriumwerk;
- Verwerking van de resultaten.

Voor elk soort monster is het onderzoek verschillend.

2.1 Werkwijze monstername

De monsters voor het bacteriologisch onderzoek krijgt het RIVO via verschillende wegen. Monsters van de Waddenzee worden genomen door de opzieners van het Wad. Deze versturen de monsters via de PTT naar het RIVO. Monsters van de Oosterschelde worden genomen door de opzieners van dat gebied. De thuishaven van De Valk, een boot waarmee men monstert, is Yerseke. We hoeven voor deze monsters alleen even naar hun ligplaats te rijden om ze overhandigd te krijgen. Bij deze monsters zitten meteen de monsters van de Kokhaan, een andere 'monster' boot, welke zijn ligplaats heeft in Zierikzee.

Met de bedrijven zijn afspraken gemaakt over de monstername. Het ene bedrijf neemt en brengt de monsters zelf, voorbeelden hiervan zijn Kroonton mosselen B.V. en A. Cornelisse B.V. Bij een ander bedrijf nemen we zelf monsters, Barbé B.V. J. Bij Krijn Verwijs B.V. wordt een deel van de monsters door mensen van het bedrijf zelf genomen en een deel door het RIVO.
Bij monstername van oesters uit de oesterputten voor het sanitair programma van het P.V. (Productschap Vis) is de afspraak gemaakt dat er 3 uur vòòr hoogwater tot 2 uur ná hoog water niet mag worden gemonsterd.

2.1.1 Monstername watermonsters

Watermonsters worden genomen van bedrijven en uit het veld. Het water wordt opgevangen in gamma steriele plastic zakken. De zakken moeten voor gebruik worden open gescheurd langs een geperforeerde rand. Met de zak schept men het monster-water op of men houdt de zak onder de waterstraal, welke uit de UV installatie komt. Door de lipjes aan de buiten kant van de zak beet te pakken en de zak rond te draaien sluit de zak zich.
Er moet echter wel opgelet worden dat het monsterwater niet te troebel, zanderig is. Wanneer dit het geval is krijg je een valse indicatie van de watergesteldheid doordat aan de zandkorrels bacteriën kunnen kleven waardoor je misschien een vals positieve uitslag krijgt. Tevens duurt het affiltreren erg lang doordat het filter dicht slibt.

2.1.2 Monstername van schelpdieren

Schelpdieren worden op verschillende manieren gemonsterd. Monsters van uit het bedrijf, oesterputten, Voordelta, Westerschelde, Grevelingen en Oostelijke Waddenzee worden met de hand gemonsterd. Monsters uit de Oosterschelde en Westelijke Waddenzee worden van af een boot met een kleine kor van de bodem geschraapt.

Mosselen: Monsters van het bedrijf kunnen worden ingedeeld in aanvoer mosselen en consumptie mosselen.

Aanvoer van mosselen betekent dat de mosselen van de verwater percelen "het nat-pakhuis" [1] naar het bedrijf zijn getransporteerd. Hier worden de mossels verder verwerkt. Consumptie mosselen zijn mosselen welke zijn verwaterd en schoongemaakt. Deze mosselen zijn klaar om te worden verkocht aan winkels en/of particulieren.

Door aanvoer en consumptie mosselen te monsteren kan men het verwaterproces controleren. Er mogen immers maar 300 Faecale coliformen per 100 ml mosselvlees/vocht voorkomen.

Aanvoer mosselen worden gemonsterd door mensen van het des betreffende bedrijf, consumptie mosselen moet door het RIVO zelf worden gemonsterd. De mosselen worden van de lopende band opgevangen in een plastic zak welke van te voren is gecodeert. Er worden 12 mosselen gebruikt voor laboratorium onderzoek.

Monsters vanuit het veld worden in dezelfde soort zakken verzameld en tijdens het vervoer in een koelbox koelgehouden.

Bij alle monsters wordt het tijdstip, watertemperatuur en lokatie van monstername opgeschreven.

Oesters : Om het verwater-water in de oesterputten te kunnen controleren worden netjes met hierin 12 oesters in de oesterputten geplaatst. Na x aantal uren worden de oesters uit de netjes gehaald en in de van te voren gecodeerde zakken gedaan. Tevens stopt men nieuwe oesters in de netjes voor de volgende keer.

De watertemperatuur wordt gemeten door een thermometer in het water te hangen en de temperatuur na enige tijd af te lezen.

---

[1] Nat-pakhuis is de opslagplaats van mosselen in de Oosterschelde van de mosselverwerkingsbedrijven. Hier slaan de bedrijven de op de veiling gekochte mosselen op, zie bijlage 2.

Bij aankomst op het laboratorium worden de genoteerde gegevens op de invulformulieren geschreven en de monsters worden direkt in de koelkast geplaatst.

De laatste jaren neemt het aanbod van Japanse oesters (Crassostrea gigas) toe daarentegen neemt het aanbod Europese platte oesters (Ostrea edulis) enorm af. Dit komt omdat de Europese platte oester wordt geteisterd door de ziekte Bonamia ostreae. Als vervanging is men overgestapt op de Japanse oester, welke momenteel in groten getale voorkomt.

Kokkels : Kokkels worden gemonsterd door met je hand in het zand te wroeten. De kokkels bevinden zich circa vijf centimeter onder het oppervlak.
Er zijn ook handkorretjes, welke je door ondiep water achter je aan trekt. De kor schraapt een laagje van de bodem met hierin, als het goed is, schelpdieren.
Er worden zo 'n 20 kokkels per monsterlokatie genomen voor onderzoek. Ook hier noteert men de tijd, datum en watertemperatuur.
Spisula's worden op de zelfde manier of van boord met een bodemhapper gemonsterd. Omdat het Spisula bestand in Nederland sterk is afgenomen worden er vrijwel geen Spisula's aangeboden en gebruikt voor laboratorium onderzoek.

2.1.3 Monstername van sediment

Met een kleine bodemhapper wordt sediment in tweevoud gemonsterd op de lokaties waar mosselen aanwezig zijn. Hiervoor zijn de percelen Yerseke-Bank 100 en Yerseke-Bank 185 gekozen. Het sediment wordt aan boord van het schip gebracht en op een rek geplaatst. De bovenste laag van het sedimentmonster wordt bestudeerd op aanwezigheid van mosselen en andere levensvormen zoals zeesla. Het hele monster wordt op de structuur bekeken voornamelijk naar slib en veenlagen. Met een "steriele" lepel wordt sediment van de "toplaag" genomen en in een "gamma" steriele plastic beker gebracht.

2.2 Werkwijze laboratoriumonderzoek

Voordat het onderzoek aanvangt wordt de werkomgeving en hulpmiddelen goed schoongemaakt met alcohol. De petrischalen en Stomacherzakken worden gecodeerd.

2.2.1 Laboratoriumonderzoek van watermonsters.

Voor bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater maken we gebruik van het voorschrift NEN 6570, zie bijlage 3.

Benodigdheden:

- Lauryl-Sulfaat-Agar (LSA);
- Briljant-Gal-Laktose-bouillon (BGL);
- Fysiologische zoutoplossing;
- Alcohol (70%)
- Broedstoof 44 ± 0,5°C;
- 3-delig afzuig-unit.
- Steriele membraan-filters (Millipore 0,45 µm)

Voorbereidend werk: De LSA en de BGL worden net als de Fysiologische zoutoplossing geleverd door Hospidex. Dit houdt in dat de LSA en de BGL in de des betreffende petrischalen en buizen moet worden uitgegoten. Het uitgieten van de bodems en buizen gebeurt allemaal in de Laminair air-flowkast, voor bediening Laminair airflowkast zie bijlage 1.

Werkwijze filtratie watermonster:

- Zet het 3-delig afzuig-unit-systeem in gereedheid.
- Breng in elke filtreerunit 70% alcohol voor desinfectie, laat de opstelling ± 1/2 uur in deze situatie staan voor de filtratie.
- Voor filtratie alcohol wegzuigen, spoel de filtreerunits goed met steriele fysiologische zoutoplossing. Haal de trechters van het systeem.
- Doop het pincet in een bekerglas met 70% alcohol en flambeer het pincet in een vlam alvorens je het membraanfiltertje grijpt. (Vòòr en ná filtratie van het monster!)
- Met het minst verontreinigde monster (na geachte verontreinigings-reeks) wordt gestart.
- Na plaatsing membraanfilter, de trechter op de unit plaatsen.
- Schud het watermonster zodat het uitgezakte materiaal weer door de vloeistof is gesuspendeerd.
- Giet 200 ml watermonster in de trechter. Zuig de vloeistof af en spoel de trechter na met fysiologische zoutoplossing.

- Haal de trechter van de unit en leg het membraanfilter met residu op een eerder bereide LSA-voedingsbodem.
  (De LSA-voedingsbodem moet wanneer hij uit de koelkast komt eerst worden voorgedroogd, 20 minuten bij 54°C.)
- De petrischalen worden omgekeerd geplaatst in een plastic zakje en in de koelbroedstoof gelegd waarna programma 1 wordt gestart, zie voor bediening koelbroedstoof bijlage 1.
- Wanneer alle monsters zijn behandeld, de opstelling met fysiologisch zoutoplossing doorzuigen.
- De trechters en plastic ringen met leidingwater spoelen en in een sopje plaatsen voor 24 uur.
- Met leiding- en demiwater spoelen, zodat ze klaar staan voor de volgende reeks filtraties.

Na 24 uur kunnen de platen worden afgelezen:

- Tel de gele (Coliformen) kolonies op het filtertje en reken het om naar het aantal per 100 ml watermonster.

  formule: (n / V) x 100 = per 100ml

  n = totaal aantal getelde gele kolonies

  V = volume watermonster gegoten in trechter

  Voorbeeld: aantal getelde gele kolonies is 24

  volume watermonster is 200ml

  24/200=0,12

  0,12 x 100 = 12 coliformen/100ml.

- Bij twijfelgevallen bv: oranje gekleurde kolonies wordt een aanvullende bepaling uitgevoerd, zie bevestiging.

Bevestiging:

- Kolonie enten in BGL en 24 uur bebroeden bij 44 ± 0,5°C. in koelbroedstoof (programma 1 van de koelbroedstoof, zie bijlage 1).
- Na 24 uur kan de BGL worden afgelezen.

Het is een Coliform, indien het volgende gaande is:

- troebel media.
- gasvorming in het duran-buisje.

Afval, zoals LSA en BGL worden gesteriliseerd in de autoclaaf, zie voor bediening autoclaaf bijlage 1.

2.2.2 Laboratoriumonderzoek schelpdiermonsters

Hieronder volgt een korte samenvatting van de werkwijze voor schelpdiermonster onderzoek. Zie voor uitgebreide werkwijze bijlage 1.

Werkwijze:- Maak 12 schelpdieren per monster schoon, verwijder slippers en eventueee andere organismen.
- Steek de schelp open en vang het schelpdiervlees en -vocht op in een steriele Stomacherzak.
- Verdun het monster met de dilutor 3 maal.
- Laat de verdunning 1 minuut in de Stomachter behandelen.
- Pipetteer 10 ml uit de Stomacherzak en pipetteer in 5 steriele petrischalen 2 ml suspensie zodat 10 ml over vijf platen is verdeeld.
- Giet op alle platen Mac. Conkey agar. Meng dit goed door achtjes te draaien.
- Wanneer Mac. Conkey agar is gestold moet er nog een deklaagje Mac. Conkey agar worden gegoten.
- Bebroed de platen gedurende 24 uur in de koelbroedstoof op programma 1.

Aflezen platen:
- De donker rode kolonies met een rood hof zijn de F.C.
- Reken het gevonden aantal om naar of F.C./100ml of F.C./ml.

F.C.= Faecale coliformen.

formules: FC/100ml = n x 3 x 10
FC/ml = n x 3 / 10
n = aantal getelde F.C.
3 = verdunningsfactor

voorbeeld: aantal getelde F.C. is 5.
5 x 3 x 10 = 150 FC/100ml
5 x 3 / 10 = 1,5 FC/ml

Bij twijfel wordt er een bevestiging in gezet, dit is een zelfde bevestiging als bij de watermonsters.

Ook hier wordt al het afval, Mac. Conkey agar platen en BGL, gesteriliseerd in de autoclaaf.

2.2.3 Laboratoriumonderzoek van sediment

Na een voorbehandeling van het sedimentmonster wordt dezelfde werkwijze toegepast als die van het watermonster, op de 3-delige afzuig-unit-systeem.

Voorbehandeling sediment-monster

- Het sediment in het bekertje moet goed worden gemengd waarna met, een met alcohol gesteriliseerde lepel wat sediment uit het bekertje wordt genomen zodat er ongeveer 3 kleine 'schepjes' in het bekertje achterblijven.
- Met een steriele 100 ml maatcylinder wordt 100 ml 0,9% fysiologisch zout aan het bekertje gevoegd. Na goed het bekertje te sluiten wordt deze gedurende circa 20 seconde krachtig geschud.
- Na 15 minuten, als veel sediment is uitgezakt, wordt 25 ml van de bovenstaande vloeistof met een steriele 25 ml volumepipet overgebracht naar een reeds opgestelde filtreereenheid en behandeld volgens dezelfde werkwijze als 2.2.1 laboratorium-onderzoek van watermonsters.
- De bevestigingsreactie is ook dezelfde als die van de watermonsters, 2.2.1.

Omdat het sediment in tweevoud per locatie is genomen, moeten de bekertjes genummerd worden met 1 en 2.

Het aantal getelde gele kolonies, Faecale Coliformen, wordt uitgedrukt in F.C. per 25 ml. Dit wordt ook op het desbetreffende formulier ingevuld. Er hoeft in dit stadium nog niets worden omgerekend.

Nu rest alleen nog het afwegen van het sediment in het bekertje.

- Laat de bekertjes met het aanwezige sediment en fysiologisch zout nog 12 á 14 uur op de tafel staan totdat het sediment goed is uitgezakt.
- Zuig met behulp van een waterstraalpomp de bovenstaande vloeistof af.
- Weeg op de bovenweger het leeggewicht van de te gebruiken allluminiumfolie-bakjes, welke zijn gecodeerd met dezelfde codes van de monsters.
- Breng het sediment vanuit het bekertje over in de correspondeerende allu-miniumfoliebakje en zet deze in een stoof van 70°C.
- Na 24 uur is de stoof van 70°C moeten de bakjes gedurende 2 uur in een exsicator worden geplaatst waarna de bakjes worden gewogen op de bovenweger.

Aan de hand van het gewicht van het monster het aantal F.C. per 100 gram sediment worden berekend.

De formule voor het omrekenen luidt als volgt:

F.C./100 gram sediment = ((n x 4) / gew.) x 100

n = het gevonde aantal Faecale Coliformen per 25 ml fysiologisch. zout.

gew. = is het berekende gewicht van het sediment.
gew. = foliebakje vol - foliebakje leeg

Bijvoorbeeld: Het aantal gevonden F.C. is 6.
Leeg-gewicht van het foliebakje is 50,0 gram.
Vol-gewicht van het foliebakje is 135,0 gram.

gew. = 135,0 gram - 50,0 gram = 85,0 gram
((n x 4) / gew.) x 100 = ((6 x 4) / 85,0) x 100 = 28 F.C./100 g sed.

2.3 Verwerking van de resultaten

De resultaten worden, na omrekening tot gewenste eenheid, ingevuld op de desbetreffende invulformulieren.
De uitslagen van de watermonsters worden weergegeven in F.C./100ml, de uitslagen van de schelpdiermonsters worden weergegeven in F.C./ml of F.C./100ml mosselvlees en vocht.
Zoals reeds vermeld is worden de resultaten op invulformulieren genoteerd, zie voor voorbeelden invulformulieren bijlage 4.

Wanneer er een overschrijding in een monster wordt geconstateerd dan worden de debetreffende instanties zo snel mogelijk ingelicht (via telefoon en/of fax). Er wordt dan meteen gevraagd of er moet worden herbemonsterd.
Herbemonstering is niet altijd mogelijk, dit in verband met tij en het weer. Ook het herbemonsteren door de verschillende opzieners lukt niet altijd.

De resultaten voor het PVis worden verzonden in een brief waarin tevens de resultaten staan van het onderzoek naar fytoplankton (DSP, PSP en ASP). Zie voor brief PVis bijlage 4 blad 4.

2.4 Bijzonderheden

Tijdens het onderzoek naar faecale coliformen in schelpdieren kom je soms andere 'bijzondere' organismes tegen in of op de schelp. Twee belangrijke organismen welke men aan kan treffen in mosselen en oesters zijn respectievelijk het erwtenkrabje en de borstelworm.

2.4.1 Het erwtenkrabbetje

Het erwtenkrabbetje (Pinnotherese pisum) ook wel mosselteek, teek, mosselkrabbetje en oesterkrabbetje genoemd. De naam erwtenkrabbetje houdt ongetwijfeld verband met de bolronde vorm van het vrouwelijke erwtenkrabbetje. Zij doet denken aan zo'n grote erwt. De volksnaam mosselteek dankt het aan zijn onderdak in mosselen.



5 mm 2 mm

Afbeelding 5: Pinnotheres pisum, links vrouwtje; rechts het kleinere mannetje.

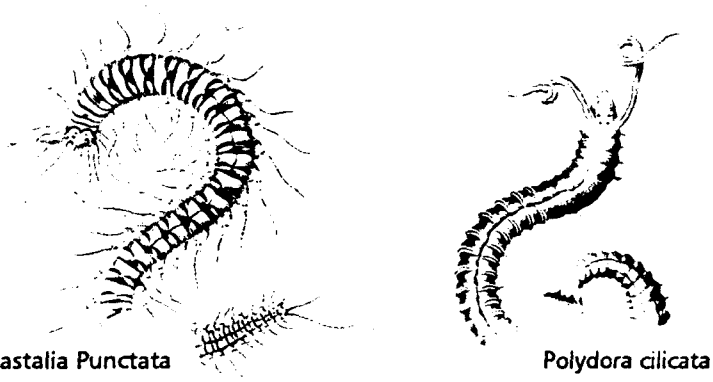
De vrouwtjes zijn niet erg mobiel en zullen hun gastheer niet snel verlaten. Hierdoor komt men vooral de vrouwelijke vorm tegen in de mosselen. Zowel haar loop- en schaarpoten als haar ogen zijn klein in vergelijking met het mannetje en met andere krabben. Voor het bewonen van de gastheer zijn ze ook minder belangrijk. Het mannetje wordt vaak buiten zijn gastheer waargenomen en kan met behulp van zijn behaarde looppoten goed zwemmen. Het mannetje heeft ook niet zo'n ronde vorm. De vrouwtjes zijn meestal meer dan twee maal zo groot als de mannetjes. (B.G. Otten 1989)

2.4.2 De borstelworm

De borstelworm (Polychaeta) is een klasse welke behoort tot de gesegmenteerde wormen (Phylum Annelida). Tot de klasse Polychaeta behoren vele families waarvan de Spionidae de bekendste is. Polydora ciliata, behorende tot deze familie der Spionidae, komt waarschijnlijk het talrijkste van alle borstelwormen voor in onze kustwateren.
Larven van Polydora zoeken enige tijd nadat ze uit het eitje zijn gekomen een geschikt plaatsje om zich te vestigen en bouwen daar een dun buisje van hele kleine zandkorreltjes en slibdeeltjes. In deze woonbuis kunnen ze zich terugtrekken als er gevaar dreigt. Wanneer alles rustig is worden de lange rekbare tentakels uitgestoken en deinend rondgezwaaid op zoek naar voedsel, dat uit zeer kleine partikeltjes bestaat. Daar de Polydora voor vele andere organisme als voedsel dient zoekt hij vaak zijn onderkomen in spleten en nissen van een oesterschelp.

Aanvankelijk zullen die wel diep genoeg zijn, maar naarmate Polydora groeit, moet de schuilplaats dieper worden, door de schelp aan te boren. Dit doet hij met behulp van enkele stevige, dikke rugborstels en een zuur secreet, dat kalksteen week maakt.

Als de oester rustig in het water ligt, steekt Polydora zijn kopje met de tentakels uit het buisje om zwevend voedsel te verzamelen. De Polydora boort zich steeds dieper in de schelp waardoor het kan gebeuren dat hij de binnenkant van de schelp bereikt. Door het gaatje in de schelp komen allerlei ongerechtigheden, uitscheidingsprodukten en slibdeeltjes in aanraking met het tere weefsel van de oester. Doormiddel van het vormen van een dun kalklaagje over de perforatie probeert de oester zich te beschermen tegen dit ongewas. Het kalklaagje heeft zijn werking maar voor korte duur doordat de Polydora, zonder echte kwade bedoelingen, deze weer doorboort. De oester blijft proberen de perforatie te dichten met kalklaagje en een groene hoornachtige substantie. Dit vergt echter veel energie van de oester, waardoor de oester steeds zwakker wordt. Vooral wanneer er meerdere Polydora's zijn schelp als schuilplaats hebben gekozen. (Dr P. Korringa 1951)



Castalia Punctata Polydora cilicata

Afbeelding 6: Twee verschillende soorten borstelwormen.

Gevolgen van een zware Polydora-infectie zijn:

- Schelpen, bewoond door vele tientallen Polydora's, worden uitermate bros en breken licht bij het inpakken van de oesters.
  Dit kan tot klachten leiden bij de afnemers, vooral als een vat oesters enige dagen bewaard blijft.
- De binnenzijde van een oesterschelp moet blank en glanzend zijn, vooral van de onderschelp, waarop de oester geserveerd wordt. Groengele plakkaten ontsieren de schelp in niet geringe mate.
  Nog erger zijn de modderkamers van de Franse Polydora, vooral als deze bij het opensteken van de schelp gekwest worden, zodat de kwalijk riekende modder bloot komt te liggen of als de modder slechts door een dun vliesje schelpmateriaal overdekt is.

- Polydora remt de groei van de oester.

  Waar veel Polydora wordt aangetroffen, vindt men vele oesters, die slechts weinig gegroeid zijn en die een "stompe" oesters indruk maken.

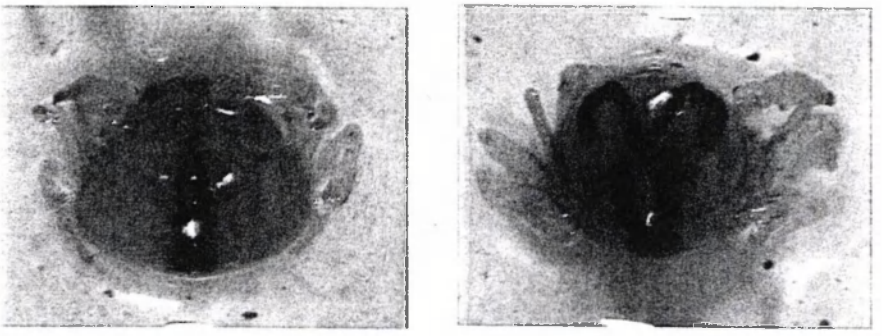
- Zwaar door Polydora aangetaste oesters hebben vaak een magere of waterachtige vis.

  De voortdurende strijd van de oester tegen binnendringende en de schelp perforerende Polydora's vergt stellig veel van zijn krachten. Het is dan ook geen wonder, dat bij zware aantasting vaak blijkt, dat niet alle oesters behoorlijk vet geworden zijn. Bij een matige aantasting bemerkt men eerder achterblijven van de groei dan het optreden van magere vissen.

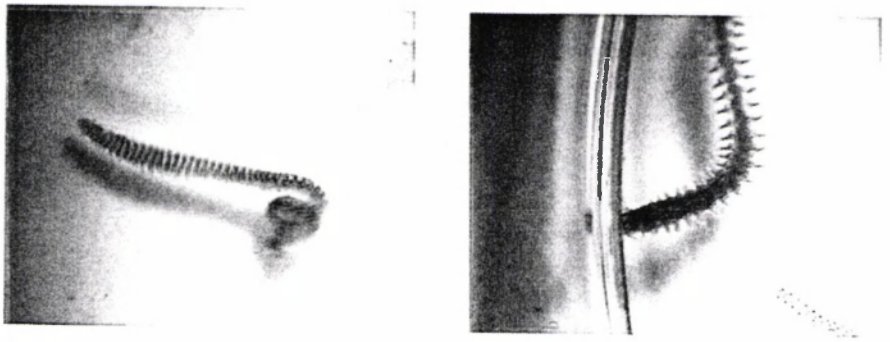
- De strijd van de oester tegen Polydora kan zijn weerstand tegen andere ongunstige invloeden verzwakken.

  De weerstand tegen infecties van microörganismen wordt naar gelang de grote van de Polydora-infectie kleiner.(Dr P. Korringa)

Fotoserie 1: Erwtenkrabje (Pinnotheres pisum), vrouwlijke vorm.



Fotoserie 2: Borstelwormen



3 OPDRACHTEN

Tijdens mijn stage heb ik twee opdrachten gekregen, één theoretische en één praktische opdracht. De theoretische opdracht was het schrijven van een concept-protocol voor STERLAB certificatie. De praktische opdracht was het onderzoeken van de atypische kolonies op de Mac.Conkey agar.

3.1 Het schrijven van een concept voor STERLAB certificatie.

Sinds enkele jaren kunnen laboratoria in Nederland worden gecertificeerd. Hiervoor is in 1986 STERLAB opgericht. Certificering waarborgt dat het laboratoriumonderzoek voldoet aan de moderne eisen van kwaliteitsborging. De erkenning zal ook voor microbiologische laboratoria steeds belangrijker worden. De opdrachtgever zal de garantie willen hebben dat het onderzoek goed uitgevoerd is, met name wanneer uitslagen verstrekkende gevolgen kunnen hebben.
Daarnaast kan het in het kader van de nieuwe wetgeving produktaansprakelijkheid voor producenten van belang zijn dat de controle wordt uitgevoerd door een erkend laboratorium.

Momenteel heeft STERLAB aan meer dan 30 laboratoria een certificaat uitgereikt, waaronder enkele laboratoria welke werkzaam zijn op het gebied van de levensmiddelen-microbiologie.
De laboratoria worden getoetst op:

- organisatie van het laboratorium;
- documentatie van de werkwijze;
- voorzieningen;
- kwalificatie van het personeel;
- registratie van waarnemingen;
- rapportage, en
- archivering. (Ir. H. Stegeman 1991)

Omdat het RIVO-DLO steeds commerciëler gaat worden is het belangrijk om, voor de verschillende laboratoria ressorterende onder het RIVO, zo'n certificaat toegekend te krijgen. Voordat dit zo ver is moet eerst aan boven genoemde punten worden voldaan.

Aan het creëren en handhaven van een kwaliteitssysteem is een kwaliteitshandboek verbonden. Wanneer een handboek doelmatig is, moet de indeling aan bepaalde eisen voldoen. De voorbereiding van een kwaliteitssysteem en de opstelling van een handboek vereisen ruime aandacht en tijd van alle betrokkenen in een laboratorium.

Mij is gevraagd om een protocol te schrijven voor de telplaatmethode voor het kwantificeren van Faecale Colibacteriën in schelpdiervlees- en vocht. Alle apparaten en handelingen moeten hierin uitvoerig worden besproken.
Dit resulteerde in een uit 38 pagina's bestaand protocol. Dit protocol is opgestuurd naar het hoofdkantoor in IJmuiden, waar de kwaliteitsmanager het protocol heeft gecontroleerd en bekritiseerd. De conclusie was dat alle apparaten welke ik heb besproken, in apparte protocollen moeten worden omschreven, zodat er alleen naar gerefereerd hoeft te worden.
Zie bijlage 1 Protocol: Telplaatmethode voor het kwantificeren van Faecale Colibacteriën in mosselvlees- en vocht.

3.2 Onderzoek van de atypische kolonies op de Mac.Conkey agar

Zoals al reeds vermeld is, wordt het media, dat wij gebruiken, geleverd door het bedrijf Hospidex. Bij elk media wordt per batch een kwaliteits-certificaat geleverd. Dit certificaat krijgt het media wanneer hij een goede ecometrie heeft. Zo ook de Mac.Conkey agar, deze krijgen we geleverd in flesjes van ± 200 ml. Door de flesjes op te koken in de magnetron is de Mac.Conkey agar gebruiks klaar om gegoten te worden.
Door het steeds in aantal groter worden van atypische kolonies op de Mac.Conkey agar is de vraag gegroeid of de Mac.Conkey agar wel selectief genoeg is. Soms is het verschil tussen zo'n atypische kolonie en een kolonie Faecale Coliformen erg klein, waardoor er een bevestiging moet worden ingezet.

Een artikel uit Nieuwsbrief Nr.7 (oktober 1995), bijlage 5, berichte over kwalitatief slechte voedings-bodems. Er wordt gezegd dat de mediabereider een grote rol speelt bij de kwaliteit. Hiermee bedoelt men dat de media-bereiding niet volgens goede richtlijnen wordt gedaan. Met name het schoonspoelen van de slangen is niet juist. Doordat er resten media in de slangen blijven komen deze stoffen bij het bereiden van een ander medium samen waardoor de eigenschappen van dit medium veranderen.

Mijn opdracht was dan ook het onderzoeken van de atypisch kolonies op de Mac. Conkey agar geleverd door Hospidex. Onderzocht moest worden welke bacteriën op de Mac.Conkey agar groeien. Aan de hand hiervàn kan worden onderzocht of de Mac. Conkey agar een goede selectiviteit heeft.

De hoofdlijn, welke ik gevolgd heb, is als volgt:- determineren kolonies van K3, K4, Barbé en Verwijs.
- Mac.Conkey agar vergelijken met zelf gemaakte Mac.Conkey agar.

3.2.1 Determineren kolonies van K3, K4, Barbé en Verwijs.

K3 en K4 zijn twee monsterlokaties waar relatief gezien de grootste kans is op het aantreffen van atypische bacteriën. K3 (KOM 3) en K4 (KOM 4) liggen in de bedrijfsgeul, het zijn mosselen welke worden uitgehangen in netjes aan boeien.
Aan de bedrijfsgeul liggen de verschillende in en afvoer punten voor proceswater van de verschillende bedrijven. Het afvoer-water bevat veel dierlijke eiwitten, ook zijn er verschillende populaties meeuwen en aalscholvers in het gebied aanwezig. Onderzoek heeft aangetoond dat de uitwerpselen van deze vogels een grote invloed hebben op het aantal bacteriën. Het is dus begrijpelijk dat hier het totaal aantal microörganismen hoger ligt dan op de kweekpercelen.

Barbé en Verwijs zijn twee monsters van de bedrijven Barbé BV. J. en Krijn Verwijs B.V. Deze monsters zijn genomen na verwateren. Het verwateren gebeurt met water uit de bedrijfsgeul. Het water wordt eerst gefilterd waarna het water door een UV installatie wordt geleid. Het aantal bacteriën en virussen is nu, bij een goede werking van de UV installatie, sterk afgenomen. De mosselen welke gemonsterd worden bevatten dus relatief gezien minder bacteriën dan de mosselen van K3 en K4.

Naast de Mac.Conkey geleverd door Hospidex heb ik een zelf gemaakte Mac. Conkey in de reeks (K3, K4, Barbé en Verwijs) meegenomen. De zelf gemaakte Mac. Conkey is bereid volgens de gebruiksaanwijzing van Oxoid, ik heb ook de Mac. Conkey agar nr.3 van Oxoid gebruikt, zie bijlage 6. Hospidex gebruikt dezelfde agar en dezelfde gebruiksaanwijzing (In die van Hospidex zit meer agar om de voedingsbodem steviger te maken), De pH van de RIVO Mac.Conkey is gesteld met NaOH op precies 7,1 voor het autoclaveren. Na autoclaveren is de pH ± 6,9.

Voor determinatie heb ik gebruik gemaakt van: gram-kleuring
KOH-test
spore-kleuring
hangende-druppel preparaat
API 20-E
API 20-NE
katalase-test
oxidase-test

Resultaten kweek Mac.Conkey (Hospidex en zelf gemaakte)

In het vervolg gebruik ik afkortingen voor de verschillende Mac. Conkey agars, nl.
Mac.Conkey agar van Hospidex = Hospi-agar;
Zelf gemaakte Mac.Conkey agar = Rivo-agar.

Op de Hospi-agar zijn aanzienlijk meer atypische kolonies gegroeid dan op de Rivo-agar. Ook zijn de Faecale Coliformen (F.C.) kolonies op de Rivo-agar duidelijker af te lezen doordat ze groter zijn dan op de Hospi-agar. In tabel 1 zijn de gevonden aantallen atypische en F.C. per monster lokatie weergegeven.

Tabel 1. Overzicht gegroeide kolonies op Hospi-agar en Rivo-agar.

De aantallen zijn in KVE/ml uitgedrukt.

Voedingsbodem	aantal F.C. kolonies/ml	aantal atypische kolonies/ml
RIVO-Mac. Conkey K3	0.3	1.8
Hospi-Mac. Conkey K3	0.6	66.3
RIVO-Mac, Conkey K4	1.5	2.1
Hospi-Mac. Conkey K4	2.4	96.6
RIVO-Mac. Conkey Barbé	0.9	0
Hospi-Mac. Conkey Barbé	0.9	0
RIVO-Mac. Conkey Verwijs	0.3	0
Hopsi-Mac. Conkey Verwijs	0	0

De atypische kolonies zijn gerangschikt naar grootte, vorm en kleur in 8 verschillende soorten. Van de monsters K3 en K4 is elke soort in duplo geïsoleerd op Nutriënt agar. Het bleek echter dat sommige van de 8 soorten tot één soort behoorden morfologisch gezien op de nutriënt agar. Toch zijn alle geïsoleerde kolonies appart gedetermineerd.

Met behulp van de verschillende determinatie technieken heb ik geprobeerd om de verschillende kolonies te determineren. Het is echter niet gelukt om alle bacteriën te determineren, er is één soort welke vastliep deze heb ik dan ook staaf X genoemd.
De soorten die ik tot de familie of zelfs tot het soort heb gedetermineerd zijn:

- Citrobacter freundii
- Providencia stuartii
- Micrococcaceae
- Corynebacteria
- Corynebacteria/Listeria

Op de Rivo-agar zijn naast de faecale coliformen ook Citrobacter freundii en Providencia stuartii gegroeid.Op de Hospi-agar zijn naast deze ook nog Micrococcaceae, Corynebacteria, Corynebacteria/Listeria en staaf X gegroeid.

Zie voor aantallen gegroeide bacteriën bijlage 7.

Conclusie: 100 % van de op de Rivo-agar gegroeide bacteriën mag hier ook daadwerkelijk op groeien. De Faecale Coliformen zijn duidelijk te onderscheiden van de 'eventuele' atypische.

Slechts 2 % van de op de Hospi-agar gegroeide kolonies mogen hierop groeien. De overige 98% mag hier niet op groeien, dit tenopzichte van de Rivo-agar.

Van deze 98% is:
- 19,3% gram positieve coccen, welke behoren tot de Micrococcaceae;
- 14,0% behoort tot Corynebacteria/Listeria achtige (ligt aan de beweeglijkheid);
- 2,7% behoort tot de Corynebacteria;
- 62,0% behoort tot een gram negatieve staaf (staaf X)

Ook blijkt dat UV licht atypische bacteriën beter afdood dan Faecale coliformen. De monsters Barbé en Verwijs welke verwaterd zijn met het UV behandeld water bevatten vrijwel geen atypische kolonies.

Mijn hypothese hierover is: omdat de Mac.Conkey een selectief medium is, groeien de atypische bacteriën er toch minder goed op. Wanneer ze dan nog eens na UV-behandeling zijn beschadigd is revalidatie op een Mac.Conkey niet meer mogelijk.

3.2.2 Vergelijking Rivo-agar met Hospi-agar

Om presenteerbare getallen te krijgen heb ik naast de normale reeks monsters op Hospi-agar een reeks mee genomen op Rivo-agar. Het aantal monsters bedraagt 19. Ik heb de atypische kolonies niet gedetermineerd. Ik heb geprobeerd op deze manier het verschil tussen Rivo-agar en Hospi-agar op een betrouwbare manier aan te tonen.

Resulaten:

Het aantal atypische op de Hospi-agar bedraagt 2871 kolonies verspreid over de 19 monsters. Dit is gemiddeld 151,1 atypische bacterie per monster. Het aantal Faecale Coliformen bedraagt 87, dat is gemiddeld 4,6 Faecale coliformen per monster.

Het aantal atypische op de Rivo-agar is 8, gemiddeld 0,6 atypische per monster. Het aantal Faecale Coliformen bedraagt 88, gemiddeld zo'n 4,6 Faecale Coliformen per monster.

3.2.3 Eindconclusies uit onderzoek atypische op Mac.Conkey agar (geleverd door Hospidex)

- De selectiviteit van de Mac.Conkey-agar, geleverd door Hospidex, is ronduit slecht Gemiddeld ligt het percentage atypische op de Mac.Conkey-agar op 97,1%. Terwijl de eigengemaakte Mac.Conkey-agar zo'n 8,3% atypische bevat.
- Op de Mac.Conkey-agar van Hospidex groeien zelfs gram positieve coccen (Micrococaceae), dit zou volgens de beschrijving van Oxoid niet mogen.
- De Faecale Coliformen op de Hospi-agar zijn kleiner in verhouding met de Faecale coliformen op de Rivo-agar. Dit maakt het aflezen moeilijker.

De aanbeveling is dan ook om een andere leverancier te zoeken voor de media. Vraag proefmedia, zet de media van de verschillende bedrijven naast elkaar neem ook een zelf gemaakt medium (in dit geval Mac.Conkey nr.3) mee. Beënt ze met Faecale Coliformen en atypische bacteriën, kijk welke de duidelijkste Faecale Coliformen produceert en de minste atypische kolonies.

4 EVALUATIE STAGE

Het RIVO-DLO als stageplaats betekent voor mij een niet medische stage met een biologisch tintje. Dit is logisch, omdat het instituut een controlerende en onderzoekende plaats inneemt in de biologie. Het geeft mij een geheel nieuwe uitgangspunt van de microbiologie.

De stof welke ik geleerd heb sluit naar mij idee goed aan op de handelingen welke ik mocht uitvoeren. Ook het vak VWR (Verwerking van Waarnemings-Resultaten) is mij tot nut geweest, dit omdat ik een protocol moest schrijven voor STERLAB certificatie. Het schrijven van dit protocol heeft mij bekend gemaakt met verschillende apparaten en handelingen.
Het onderzoek atypische op de Mac. Conkey is mij ook zeer goed bevallen. Het vergde een goede kennis van de verschillende determinatie technieken en interpretatie van deze technieken.
Ook het monsteren in het veld was leuk, dit komt waarschijnlijk omdat we alleen met goed weer hebben gemonsterd. In de wintermaanden is het veldwerk overgenomen door Cora en Jeanet, twee medewerkers van het RIVO.

De vrijheid en 'verantwoordelijkheid' welke ik heb gekregen gedurende mijn stage is mij als zeer goed ervaren. Ook de samenwerking en omgang met de verschillende personen liep prima. Wanneer ik een vraag had werd ik vrijwel meteen met enthousiasme geholpen.

Kortom RIVO-DLO als stageplaats is naast leuk ook leerzaam. Je krijgt vrijheid en 'verantwoordelijkheid' wanneer men denkt dat je dat aankan.

Literatuurlijst

- Gool, A.C.M. (1995). Stageplaats bij het RIVO, Afd. Aquacultuur te Yerseke.
- Groot, B; Dijkema, R; Redant, F. (1988). Bivalvia (tweekleppige). Vis, Schelp- en Schaaldieren, pagina 94 t/m 104.
- Korringa, P. (1951). Polydora als vijand van de oestercultuur, 2e supplement van "Visserij-nieuws" 3e jaargang Nr. 10.
- Otten, B.G. (1989). Het erwtenkrabbetje terug van weggeweest? Het zeepaard, pagina 130 t/m 132.
- Stafafdeling In- en Externe Communicatie DLO, (1995). Zicht op DLO 1996.
- Stegeman, H. (1991). Symposium certificering van microbiologische analyses. De ware(n) chemicus, 21e jaargang Nr 1.

Bijlage 1: Protocol: Telplaatmethode voor het kwantificeren van Faecale Colibacteriën in schelpdiervlees- en vocht.

RIVO-DLO,
Haringkade 1
1976 CP IJmuiden
tel: 02550-64646

ISW nr: #####

Telplaatmethode voor het kwantificeren van Faecale Colibacteriën in mosselvlees- en vocht.

Opgesteld door: J. Vellinga

Goedgekeurd door: paraaf:

####################
....., kwaliteitsmanager

Uitgegeven door: paraaf:

####################
....., kwaliteitsmanager

OPMERKING:
Dit erkend voorschrift mag niet worden gekopieerd, eventueel extra exemplaren zijn te bevragen bij de kwaliteitsmanager.

ISW nr: ######
versie: 01
Uitgiftedatum: ######

1 Onderwerp

In dit voorschrift wordt een methode beschreven voor de kwantitatieve bepaling van faecale coliformen (f.c.) in mosselvlees- en vocht. De gevonden getallen worden vergeleken met de norm die wordt gesteld voor schelpdierwater. Een conclusie kan gesteld worden of een waterkwaliteit onder of boven de norm ligt. De mossel fungeert in feite als indicator-organisme om de kwaliteit van het water te meten over een langere periode. De thermotolerante faecale coli is op zijn beurt weer een indicator-organisme voor de aanwezigheid van ziekteverwekkende bacteriën, pathogenen, zoals Salmonella.
Een advies wordt uitgebracht van een bepaald watergebied kijkend naar de gemeten kwaliteit en factoren als aanwezigheid van spuilocaties van RWZI's / gemalen en sluizen, aanwezigheid meeuwen.

2 Toepassingsgebied

De bepalingen kunnen worden gedaan met verschillende monsters, zoals mosselen, oesters of kokkels. In principe kan elk willekeurig tweekleppige weekdier worden gebruikt.
De monsters komen vanuit het bedrijfsleven en de natuur. Monsters vanuit het bedrijfsleven dienen voor controle op de kwaliteit van de mosselen en/of de kwalitiet van het spoelwater. Monsters uit de natuur dienen voor controle op de kwaliteit van de kweekpercelen en van het water, bv bij gemalen en/of sluizen.

3 Termen en defenities

Faecale coliformen (f.c.) : facultatief aerobe, gram-negatieve, niet-sporevormende, cytochrome oxydase-negatieve, staafvormige bacteriën die in staat zijn om lactose te fermenteren met produktie van gas in aanwezigheid van galzouten of andere oppervlakte-actieve agentia met soortgelijk groeiremmende eigenschappen, bij 44° + 0,2°C na ten minste 24 uur.
E.coli: : faecale coliformen die indol vormen uit tryptofaan bij 44° + 0,2°C na 24 uur.

Slikmossels : (ook wel slikkers genoemd); mosselen gevuld met bodemsediment nadat het organisme het leven liet. Vaak is het sediment anaëroob (zwart) en komt er een sterk riekende geur vrij bij het openen van de mosselen.
Slippers : Crepidula fornicata; schelp van maximaal 2,5 cm breed, ovale vorm, de buitenkant vertoont groei-lijnen. De kleur is geelbruin, de onderkant is over het algemeen wit. Hij leeft normaliter op soortgenoten en op tweekleppige weekdieren met name mosselen en oesters in ondiep water.
Pokken : Balanus spp; Kreeftachtige diertjes met een exoskelet, ze leiden een sifiel bestaan op o.a. twee kleppige weekdieren zoals mossels en oesters.
Kweekpercelen : (Produktiegebieden); een gebied in zee, in een lagune of estuarium waarin natuurlijke gronden voor tweekleppige weekdieren bevinden en waar levende tweekleppige weekdieren worden verzameld
Verwatergebied : een gebied in zee, in een lagune of estuarium dat duidelijk is afgebakend door boeien, palen of andere verankerde materialen en dat uitsluitend bestemd is voor het verwateren van levende tweekleppige weekdieren.
Verwatering : de behandeling waarbij levende tweekleppige weekdieren, die gezien hun kwaliteit niet hoeven te worden heruitgezet of behandeld in een zuiverscentrum, worden opgeslagen in bassins, in andere installaties met schoon zeewater of op natuurlijke gronden ten einde zand, slik of slijm te verwijderen.
Standaard : Een Mac Conkey agarplaat waarop een rein gekweekte Faecale coli bacterie wordt gebracht. Deze reinculture is afkomstig uit een 'schuine buis' die in de koelkast wordt bewaard.
Schuine buis : Schuin gestolde (Nutriënt-)agar in een reageerbuis (oppervlakte vergroting). Een bacterieculture in een schuine buis wordt groeiactief gehouden door ze regelmatig over te enten op een nieuw vers bereide schuine buis.
Verdunningsfactor : De mate waarin een monster wordt verdund.

4 Beginsel

Het schoonmaken van de monster mosselen, hierna de schoongemaakte mosselen openen en het mosselvlees- en vocht opvangen in een steriele zak. Vervolgens wordt de opgevangen substantie verdund met pepton-fysiologisch zout en het geheel wordt tot een suspensie gemaakt in een Stomacher. Uit de zak worden gelijke hoeveelheden vloeistof gepipetteerd in 5 gamma steriele petrischalen. Hierbij wordt handwarme Mac. Conkey agar gegoten en het geheel wordt over de gehele plaat gesuspendeerd. Even later voorzien van een afdeklaag van het zelfde medium. De petrischalen worden in een koelbroed stoof bebroed eerst gedurende 2 uur bij 37° C; daarna 20 uur bij 44° C.
Na broedfase worden de rode ronde tot ovaalvormige kolonies geteld en het aantal faecale coli's per ml mosselvlees en -vocht berekend.

5 Media en reagentia

Uit economisch oogpunt worden de hieronder genoemde media en reagentia geleverd door het bedrijf Hospidex. Hospidex is een produktspecialist in media produkten en is gevestigd in Nieuwkoop en Haarlem.

Hospidex B.V.	Hospidex B.V.
Postbus 77	Stephensonstraat 45
2420 AB Nieuwkoop	2014 KC Haarlem
Telefoon 01725 - 79307	Telefoon 023 - 249251

Elke maand worden er verse reagentia geleverd.
Bij de geleverde media krijgen we een certificaat. Dit certificaat is een garantie voor de kwaliteit (zie bijlage 1).
De reagentia worden volgens de hiervolgend genoemde bereidingswijze gemaakt.

5.1 Bereiden van Mac Conckey-agar.

Er wordt gebruik gemaakt van Mac Conkey-agar no.3 Code CM 115 Oxoid. Neem 180 ml infuusflessen voor het bereiden van de agar. Deze maat fles is handig voor het gieten van de agar.

De volgende ingrediënten worden op de bovenweger gewogen (voor 180 ml flessen): Mac Conkey-agar 9,65 g
Bact. agar 0,36 g
Aqua Dest 180 ml
Los de Mac Conkey en de Bact.agar op, en vul af in genoemde infuusflessen. De schroefdoppen worden een slag teruggedraait waarna ze worden geautoclaveerd gedurende 15 min bij 121+/- 1° C.

Hierna worden de flessen met agar:
1) Geplaatst in een broedstoof van 55° C. In deze vloeibare vorm is het circa 2 á 3 dagen te gebruiken om een goed rendement te garanderen. (Pharma Chemie). Visueel verschijnsel bij later gebruik is dat er kleurverandering optreedt.

of
2) Geplaatst in een koelkast (6-7°C). In gestolde vorm is de Mac Conkey circa 1 á 2 maanden houdbaar. Bij gebruik plaatst je de fles in de magnetron en wordt het opgekookt. Hierna plaats je de fles in een broedstoof van 55°C. Gereed voor gebruik. Let er op dat de agar bij gebruik handwarm is!

5.2 Bereiden van Pepton-Fysiologisch zout oplossing (0,9 %).

Er wordt gebruik gemaakt van Na Cl p.a. (Merck art. 6404).
Gebruik gesteriliseerde 1000 ml infuusflessen.

Weeg 8,5 g NaCl en 1,0 g Pepton af op de bovenweger in een infuusfles, vul deze fles af met 1000 ml Aqua Dest. Schud de fles krachtig.
Na schudden de schroefdop een slag terugdraaien en de fles autoclaveren gedurende 15 minuten bij 121 +/- 1° C.

Hierna de schroefdop toe draaien en na afkoeling de fles in de koelkast zetten.
Geautoclaveerd fysiologisch zout is in de koelkast circa 1 á 2 maanden houdbaar.

5.3 Bereiden van Briljant-gal-lactose-bouillon

Los 40,0 g Briljantgroen-gal-lactose-bouillon Code CM 31 Oxoid op in 1000 ml Aqua Dest.
Stel de pH zo in, dat na sterilisatie deze 7,2 +/- 0,1 bedraagt. Hierna autoclaveren gedurende 15 minuten bij 121 +/- 1° C.
Na afkoelen in, van te voren geautoclaveerde, cultuurbuizen met Durham- buisjes 10 ml Briljantgroen-gal-lactose-bouillon pipeteren. Flambeer elke cultuurbuis goed af.
Dit wordt in de Laminair-flowkast gedaan.

5.4 Alcohol

De 70% alcohol maken we zelf. Dit doen we door absolute alcohol 96% te verdunnen met aqua desk.
Neem een maatcylinder van 1000 ml vul deze met absolute alcohol aan tot 729 ml, voeg hierbij aqua desk tot aan 1000 ml. Verdeel de 70% alcohol over twee spuitflessen.

6 Apparatuur en hulpmiddelen

6.1 Stoof (55°)

Merk:	Köttermann
Type:	2771
Fabriek nr:	715192

Deze stoof heeft een regelbare temperatuur van 30° tot 100° C.
De stoof wordt ingesteld op 55 +/- 1° C. Bij deze temperatuur kan de in de magnetron (6.2) opgekookte Mac Conkey-agar afkoelen tot een temperatuur van 55 +/- 1° C.
Op deze manier kan Mac Conkey agar worden klaargezet voor verdere bewerking.

6.2 Magnetron MX 245 T

Merk:	Samsung
Type:	MX 245 T
Fabrieks nr:	30500014

De MX 245 T wordt gebruikt voor het opkoken van de Mac Conkey agar.

Er moet worden uitgegaan van 250 ml infuusflessen met hierin gestolde Mac Conkey-agar (deze krijgen we van Hospidex aangeleverd).
Voor 4 schelpdiermonsters gebruik je 3 flesjes Mac Conkey agar voor het opkoken.

Voordat een fles geplaatst wordt in de magnetron dient men de dop van de fles een klein slagje teruggedraaien. Tevens wordt dit gedaan om de opbouwende (lucht)druk tijdens het opkoken kwijt te raken.

Gebruiksaanwijzing
Druk op de tip-toets '*cook time*' om de kooktijd in te stellen. Met de tip-toetsen; '*10 min*', '*min*' en '*10 sec*' kan men de kooktijd instellen.
De warmte stand (vermogen) moet op HIGH staan. Deze staat standaard op HIGH, zodat we dit niet hoeven te programmeren.

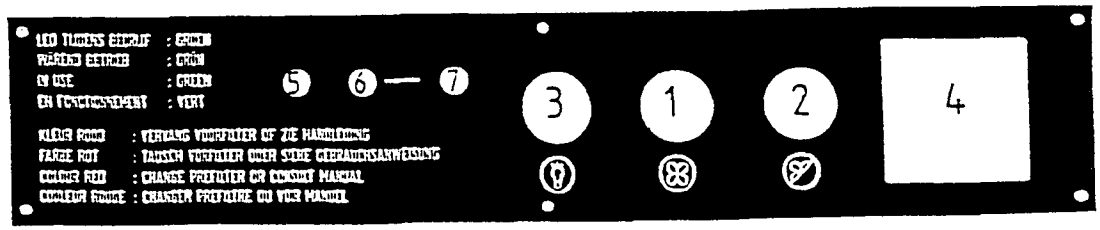
Na 6 minuten op stand HIGH, de flesjes uit de magnetron halen met een handdoek of iets dergelijks. Draai de dop helemaal toe en homogeniseer de fles behoedzaam krachtig.

Plaats de fles weer terug, nadat de dop een klein slagje teruggedraaid is.
Gedurende 1 minuut, op 'HIGH' laten koken.
Hierna de flesjes eruit nemen, de doppen helemaal toedraaien en enkele malen voorzichtig homogeniseren/zwenken.
Laat de flesjes afkoelen in de broedstoof van 55 +/- 1° C (zie 6.1).

6.3 Laminair Airflowkast

Merk:	B.V. CLEAN AIR TECHNIEK
Type:	CLF 460

De laminair crossflow installaties type CLF zijn installaties met een HEPA-filter systeem, welke 99,997% filtert van deeltjes gelijk aan, of groter dan 0,3 micron.



Aan de voorkant van de werkbank bevindt zich het instrumenten paneel, voorzien van de volgende controle functies:

1. Ventilator AAN/UIT knop
2. Nachtstand
3. Lichtknop AAN/UIT
4. Urenteller
5. LED groen/rood
6. Instel pot-meter voor LED regeling
7. Instel pot-meter voor nachtstand regeling

Druk op schakelaar nr. 1 en controleer of schakelaar nr. 2 uitstaat. De ventilator begint te draaien, evenals de urenteller nr. 4.
Na ongeveer 2 minuten, zal het LED welke rood van kleur is, in groen veranderen, wat betekent dat de juiste luchtsnelheid van 0,45 m/s is bereikt.

Druk op schakelaar nr. 3 voor de verlichting.
Neem de werkbank af met alcohol.
Wanneer u de installatie enige tijd niet nodig heeft, kunt u op schakelaar nr. 2 drukken, om de ventilator in de zgn. nachtstand te schakelen.

Kijk het voorfilter regelmatig na op vervuiling, dit is te zien aan het donker worden van de witte vezels. Het verwijderen is eenvoudig door het voorfilter uit de framehoeken weg te trekken. Indien nodig, het filter vernieuwen. Bij vernieuwing filters is het altijd veilig om de stroomvoorziening uit te schakelen.

Nooit de installatie in bedrijf stellen zonder een voorfilter, omdat deze de levensduur van het Hepafilter beïnvloedt.

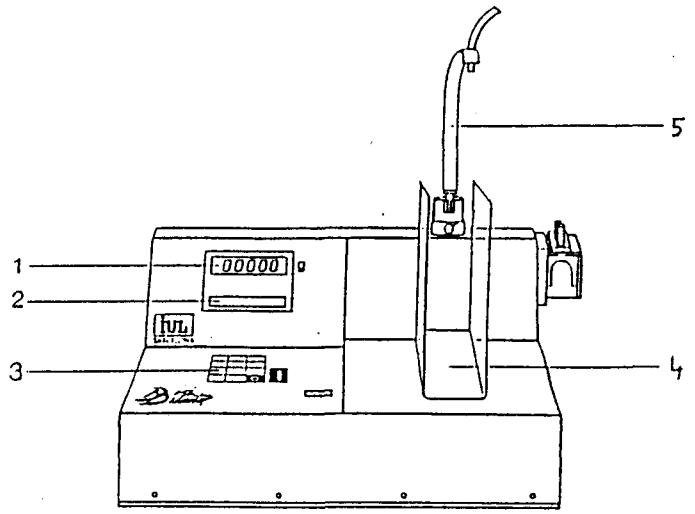
Storingen.
Als na het inschakelen van de installatie na ongeveer 5 minuten het LED (nr.5) op het instrumentenpaneel nog rood is, dient men te controleren of de nachtstand schakelaar (nr. 2) niet is ingeschakeld, of dat eventueel het voorfilter vervuild is.
Als de LED dan nog rood blijft is service vereist.

Adres service dienst:	Particle Measurenment & Validation B.V. Kuipersweg 37 3449 JA WOERDEN telefoon: 03480 - 23661

6.4 Dosi-diluter

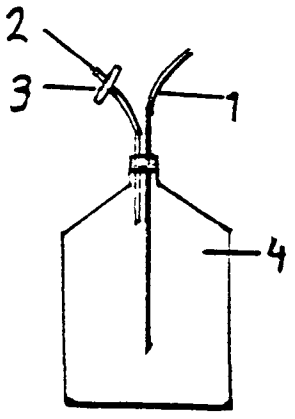
Merk	: IUL Instruments
Type	: Dosi-Dilutor Nr. 0800
Maximale monstergewicht	: 99 g
Minimale monstergewicht	: 2 g
Maximale gewicht verdund monster	: 1980 g
Maximale tareering	: 250 g
Afleesbaarheid	: 0,1 g
Verdunningsfaktoren	: 1/2 tot 1/1000

Afwijking	: maximaal 1%
Doseersnelheid	: 350 ml/min
Bedrijfstemperatuur	: +5° tot +40°C.



1. Gewichts-display (geeft het gewicht van het monster in de klem aan)
2. Tekst-display (hierin verschijnen de verschillende menu's)
3. Diptoetsen, nummeriek 0 t/m 9, Enter, C en TARE.
4. Klem, hiertussen wordt een 'monster'-zak gehangen.
5. Houder met de kraan waaruit de verdunningsvloeistof komt.

De dilutor haalt de verdunningsvloeistof uit een 5 liter fles. Deze is gevuld met pepton-fysiologisch zout. De ontluchting van de fles gebeurt via een absoluut filter. Welke elke week moet worden vervangen.



1. Slang naar dilutor
2. Ontluchting
3. Absoluut-filter
4. fles (5 liter)

Technische gegevens absoluut-filter

Merk	: Sartorius
Type	: 16596-HYK Minisart
Porie groote	: 0,2 µm
Artikel nr.	: 3073

Programeren van de verdunningsfactor.

Zet de Dosi-Diluter aan met de schakelaar links achter op het apparaat.

Na korte tijd verschijnt het hoofdmenu:

IUL Instruments

1.- automat. 2.- manueel

Kies voor 1.*'automat'*, hierna verschijnt het volgende menu:

1.- verdunn 2.- doser

<C> Parametercontrole

Om de verdunningsfactor te kunnen invoeren kies je voor C *'Parametercontrole'*.

Factor (2..100) 010

<E> o.k. <C> korrektie

Momenteel staat de dilutor ingesteld op factor 10 dit gaat automatisch wanneer je hem aanzet. Om deze factor te veranderen druk je op C *'korrektie'*.

Nu kun je de verdunningsfactor in voeren:

PARAMETERS

Factor (2..100) nnn

Je moet de verdunningsfactor 3 hebben dus type je 003 op het nummerieke toetsenboord in.

In de volgende 3 menu's hoeven je niks te veranderen, deze zijn voor het instellen van het minimale en maximale gewicht. Deze sla je over door telkens op Enter te drukken tot dat je terug in het hoofdmenu bent.

Er rest nu alleen nog het tareren van de dilutor.

Tareren dilutor

Na het invoeren van de verdunningsfactor sta je terug in het hoofdmenu, kies 1 *'automat'*, daarna kies je 1 *'verdunn'*, nu verschijnt het volgende menu:

plaats beker (T)

<C> einde <1>faktor

Plaats een lege Stomacher® 400 filter bag in de klem en druk op TARE.

Op het display verschijnt nu: *Monster toevoegen*

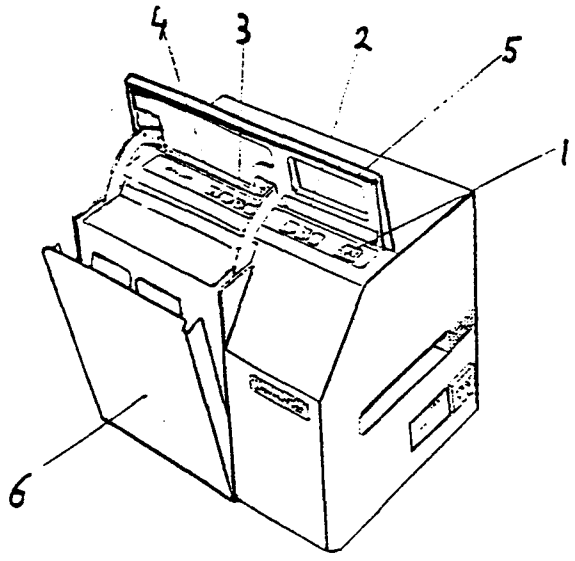
houder naar beneden.

De dilutor is nu getareerd, je kan nu beginnen met de monsters te verdunnen.

Plaats een stomacher® 400 filter bag met monster in de klem en plaats de houder naar beneden met het 'tuitje' in de openstaande zak.
De dilutor verdund het monster nu met een verdunningsfactor 3.
Waarneer de dilutor klaar is kan de houder weer omhoog geplaats worden en de Stomachter zak worden verwijderd. De dilutor staat meteen klaar voor het volgende monster.

6.5 Stomacher Lab-Blender

Merk:	SEWARD MEDICAL
Model:	400 (ml)
Type:	BA 7021
Serie nr:	29065
Wegwerpzak grootte:	177 mm x 304 mm
Minimale voorgeschreven capaciteit:	80 ml
Maximale voorgeschreven capaciteit:	400 ml
Minimale werktemperatuur:	10° C
Maximale werktemperatuur:	35° C
Maximale monster temperatuur:	60° C
Maximale relatieve vochtigheid:	90%
Tijdinstellingen:	30, 60 en 120 seconden (± 5%) en continu.
Standen snelheid:	LOW = 200 rpm } gemiddeld bij
	NORMAL = 230 rpm } 20° C
	HIGH = 260 rpm } Afwijking ± 5%



1. Aan/Uit schakelaar
2. Tip-toetsen snelheid
3. Tip-toetsen tijd
4. Tip-toets stop
5. Deur hendel
6. Deur

Gebruik altijd de speciale Stomacher 400 filter bag.

Technische gegevens Stomacher 400 filer bag.

Merk	: Seward Medical
Type	: Stomacher® 400 filter bags
Artikel nr.	: 2441010

De stomacher 400 bag-filters zijn verpakt per 10 stuks in een steriele zak. Deze zak dient voor de steriliteit aan de onderkant worden open geknipt, zodat de stomacher® bag-filters met de onderkant naar de opening liggen.

Doe monster in Stomacher 400 filter-bag en maak hiervan een verdunning.
Plaats de zak in de Stomacher. Sluit de deur om de zak dicht te klemmen.
Druk eerst op de snelheids tip-toesten voor de gewenste snelheid. Daarna op de tijds tip-toetsen voor de tijd. De Stomacher start na invoeren tijd meteen.

Wanneer de Stomacher stil staat kan de deur worden geopend en de zak uit de Stomacher worden gehaalt.
Het monster is nu gepureerd.
De tijd en de snelheid van de Stomacher hangt af van het soort monster.
Mosselmonsters moeten 60 seconde op high, oesters en kokkels 2 x 30 sec op low.
Bij oesters en kokkels is het gebruikelijk om dubbele zakken te gebruiken dit in verband met het kapot gaan van de zak.

6.6 Elektrische pipetteer-hulp

Merk	: Hirschmann®
Model:	: pipetus®-standard

De pipetus®-standard is een elektrische pipetteer-hulp voor pipetten van 0,1 ml tot 100 ml. Door op de 'in'-knop te drukken, wordt de te pipetteren-vloeistof opgezogen. Doormiddel van de 'out'-knop loopt de gepipetterde vloeistof uit de pipet.
De pipetteer snelheid wordt geregeld doormiddel van hoe diep de 'in' en/of 'out' knop wordt ingedrukt.

6.6.1 Pipet

Merk	: Greiner labortechnik
type	: 10ml in 1/10 zonder punt (DT)
bestel nr	: 607109
Afwijking	: maximaal 2%

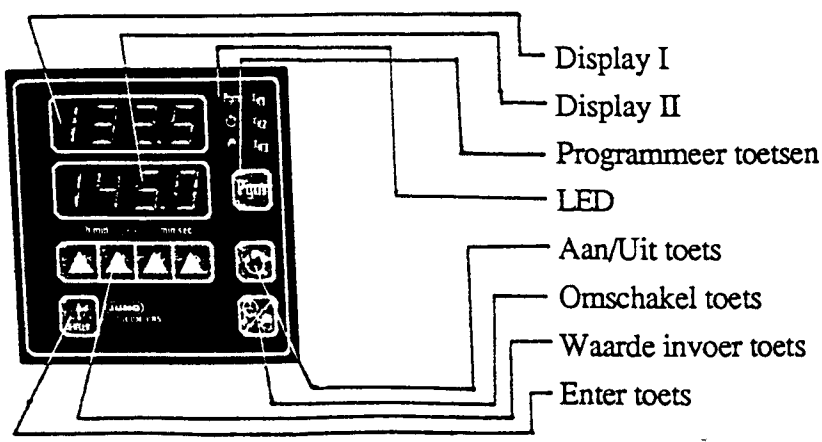
De pipet heeft geen punt, dit houdt in dat het een 'blow out' pipet is.
De pipetten zijn per stuk verpakt.
Bij plaatsen van de pipet in de houder van de pipetteer-hulp moet men er zeker van zijn dat deze goed lucht dicht afsluit.

6.7 Koel-broedstoof

Merk	: Elbanton
Type	: LTKB 650 voorzien van PRS-regeling
Temperatuur bereik	: 4°C tot 50°C
Afwijking	: bij 37°C en 44°C is 0,25°C
Inhoud	: 650 liter
Toelaatbare omgevingstemperatuur	: 0°C tot 50°C
Programmeerbaarheid	: 10 programma's
Maximale aantal stappen	: 10 per programma
Programma-looptijd	: 1 sec . . . 99 h: 59 min per programma stap
Herhaalbaarheid programma	: 0 . . . 99 keer, of cyclus.
Type programmaregelaar	: JUMO DICON PRS

De LTKB 650 is voorzien van een PRS-regeling, dit houdt in dat de koel/broedstoof is uitgerust met een programmaregelaar. Er kunnen maximaal 10 programma's worden ingevoerd, waarvan elk programma uit 10 stappen kan bestaan.

De universele programmaregelaar



Display I

Hierin kan worden gelezen: de heersende temperatuur in de stoof; de resterende looptijd; stap nummer en programma nummer.

Display II

Hierin kan worden gelezen: de te bewerkstellige temperatuur in de stoof; commentaar.

Programmeer toets

Voor programma ingave en parameterkeuze.

LED

Geeft aan op welke stand de stoof staat: Programma; Automatisch of Handmatig.

Aan/Uit toets

Toets voor het aan en uitzetten van de stoof.

Omschakel toets

Toets welke de stoof op handbediening kan zetten en uren naar minuten kan omschakelen.

Waarde invoer toetsen

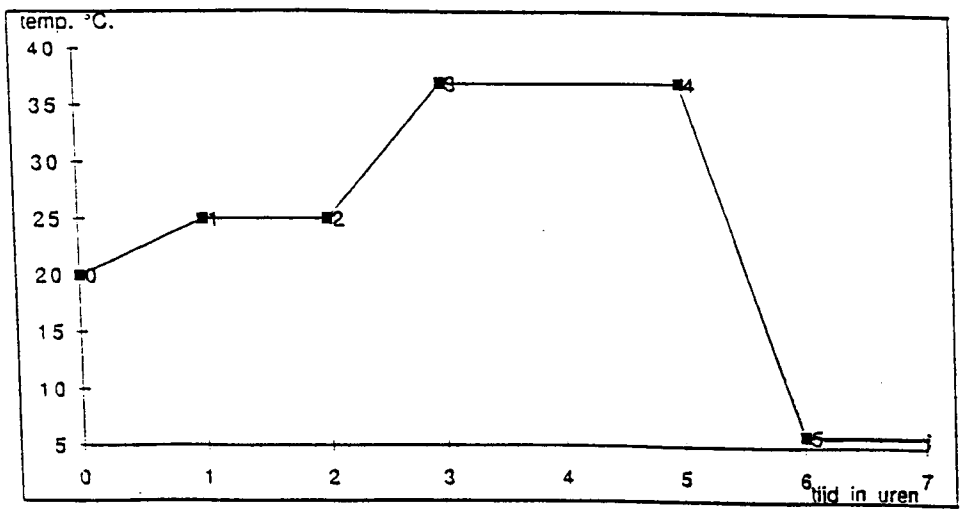
Toetsen voor het invoeren van waarde (data).

Enter toets

Vaststellen ingevoerde waarde en/of vaststellen parameter configuratie.

Programeren van de programmaregelaar

Een programma kan maximaal uit 10 stappen bestaan. Een stap bestaat uit een temperatuur instelling en een tijds instelling.



Op de vorige pagina is een programma weergegeven met de verschillende stappen, zoals je ziet bestaat dit programma uit 6 stappen.
De eerste stap is altijd **stap 0**. In deze stap moet de stoof de temperatuur die hij voor het opstarten heeft (20°C) in 1 uur naar 25°C krijgen, dan volgt stap 1.
Stap 1 houdt hier in, dat de stoof 1 uur op 25°C moet blijven. In **stap 2** moet de stoof in 1 uur naar 37°C. Vervolgens blijf de stoof 2 uur bij deze temperatuur, **stap 3.** Dan moet hij binnen het uur afkoelen naar 6°C, **stap 4. Stap 5** laat de stoof gedurende 1 uur bij 6°C. Hierna schakeld de stoof uit.

Programmeren

Druk op de "*programmeer toets.*". Wanneer er nog niks geprogrammeerd is dan staat er:

Display I: *Pr-0*
Display II: *NO*

Dit houdt in dat er niks is geprogrammeerd onder Pr-0.
Druk op "*Enter toets*".

Display I: *Sc-0*
Display II: *Pr-0*

Dit betekend dat je stap 0 van programma 3 gaat programmeren.
Druk op "*Enter toets*".

Display I: *0.0*
Display II: *SETP*

Hier kan je de gewenste temperatuur ingeven welke hij gedurende stap 0 moet bewerkstellige. Dit doe je met de "*Waarde invoer toetsen*".
Druk na invoeren temperatuur op "*Enter toets*".

Display I: *0.00*
Display II: *TIME*

Nu kan je de tijd invoeren hoelang de stoof erover mag doen om op de hiervoor ingevoerde temperatuur te komen. Ook dit doe je met de "*Waarde invoer toetsen*".
Na invoeren tijd druk je op "*Enter toets*".

Display I: *Sc-1*
Display II: *Pr-0*

Nu kan je stap 1 invoeren, dit gaat op de zelfde wijze als stap 0.
Wanneer je alle gewenste stappen hebt invoerd, druk je op de "*Programmeer toets*".
Het programma is nu vast gelegd.

Gebruiken van een programma

Druk op de "*Aan/Uit toets*" om de regelaar aan tezetten.
Er verschijnd: Display I: *Pr-0*
Display II: *YES*

Dit houdt in dat onder Pr-0 een programma is geprogrammeerd.

Wanneer er dit staat: Display I: *Pr-0*
Display II: *NO*

dan is er onder Pr-0 niets geprogrammeerd.

Druk op "*Enter toets*".

Display I: *0.00*
Display II: *WAIT*

Druk op "*Enter toets*" en de stoof slaat aan. De stoof loopt nu programma 0 af wanneer dit programma afgelopen is slaat de stoof automatisch uit.

6.8 Kiemtelapparaat

Merk	: K.Schneider & CO
Type	: 114203
Model	: colonicont II
fabrieks nr.	: 234

De colonicont II is een kiemtelapparaat uitgerust met een contact-tel-probe. Dit is een soort pen waarvan de punt een soort kontact-schakelaar is. Elke keer wanneer de punt op een voorwerp drukt dan zendt deze een elektro-magnetisch signaal naar de counter.

Gebruiksaanwijzing:

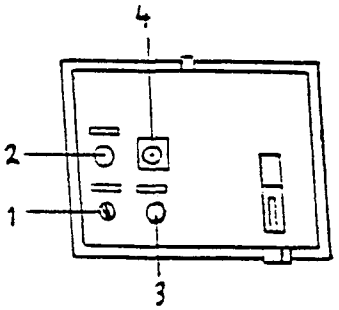
Zet de colonicont II aan met de schakelaar links van het apparaat.
Leg petrischaal met de onderkant naar boven in de ronde uitsparing. Plaats de vergroot glas in de goede positie zodat je er goed door kunt kijken naar de kolonies.
Tik de kolonies aan met de contact-tel-probe onder een hoek van minimaal 45°. Lees het totaal aan getelde bacteriën af op de counter.

6.9 Autoclaaf

Merk	: Van Rietschoten & Houwens
Type	: 13.000
Inhoud	: ± 130 liter
Max. werkdruk	: 1,2 ato

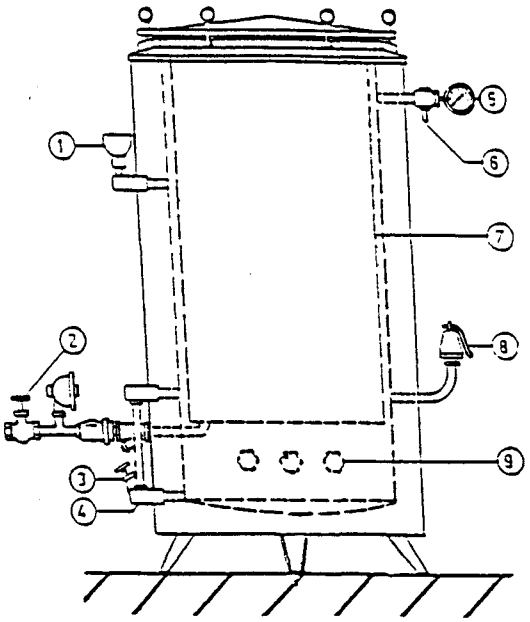
Max. werktemperatuur	: 125 °C
Afblaasdruk veiligheidstoestel	: 1,7 ato
Sluitdruk veiligheidstoestel	: 1,4 ato
Thermometer	: meetbereik 0-150 °C
Opwarmtijd tot 100°C	: ± 25 minuten

Schakelkast



1. schakelaar, aan/uit
2. groene lamp, stuurstroom
3. gele lamp, verwarmen
4. POT-meter, tijd autoclaveren

Autoclaaf type 13.000



1. vultrechter
2. stoomafblaasafsluiter
3. waterafvoerafsluiter
4. peilglasarmatuur
5. manometer
6. aansluiting drukschakelaar
7. binnenmantel
8. Veiligheidsklep
9. Verwarmingselementen

Gebruiksaanwijzing

Sluit de afsluiters 2 en 3 en op Nr. 1.

Vul de autoclaaf via de vultrechter met gedestilleerd of onthard water tot de MAX.-streep in het peilglas (De vulling is circa 30 liter).

Sluit afsluiter 1 na het vullen.

Plaats de inzetmanden met het te steriliseren materiaal op het rooster in de binnenketel en sluit de deksel.

Plaats de knevelsluitingen op de hiervoor bestemde nokken van het deksel en draai deze stevig aan (steeds de twee tegenover elkaar liggende tegelijk).

Stel de tijd van het autoclaveren in (nr. 4 schakelkast) op de schakelkast.
Dit is voor steriliseren media 15 minuten en voor afsteriliseren media 25 minuten bij een druk van 1,1 ato. (1,1 ato is gelijk aan 121,7 ± 0,1 °C)
Bij deze tijden moet de opwarmtijd, ± 25 minuten, worden opgeteld. Dit wordt dus respectievelijk 40 minuten en 50 minuten.
Zet de stuurstroomschakelaar op "Aan". De signaallampen gaan nu aan.
De druk hoeft niet ingesteld te worden omdat deze reeds op 1,1 ato staat.
Na 20 - 25 minuten zal de stoomdruk gaan oplopen tot de ingestelde waarde bereikt is. Gedurende het steriliseerproces wordt deze druk automatisch gehandhaafd.
Na steriliseren de schakelaar op "Uit" zetten en de stoomdruk af blazen.
Zodra de manometer op 0 staat kan de deksel geopend worden.

Controleer voor elk proces of er voldoende water in de autoclaaf is en vul het eventueel bij tot de MAX.-streep.

6.10 Oestermes

Voor het openen van Oesters zijn speciale messen ontworpen. Wij gebruiken een mes met een beschermkap. Dit voor wanneer je met het mes door het slot schiet, dat je je dan niet aan de schelp snijdt.

Merk : Sabatier ®

Het mes is van roestvrij staal gemaakt.

6.11 Oesterblok

Merk : CLIC'® huitres

Nr. : 84.016166

Het oesterblok is een houder voor oesters bij het opensteken van deze. Het blok heeft een uitsparing waarin de oester met de bolle kant kan worden gelegd. Op deze manier wordt het oestervocht bij het opensteken van de oester bespaart in de bolle schelp en kan worden gebruikt bij het onderzoek.
Aan het blok zit een rand deze steekt over het tafelblad heen zodat het blok goed op zijn plaats te houden is tijdens het opensteken van de oester.

6.12 Stomacher ® bag open staander

Merk : Labyrint

Deze klem werkt op dezelfde manier als die van de Dosi-diluter. De zak wordt tussen de twee staanders geplakt.
Op de staanders is een soort stop-verf aan gebracht waaraan de zak kan worden gekleefd. De staanders houden de zak open. Wanneer men monster heeft toegevoegd kan men de zak van de staanders afhalen.

6.13 Twee-kleppige schelpdieren

Tweekleppigen onderscheiden zich van andere schelpdieren door een schelp die uit twee door een scharnier verbonden kleppen bestaat.

6.13.1 Mytilus edulis (gewone mossel)

De Gewone mossel (Mytilus edulis) behoort tot de klasse Tweekleppige (Bivalvia), onderklasse Pteriomorphia, orde Mytiloida, super- familie Mytilacea en tot de familie van Mosselachtige (Mytilidae).

Omschrijving	
lengte	: tot meer dan 10 cm, meestal 3 - 4,5 cm.
kleur	: blauwzwart, jonge exemplaren geel. Het vlees is geelwit.
Typische vorm	: lang, assymetrisch

Mosselachtigen zijn, vergeleken met andere tweekleppigen, zeer beweeglijk en kunnen, in ieder geval in hun eerste twee levensjaren, actief over de bodem bewegen.
De mossel spint zich met byssusdraden vast op de bodem of aan palen, rotsen e.d., van hoog in de getijdenzone tot 20 meter diep.

Hoewel de mosselen in onze streken een gekweekt produkt zijn, vindt men soms verrassingen in de schelp, zoals het erwtenkrabbetje, Pinnotherese pisum, een diertje dat bij de mossel inwoont en geen schade aan het produkt toebrengt. Ook bevatten mosselen nu en dan kleine parels, vaak meerdere per schelp, die worden gevormd door een combinatie van een parasitair organisme en milieu-omstandigheden.
'Slikkers' worden bijzonder gevreesd door consumenten van mosselen. Ze kunnen in de pan opengaan en zo de smaak van het hele kooksel bederven. Een slikmossel ontstaat als de mossel onder zand of slik bedolven raakt en sterft en de schelp zich vervolgens met stinkend slik vult.

6.13.2 Ostrea edulis (Europese platte oester)

De Europese platte oester (Ostrea edulis) behoort tot de klasse Tweekleppige (Bivalvia), onderklasse Pteriomorphia, orde Pteriina, onderorde Ostreina, super-familie Ostreacea en tot de familie van de Oesters (Ostreidae).

Omschrijving	
lengte	: soms 13 cm of groter, meestal 6-10 cm.
kleur	: variabel, bruinachtig.
typische vorm	: grondvorm rond, schelphelften ongelijk, de linker is schotelvormig, de rechter is plat.

De Europese platte oester leeft in rustig water, vastgehecht op rotsen en andere vaste voorwerpen; op zandig-slikkige bodems en baaien en estuaria en ook wel in de open zee tot een diepte van 80 m.

Meer dan andere schelpdieren worden de oesterculturen door ziekten belaagd. In West-Europa viel in de jaren vijftig de Portugese oester, in de jaren zeventig in Frankrijk de platte oester en in de jaren tachtig dezelfde soort in geheel West-Europa ten prooi aan de ziekte Bonamia ostreae. Dit heeft geleid tot de introduktie en het op grote schaal in cultuur nemen van de Japanse oester, die momenteel in Europa voor een aanzienlijk deel de platte oester heeft vervangen.

6.13.3 Crassostrea gigas (Japanse oester)

De Japanse oester (Crassostrea gigas) ookwel Pacifische oester of Creuse genoemd, behoort tot de klasse tweekleppige (Bivalvia), onderklasse Pteriomorphia, orde Pteriina, onderorde Ostreina, super- familie Ostreacea en tot de familie van de Oesters (Ostreidae).

Omschrijving	
lengte	: maximaal 20 cm, gewoonlijk 7,5 - 15 cm
kleur	: vuilwit met bij jongere exemplaren een paarse band.
typische vorm	: variabel, meestal langgerekt en onregelmatig. schelp met scherpe, omgekrulde schebben.

De Japanse oester leeft voornamelijk in de getijdenzone.

6.13.4 Cerastoderma edule (Kokkel).

De Kokkel (Cerastoderma edule), ookwel Kokhaan, Hartschelp of Haantje genoemd, behoort tot de klasse tweekleppige (Bivalvia), onderklasse (Heterodonta), orde Veneroida, superfamilie Cardiacea en tot het familie Kokkelachtige (Cardiidae).

Omschrijving	
lengte	: maximaal 5 cm, meestal 2-3 cm.
kleur	: vuilwit, op modderbodems blauwzwart
typische vorm	: de dubbele schelp is in doorsnede hartvormig en heeft ca. 25 radiale, afgeronde ribbels.

De kokkel leeft vooral in de getijdenzone, echter ook tot 20 meter diepte. Hij graaft zich met zijn sterke voet ca. 2-3 cm in zandige tot slikkige bodems in.

6.13.5 Spisula subtuncata (Afgeknotte strandschelp)

De Afgeknotte strandschelp (Spisula subtuncata) behoort tot de klasse Tweekleppige (Bivalvia), onderklasse Heterodonta, orde Veneroida, superfamilie Mactracea en familie Mactridae.

Omschrijving	
lengte	: maximaal 3 cm, meestal 2-2,5 cm.
kleur	: vuilwit
typische vorm	: de schelp is enigszins driehoekig van vorm.

De afgeknotte strandschelp leeft ingegraven in slikkige tot zandige bodems in water van enkele meters tot 40 meter diepte. Vaak in dicht bezette banken.

7 Werkwijze

- Voorbereidingen.
- Verwerken van de schelpdieren.
- Gieten van de platen.
- Aflezen van de platen.
- Inzetten bevestiging.
- Autoclaveren van het afval.

7.1 Voorbereidingen

Opkoken Mac Conkey

Kook de flesjes Mac Conkey agar op in de magnetron volgens de gebruiksaanwijzing in paragraaf 6.2. Zet de flesjes na opkoken in de Köttermann stoof van 55 °C.

Opmerking

Het aantal flesjes dat moet worden opgekookt is afhankelijk van het aantal monsters. Ga uit van 3 flesjes Mac Conkey voor 5 monsters.

Aanzetten Laminair Airflow kast

Zet de Laminair Airflow (6.3) kast aan (schakelaar 1). Zet ook het licht aan (schakelaar 3).

De Laminair Airflow kast mag niet op nachtstand staan (schakelaar 2).

Neem een tisue, spuit op de tisue 70% alcohol en neem de werkbank, bovenkant en zijkanten aan de binnezijde van de kast grondig af.

Vullen van de 5l. fles van de dilutor.

Het vullen van de 5 liter fles van de dilutor moet in de Laminair Airflow kast worden gedaan.Neem vijf flessen 1l. Pepton-fysiologisch zout uit de koelkast en een lege geautoclaveerde 5 liter fles.

Zet de bunsebrander in de Laminair Airflow kast aan.

Draai de dop van 1 van de 5 1l. flessen los. Laat de dop nog wel op de hals van de fles rusten. Draai nu de dop van de 5 liter fles eraf en haal de hals door de vlam. Pak de 1l. fles waarvan je de dop hebt los gedraaid, haal de dop nu eraf en haal de hals door de vlam. Giet de 1l. fles leeg in de 5l. fles. Flambeer de hals van de 5l. fles en plaats de dop op de hals. Niet vast draaien.

Pak nu de volgende 1l. fles met Pepton-fysiologisch zout en giet via de hierboven genoemde vogorde het Pepton-fysiologisch zout in de 5l. fles. Zo ook de overgebleven 3l. flessen.

Na de vijfde fles moet je de dop van de 5l. fles helemaal toe draaien.

Zet de bunsebrander uit.

Aansluiten van de 5l. fles aan de dilutor.

Draai de dop van de met Pepton-fysiologisch zout gevulde 5l. fles los, laat de dop nog wel op de hals van de fles rusten.

Haal de stop van de lege 5l., welke aangesloten is aan de dilutor, af en plaats deze op de volle 5l. fles waarvan je de dop in dezelfde handeling afhaalt.

De lege 5l. fles kan nu weg gepakt worden en klaar gezet worden om te autoclaveren.

Opmerking

Zorg er voor dat de stop goed afsluit, dit in verband met verontreiniging.

Vervangen absoluut filter

Zet de Bunse-brander bij de dosi-dilutor aan.

Pak een steriel verpakt filter (6.4).

Trek voorzichtig het oude absoluut filter los van de slang. Haal het uiteinde van de slang door de vlam. Haal het nieuwe filter uit de verpakking en plaats deze op de slang.Zet de Bunse-brander uit.

Opmerking

Bij het beet pakken van het nieuwe absoluut-filter mag je niet het tuitje aanraken welke in de slang wordt geschoven. Dit inverband met verontreiniging.

Aanzetten Dosi-diluter en Stomacher Lab Blender

Programeer en tareer de dilutor zoals is beschreven in paragraaf 6.4.

Zet de Stomachter Lab Blender aan.

7.2 Verwerken van de schelpdieren

Neem 12 dichte twee-kleppige schelpdieren per monster (gecontroleerd op slikkers door even de sluitspier te testen door tegen de schelpen de drukken tussen duim en wijsvinger). Maak de schelpdieren onder de kraan schoon en verwijder eventueel naar buiten stekende byssus-draden, pokken en slippers.

Maak de werktafel goed schoon met 70% alcohol. Was je handen en droog ze goed af. Zet een filterbaghouder gereed op de schoone werktafel. Leg de Stomacherzakken (steriel) gereed.

Steek de Bunse-brander aan en zet een potje spoel alcohol klaar (70%). Spoel het mes in de alcohol en haal hem door de vlam, het mes is nu steriel. Het soort mes is afhankelijk van het soort monster, voor oesters is er een speciaal oester mes en voor mossels/kokkels of spisula's gebruik je een keukemesje.

Codeer de Stomacherzak en hang deze in de filterbaghouder.

Open steken van een mossel monster

Houdt de mossel met de rechte kant naar je toe en duw de bovenschelp over de onderschelp naar buiten. Steek het geflambeerde mesje tussen de schelpen en beweeg hem langs de boven kant naar rechts, snij daarbij de spieraanhechtingen los. De schelp gaat nu wat openstaan, vang het schelpvocht op in de onderstaande Stomacherzak. Snij hierna met het mesje van rechts terug langs de onderrand naar de rechts om ook hier de spieraanhechting los te snijden.
Snij eventueele kleinere spieraanhechtingen ook door om de mossel uit zijn schelp te krijgen. Vang de mossel op in de openstaande Stomacherzak.

Opensteken van een kokkel monster

Pak een kokkel met het gewricht (slot) naar je toe. Steek de geflambeerde keukemes in de opening. Deze opening is een plek waar de twee schelpen niet opelkaar sluiten, hier steekt de kokkel zijn sipho door naar buiten.
Steek de mes zover dat hij de andere kant van de schelp raakt. Draai het mes een halve slag zodat de schelp open schaniert. Vang het schelpvocht op in de openstaande Stomacherzak.
Haal het keukemesje uit de schelp en vouw de schelp zo ver mogelijk open. Trek de schelp-helften los van elkaar, de kokkel blijft in één van de schelp-helften zitten. Leg de lege schelphelft aan de kant. Snij met het keukenmesje de kokkel uit de overgebleven schelp. Vang de kokkel op in de openstaande Stomacherzak.

Opensteken van een oester monster

Plaats het oesterblok op de tafel. Leg een oester met de bolle kant naar onder in het oesterblok en zo dat het slot naar je toe ligt. Neem in de ene hand de geflambeerde oestermes en druk met de andere hand op de oester in het oesterblok. Zet het mes tussen de schelp-helften tegen het slot en duw het mes in het slot. Wanneer het mes in het slot is geduwd moet je hem een halve slag draaien. Het slot breekt.

Steek het mes nu langs de bovenste schelp naar voren en snij hierbij de sluitspier los. Pak de bovenste schelp-helft op en gooi deze weg. Pak de schelp-helft met schelpvocht en oestervis uit de oesterblok en giet het schelpvocht in de openstaande Stomacherzak. Snij met het oestermes ook de spierhechting aan de bolle schelp-helft door. Giet oestervis in de openstaande Stomacherzak. Gooi ook de bolle schelp weg.

Uit eindelijk worden 10 schelpdieren (mosselen, kokkels/oesters of spisula's) genomen voor de analyse. Twee reserve zijn handig als er één moeilijk open gaat of snel schelpbreuk optreedt bij openen.
Wanneer alle monsters op deze manier zijn "geslacht" dan moet de inhoud van de zak 3 maal worden verdund met steriel pepton-fysiologische zoutoplossing.

Opmerking
Het monster moet 3 maal worden verdund omdat onverdunde schelpdiersuspensie te veel eiwitten bevat en het zich dan niet goed vermengd met de agar.

Verdun het monster door de Stomacherzak uit de filterbaghouder te nemen en deze in de klem te plaatsen van de dilutor en de houder van de dilutor naar beneden te zetten zodat het kraantje in de zak komt.
De dilutor verdunt het monster nu met een factor 3. Dit houdt in wanneer het monster 50,0 g weegt de dilutor er 100,0 g pepton-fysiologisch-zout er aan toevoegd.

Wanneer de dilutor klaar is staat er op de display: '*Plaats houder naar boven* ', doe dit. Haal de Stomacherzak uit de klem en plaats deze in de Stomacher door de deur te openen en de Stomacherzak in de opening te hangen. Sluit de deur, de zak blijft nu hangen.
Voor de verschillende schelpdieren zijn verschillende programma's voor de Stomacher. Mosselmonsters moeten 60 seconde op high, oesters en kokkels 2 x 30 seconde op low. Doe bij oester en/of kokkel monsters altijd een extra Stomacher zak om de Stomacher filterbag. Dit in verband met het kapot gaan van de zak door schelp gruis.

Opmerking
De Stomacherzak welke bij oester en/of kokkel monsters om de zak moeten worden gedaan hoeven geen filter te bevatten. Dit zijn dus de gewone Stomacher bag's. Wanneer de Stomacher klaar is met pureren van het monster moet je de deur opendoen en de zak uit de Stomacher worden gehaald. De zak wordt nu in een houder geplaatst welke als tijdelijke opslag plaats dient voor de monsters.

Plaats de houder met de monsters in de Laminair Airflow kast om deze een half uur te laten bezinken.

7.3 Het gieten van de platen

Plaats voor ieder monster dat je hebt 5 gamma steriele petrischalen plus 2 blanco 's in de Laminair Airflow kast. Maak stapeltjes van 5 petrischalen en codeer de bovenste petrischaal met de respectievelijke codes van de monsters.

Pak de pipetteer-hulp en zet deze aan, pak een steriele pipet en haal deze uit de verpakking. Duw de bovenkant van de pipet stevig in de pipetteer-hulp.

Opmerking

Bij het plaatsen van de pipet in de pipetteer-hulp mag de onderkant niet worden aangeraakt. Houdt des noods de verpakking aan de onderkant er aan tot dat de pipet in de pipetteer-hulp is geschoven.

Pipetteer 10 ml suspensie uit de Stomacherzak. Verdeel deze 10 ml over de 5 platen met de code van het monster. Doe dit met alle monsters. Dit moet allemaal worden gedaan in de Laminair Airflowkast.

Haal 1 flesje Mac. Conkey agar uit de stoof en zet deze in de Laminair Airflowkast.
Zet de bunsenbrander in de Laminair Airflowkast aan. Draai de dop van het flesje Mac. Conkey agar af en haal de hals van het flesje door de vlam.
Pak een stapeltje van 5 petrischalen met daarin de gepipetteerde monster en schenk in elke petrischaal een laagje Mac. Conkey agar. Haal de hals van het flesje door de vlam en leg de dop op het flesje.

Meng de agar met de suspensie door met je hand met de stapel van 5 petrischalen achtjes te draaien. Wanneer er een goed mengsel is ontstaan zet je het stapeltje aan de kant op te stollen.
Doe dit met alle monsters die je hebt. Giet ook in de twee blanco petrischalen een laagje Mac. Conkey agar. Codeer de petrischalen ook met de naam blanco.

Opmerking

Je moet telkens maar 1 fles Mac. Conkey in de Laminair Airflowkast zetten, wanneer er meerdere staan is de kans dat er stolsel vormt in een flesje groter omdat hij afkoelt.

Pak nog een extra petrischaal en codeer deze met de naam 'Standaard'. Giet in deze petrischaal ook een laagje Mac. Conkey agar. Laat de agar stollen.
Pak uit de koelkast een reageerbuis waarop standaard staat geschreven, dit is een schuine nutriënt agar. Flambeer een öse uit en laat deze afkoelen. Haal de dop van de reageerbuis en flambeer de hals. Tik met de öse een kolonie van de standaard aan. Flambeerd de hals weer en plaats de dop op de reageerbuis.
Breng de aangetikte kolonie op de gestolde Mac. Conkey agar. Doe dit door met een öse een zig-zag beweging over de Mac. Conkey agar te maken. Flambeer de öse uit in de vlam.

Breng een deklaag over de gestolde agar van de monsers, blanco's en standaard. Doe dit door de dop van een Mac. Conkey agar flesje af te draaien de hals van de fles door de flam te halen en per petrischaal een dekend laagje agar te gieten. Door de plaat lichtjes te zwenken verspreid de agar zich beter over de gehele plaat. Stapel de petrischaaltjes weer per monster op. Flambeer de hals van de fles tussen elk monster. Zet de bunsenbrander uit en laat de platen stollen.

Nadat de platen gestold zijn moet je ze in rekken stoppen. Plaats maximaal 3 monsters, dit zijn 15 petrischalen, in 1 kultuurschaalhouder. Zorg ervoor dat per monster de gecodeerde plaat altijd de bovenste is. Plaats over de rekken een lege zakken

Opmerking

De zak die je over een rek plaatst, is een zak waarin eerst steriele Stomacherzakken per 10 verpakt waren. Deze zijn hoog en breed genoeg om over de rek geplaatst te worden. Dit wordt gedaan om uitdrooging van de plaaten in de koel/broed stoof te vermijden.

Plaats de kultuurschaalhouders in de koelbroedstoof. Zet ze voldoende uit elkaar om de beste circulatie te krijgen van de warme lucht in de koel/broed stoof.
Zet de koel/broed stoof aan (zie 6.7 Koelbroedstoof). Kies voor programma 0, dit is een programma voor coliformen onderzoek.

Programma 0 bestaat uit de volgende stappen.

Stap	temperatuur graden Celciu	tijd minuten	tijd uren
0	30	7	
1	37		2
2	37	7	
3	44		20
4	44	30	
5	6		40
6	6	0	

Wanneer er geen programma aanwezig is moet deze worden geprogrammeerd, zie voor beschrijving programmeren, 6.7 Koelbroedstoof.

Pak de Stomacherzakken met de overgebleven verdunningen en giet het vocht in de gootsteen. Gooi de zakken met redidue weg.

7.4 Aflezen van de platen.

Haal na 18 tot 24 uur de Mac. Conkey platen uit de stoof. Zet de stoof uit.
Haal de zakken van de kultuurschaalhouders en haal de platen uit de kultuurschaalhouders maak stapeltjes van vijf platen per monster. Maak bij het aflezen van de platen gebruik van het kiemtelapparaat. Zet het kiemtelapparaat aan en steek de stekker van de contact-tel-probe in het apparaat.Leg de platen één voor één in de uitsparing van het telapparaat. Tip met de punt van de contact-tel-probe elke verdachte kolonie aan.
Verdachte kolonies zijn donker rood met een rood hof, de kolonies zijn mooi rond of ovaal van vorm. Doe dit voor alle vijf de platen van het monster.
Lees na de vijfde plaat te hebben behandeld het aantal kolonies af op de counter.
Doe dit met alle monsters.

Opmerking

Druk voor dat je elk monster gaat tellen de counter op nul !!

Noteer het aantal gevonden kolonies op de daarvoor bestemde formulieren. Op de formulieren voor het bedrijfsleven moet je het aantal gevonden kolonies maal 30

doen en op het formulier van Sanitair Schelpdier onderzoek moet je het aantal gevonden kolonies maal 0,3 doen.
Deponeer de Mac. Conkey platen in een autoclaveerbare zak.

7.5 Inzetten bevestiging

De norm voor Faecale Coliformen is 3 FC/ml. Wanneer er een overschrijding is dan moet je een bevestiging in zetten.
De bevestiging moet worden gedaan met behulp van Briljant-gal-lactose buizen.
Het aantal Briljant-gal-lactose buizen is gelijk aan de wortel van het aantal verdachte kolonies. Tel ook het aantal kolonies welke het meest op faecale coliformen kolonies lijken en het aantal kolonies waar over te twijfelen valt. Deze verhouding brengen we terug op de buizen die we gaan gebruiken voor de bevestiging.
Heb je Bv. 20 positieve en 10 twijfel gevallen dan is de verhouding 2:1 dit breng je terug in de bevestiging. De wortel van 30 is geen geheel getal dus zoek je altijd naar een getal wat boven de gevonden waarde ligt welke wel een geheel getal geeft bij wortel name. In dit geval is dit dus 6, van de 6 buizen worden er dus 4 beënt met kolonies welke als positief zijn opgemerkt en 2 buizen worden beënt met 2 kolonies welke als twijfel gevallen zijn opgemerkt.

Ook het beënten van de Briljant-gal-lactose buizen moet in de Laminair Airflowkast worden gedaan. Dus moet eerst de Laminair Airflowkast worden aangezet op werkstand en de kast moet van binnen worden uitgedaan met alcohol.

Zet een rek buizen met Briljant-gal-lactose klaar in de Laminair Airflowkast. Codeer de buizen met het code van het monster en of het een positieve is of een twijfelgeval dit kan bv. met een + voor positief en met een - voor de twijfelgevallen.
Zet de brander aan. Beënt de buizen door met de öse een verdachte kolonie aan te tikken, een buis Briljant-gal-lactose te pakken, de dop er af tehalen en de hals even door de vlam te halen. Breng nu de öse met bacteriën in de buis en suspendeer de bacteriën en Briljant-gal-lactose door de öse langs de zijkant van de buis te bewegen. Haal de öse weer uit de buis en haal de hals van de buis weer door de vlam. Steek de dop weer op de buis. Doe dit met alle buizen. Flambeer tussen elke kolonie de öse.
Neem ook een standaard mee door ook een kolonie vanaf de standaard buis te enten in een Briljant-gal-lactose buis. Zet ook een onbeënte Briljant-gal-groen buis in het rek als blanco.
Wanneer alle buizen zijn beënt zet je de brander uit.
Zet de rek met beënte buizen in de koelbroedstoof, en start programma 0.

Na 18-24 uur kunnen de buizen worden afgelezen.

Een bacterie is positief wanneer er in het Durhambuisje gas is gevormd voor minimaal 1/10 deel. Vaak treedt er ook troebeling van de reagentia.
Eerst moeten de blanco en de standaard worden bekeken. In het Durhambuisje van de blanco mag geen gas zijn gevormd, er mag ook geen troebeling optreden van het reagentia.

De standaard daarintegen moet troebel zijn en er moet gas in het Durhambuisje zijn gevormd. Bekijk na controle blanco en standaard de bevestiging van de monsters. Het aantal positieve en negatieve geeft een breuk. Vermenigvuldig deze breuk met het aantal gevonde kolonies.
Bv. Van de zes bevestigingen zijn er 2 negatief en 4 positief dit is dus 4/6 deel is positief van de getelde kolonies dit is dan 30 x 4/6 en dat is 20.

Na aflezen van alle bevestigingen en omrekenen getelde waarden zetten we de buizen in plastic autoclaveerbare bekers.

7.6 Autoclaveren afval.

Pak de autoclaveerbare zak met hierin de Mac. Conkey platen. Doe om deze zak een tweede autoclaveerbare zak. Leg onder in de bak een opengeknipte autoclaveerbare zak. Leg de dubbele autoclaveerbare zak op de opengeknipte autoclaveerbare zak.
Pak het plastic bekerglas met hierin de gebruikte Briljant-gal-lactose buizen en zet deze naast de dubbele zak op de opengekipte zak in de bak.
Vul de autoclaaf tot het maximum-streepje via de vultrechter met gedestilleerd water (zie 6.9 Autoclaaf).
Zet de bak in de autoclaaf. Sluit de autoclaaf met de knevels. En zet de autoclaaf aan.
Zet de klok van de autoclaaf op 25 minuten (de druk staat al ingesteld op 1,1 ato).
Wanneer de autoclaaf klaar is dan is de druk tot nul gereduceert en de temperatuur tot kamertemperatuur gezakt dan kan je de autoclaaf open doen. De zakken met Mac. Conkey agar kunnen nu gewoon in de afval container worden gedeponeerd. De buizen Briljant-gal-lactose kunnen worden leeggegoten in de daarvoor bestemde afvalvat de buizen kunnen hierna in de wasmachine worden gewassen.

8 Berekeningen

De omrekening van aantal getelde Faecale Coliformen kolonies naar FC/ml berust op het feit dat het monster 3 maal is verdund en er inplaats van 1 ml, 10 ml is gebruikt. Je moet dan in feite het aantal kolonies maal 3 doen en delen door 10 dit is het zelfde als wanneer je het aantal kolonies maal 0,3 doet.

Het omgedraaide geld voor wanneer we het aantal uitdrukken in FC/100ml dan moet je het aantal getelde faecale coliformen maal de verdunning maal 10 doen omdat je maar 10 ml gebruikt. Je krijgt dus aantal faecale coliformen maal 3 maal 10 dit is het zelfde als aantal faecale coliformen maal 30.

De berekening voor het aantal bevestigingsbuizen is als volgt.
Van het aantal getelde kolonies neem je de wortel. Je bekijkt de getelde kolonies op aantal zekere en het aantal twijfel gevallen, dit leverd een bepaalde verhouding op. Deze verhouding gebruik je ook bij het beënten van de Briljant-gal-lactose buizen.
Bv. Je telt 50 kolonies op de Mac. Conkey platen. Van die 50 vind je dat er 40 duidelijke kolonies bij zitten en 10 onduidelijke. Dit geeft een verhouding van 4:1 (afgerond). De wortel van 50 is circa 7, je zet dus 7 buizen in waarvan 6 met duidelijke kolonies en 1 onduidelijke kolonie (ook afgerond).
Wanneer je dan de andere dag de buizen afleest zie je dat bv. alle buizen positief zijn. Dan hoef je niks om te rekenen. Wanneer er b.v. 1 buis negatief is dan is 6/7 positief. Je doet dan het aantal getelde kolonies van de Mac. Conkey maal 6/7, dus 49 maal 6/7 en dat is dan 42. 42 kolonies zijn dat statistisch faecale coliformen. Met dit getal kan je verder rekenen naar Fc/ml of Fc/100ml.

9 Kwaliteitskontrole

Ter controlle van de verschillende media's op steriliteit en werkzaamheid nemen we bij elke monster reeks een standaard en een blanco mee. Tevens krijgen wij van de leverancier (Hospidex) een garantie certificaat waarop is gemeld dat de geleverde media's zijn gecontroleerd op steriliteit bij 37°C en bij 20°C, agar sterkte, kleur, en pH bij 25°C na sterilisatie. Ook wordt het medium getest met standaarden op de werking van het medium. De standaarden zijn kolonies waarvan hun biochemische eigenschappen bekend zijn.
Bij levering van elk medium krijgen we zo'n certificaat. Zie voor certificaten media bijlage 1 t/m 4.
De bevestingsreactie met Briljant-gal-lactose dient ook om zo'n groot mogelijke kwaliteit te geven aan de waarde die we vinden.

10 Verslag

De gegevens die noodzakelijk zijn voor de identifikatie van het monster zijn:
- Datum van monstername
- Tijd van monstername

Als de monsters afkomstig zijn van het bedrijfsleven dan ook aangeven of het aanvoer of verpakt, voor de export is en de naam van het bedrijf. Monsters van uit het veld moeten over de volgende gegevens beschikken:
- Plaats van herkomst.
- Water temperatuur.
- Windkracht en richting.
- Aanwezigheid andere schepen
- Aanwezigheid meeuwen

Alle gegevens worden genoteerd op invulbladen welke naderhand in de computer worden verwerkt. Zie voor invulbladen bijlage 5 en 6.

De methode die wordt gebruikt is die volgens de Warenwetregeling Visserijprodukten en werkinstructie RVV. (Ref; Brf: Bedrijfsmonitoring, kenmerk 0672/51/JB/MZ).

De resultaten woorden weergegeven in Faecale coliformen per milliliter = Fc/ml en Faecale coliformen per 100 milliliter = Fc/100ml.

11 Literatuur

1) Bas de Groot, Renger Dijkema, Frank Redant. Vis, Schelp en Schaaldieren, Spectrumgids, Utrecht 1988, pagina 94 t/m 103.
2) Gert Linder, Elseviers gids van de zeeschelpen, Amsterdam 1976.
3) ISW nr: A 001, Het opstellen van Interne Standaard Werkvoorschriften van analyses.
4) Dhr. Le Roi (coördinator RVV), Voorschrift voor mosselonderzoek op thermotolerante faecal Escherichia coli, RVV 29 juli 1986.

Bijlage 1.1

Kwaliteits certificaat voor de Mac. Conkey agar.

ORDERNUMMER: 3001235
9501427

Europe Media Supplies bv

Postbus 77, 2420 AB Nieuwkoop
Industrieweg 2, 2421 LJ Nieuwkoop

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

MacConkey agar
flessen 180/250 ml
artikelnummer: 3070180

Representative samples of lotnr: 139018 have been tested by the quality control laboratory. Procedures and results are listed below.
Procedures: standardized aliquots of the listed cultures were inoculated onto selected samples for performance testing. Samples were also examined for physical characteristics listed below.

Results: na 18/24 uur aerobe incubatie bij 37 +/- 0.2 °C

Test cultures	growth
Escherichia coli	goede groei
Staphylococcus aureus	geen groei
Enterococcus faecalis	geen groei

Note:

pH after sterelization measured at 25 ° C 6.76

Production date: 25/09/1995

Physical characteristics:

Appearance: paars

Gel strength: stevig

Expiry date: 25/03/1996

Sterility controlled at 37°: 48 hours voldoet

20°: 48 hours voldoet

CONTROL

controlled by:
N. Hoogervorst

Bijlage 1.2

Kwaliteits certificaat voor de Nutriënt agar.

ORDERNUMMER: 3001235
9500951

Europe Media Supplies bv

Postbus 77, 2420 AB Nieuwkoop
Industrieweg 2, 2421 LJ Nieuwkoop

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

Nutrient agar OXOID
flessen 100/250 ml
artikelnummer: 3030100

Representative samples of lotnr: 415036 have been tested by the quality control laboratory. Procedures and results are listed below.
Procedures: standardized aliquots of the listed cultures were inoculated onto selected samples for performance testing. Samples were also examined for physical characteristics listed below.

Results: na 18/24 uur aerobe incubatie bij 37 '/. 0.2 °C

Test cultures	growth
Escherichia coli	goede groei
Staphylococcus aureus	goede groei

Note:

pH after sterelization measured at 25 ° C 7.21

Production date: 13/04/1995

Physical characteristics:

Appearance: beige

Gel strength: stevig

Expiry date: 13/10/1995

Sterility controlled at 37°: 48 hours voldoet

20°: 48 hours voldoet

CONTROL

controlled by
N. Hoogervorst

Bijlage 1.3

Kwaliteits certificaat voor de Pepton-fysiologisch-zout.

ORDERNUMMER: 3001235
9500951

Europe Media Supplies bv

Postbus 77, 2420 AB Nieuwkoop
Industrieweg 2, 2421 LJ Nieuwkoop

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

P.F.Z.
flessen 1 liter
artikelnummer: 0652400

Representative samples of lotnr: 327016 have been tested by the quality control laboratory. Procedures and results are listed below.
Procedures: standardized aliquots of the listed cultures were inoculated onto selected samples for performance testing. Samples were also examined for physical characteristics listed below.

Results: na 18/24 uur aerobe incubatie bij 37 °/. 0.2 °C

Test cultures	growth
Alleen steriliteit controle	

Note:

pH after sterelization measured at 25 ° C 7.24

Production date: 05/07/1995

Physical characteristics:

Appearance: helder

Gel strength: n.v.t.

Expiry date: 05/01/1996

Sterility controlled at 37°: 48 hours voldoet

20°: 48 hours voldoet

CONTROL

controlled by:
N. Hoogervorst

Bijlage 1.4

Kwaliteits certificaat voor de Briljant-gal-lactose.

ORDERNUMMER: 3001235
9501353

Europe Media Supplies bv

Postbus 77. 2420 AB Nieuwkoop
Industrieweg 2. 2421 LJ Nieuwkoop

QUALITY CONTROL CERTIFICATE

Brilliant green bile broth
flessen 100 ml
artikelnummer: 2021100

Representative samples of lotnr: 137005 have been tested by the quality control laboratory. Procedures and results are listed below.
Procedures: standardized aliquots of the listed cultures were inoculated onto selected samples for performance testing. Samples were also examined for physical characteristics listed below.

Results: na 18/24 uur aerobe incubatie bij 37 +/- 0.2 °C

Test cultures	growth
Escherichia coli	goede groei
Enterobacter aerogenes	goede groei
Staphylococcus aureus	geen groei

Note:

pH after sterelization measured at 25 ° C 6.83

Production date: 11/09/1995

Physical characteristics:

Appearance: groen

Gel strength: n.v.t.

Expiry date: 11/12/1995

Sterility controlled at 37°: 48 hours voldoet

20°: 48 hours voldoet

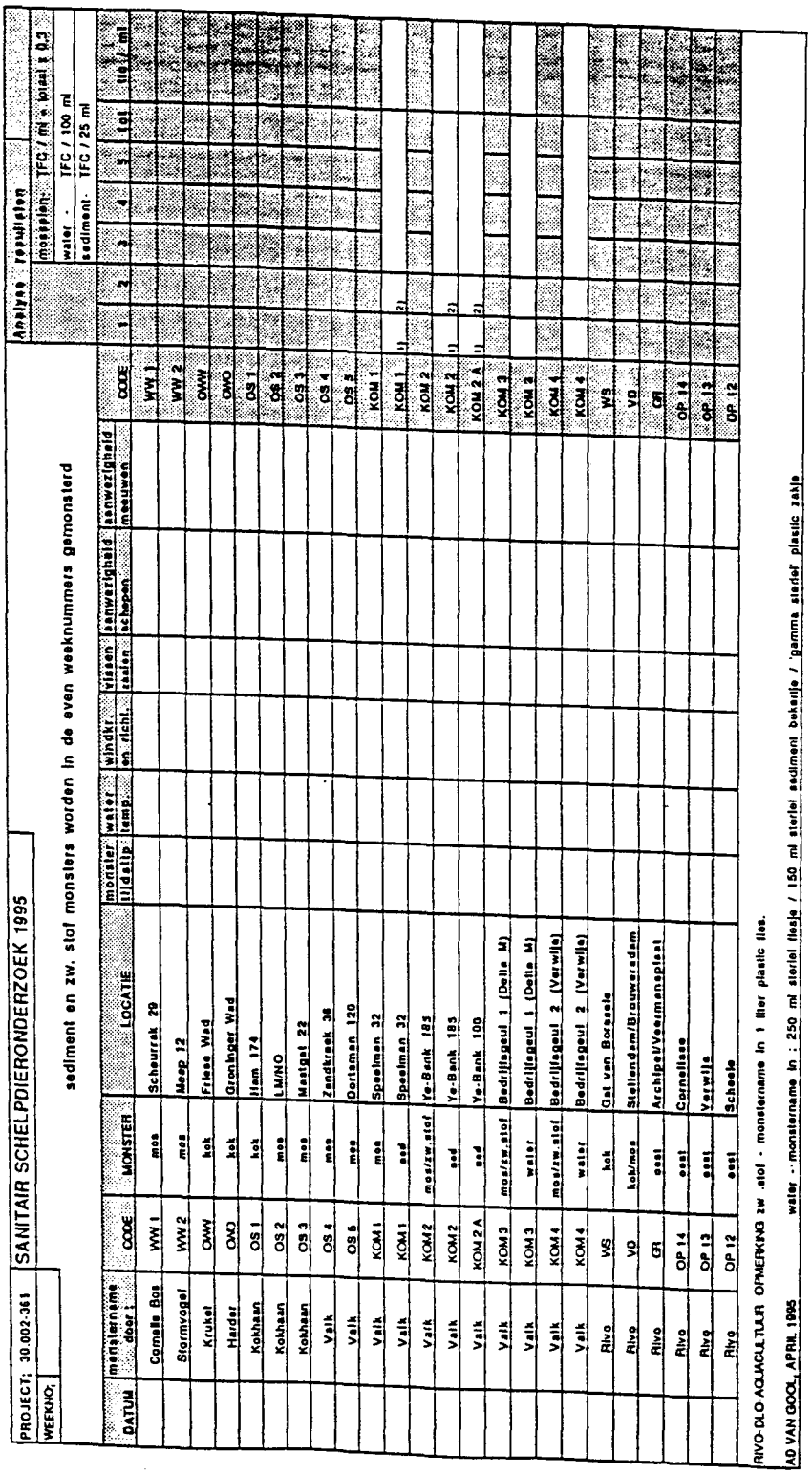
CONTROL

controlled by:
N. Hoogervorst

Bijlage 1.5

Invulblad sanitair onderzoek.

Op dit blad worden de gegevens en resultaten van de monsters genoteerd.



PROJECT: 30.002.361 | SANITAIR SCHELPDIERONDERZOEK 1995

WEEKNO:

sediment en zw. slof monsters worden in de even weeknummers gemonsterd

DATUM	monstername door :	CODE	MONSTER	LOCATIE	monster tijd/diptijd	water temp.	windkr. en richt.	vissen zeilen	aanwezigheid schepen	aanwezigheid meeuwen	CODE	Analyse resultaten 1	2	3	4	5	tot
	Comelis Bos	WW 1	mos	Schaurrak 29							WW 1						
	Stormvogel	WW 2	mos	Meep 12							WW 2						
	Kruisel	OWW	kok	Friese Wad							OWW						
	Harder	OWO	kok	Groninger Wad							OWO						
	Kokhaan	OS 1	kok	Ilsm 174							OS 1						
	Kokhaan	OS 2	mos	LWNO							OS 2						
	Kokhaan	OS 3	mos	Mestgat 22							OS 3						
	Valk	OS 4	mos	Zandkraak 36							OS 4						
	Valk	OS 5	mos	Oortsman 120							OS 5						
	Valk	KOM 1	mos	Speelman 32							KOM 1						
	Valk	KOM 1	sed	Speelman 32							KOM 1	1)	2)				
	Valk	KOM2	mos/zw.slof	Ye-Bank 185							KOM 2						
	Valk	KOM2	sed	Ye-Bank 185							KOM 2	1)	2)				
	Valk	KOM 2 A	sed	Ye-Bank 100							KOM 2 A	1)	2)				
	Valk	KOM3	mos/zw.slof	Bedrijfsgeul 1 (Delfz M)							KOM 3						
	Valk	KOM3	water	Bedrijfsgeul 1 (Delfz M)							KOM 3						
	Valk	KOM4	mos/zw.slof	Bedrijfsgeul 2 (Verwijk)							KOM 4						
	Valk	KOM4	water	Bedrijfsgeul 2 (Verwijk)							KOM 4						
	Rivo	WS	kok	Gat van Borssele							WS						
	Rivo	VD	kok/mos	Stellendam/Brouwersdam							VD						
	Rivo	GR	oost	Archipel/Veermansplaat							GR						
	Rivo	OP 14	oost	Cornelisse							OP 14						
	Rivo	OP 13	oost	Yerwijk							OP 13						
	Rivo	OP 12	oost	Schoole							OP 12						

monsters: TFC / ml + totaal x 0.5

water - TFC / 100 ml

sediment - TFC / 25 ml

RIVO-DLO AQUACULTUUR OPMERKING zw .slof - monstername in 1 liter plastic ilos.

AD VAN GOOL, APRIL 1995 water - monstername in : 250 ml steriel ilesje / 150 ml steriel sediment bakelije / 'gamma sterile' plastic zakje

Bijlage 1.6

Invulblad voor het bedrijfsleven. De geschreven waarde worden in de computer gevoerd en uitgeprint op een zelfde formulier. Het bedrijf krijgt dus het zelfde blad alleen dan getypte gegevens.

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

Krijn Verwijs B.V.
Havendijk 3
4401 NS Yerseke

rivo-dlo

uw brief van	uw kenmerk	ons kenmerk	datum
		AQ 952812 / RD	13 - 10 - 1995
onderwerp		doorkiesnummer	bijlagen
Bacteriële controle		01131-2781	

Naar aanleiding van uw verzoek worden wekelijks bemonsteringen uitgevoerd door het RIVO volgens de Warenwetregeling Visserijprodukten en werkinstructie RVV. (Ref.; Brf: Bedrijfsmonitoring, kenmerk 0672/51/JB/MZ).
De kwaliteit van de mosselen en proceswater wordt hierdoor nauwlettend in de gaten gehouden. Hierbij bericht ik U dat de monsters in week 41 onderzocht zijn op Faecale Colibacteriën (FC).
De resultaten zijn in onderstaand staatje weergegeven.

Week : 41

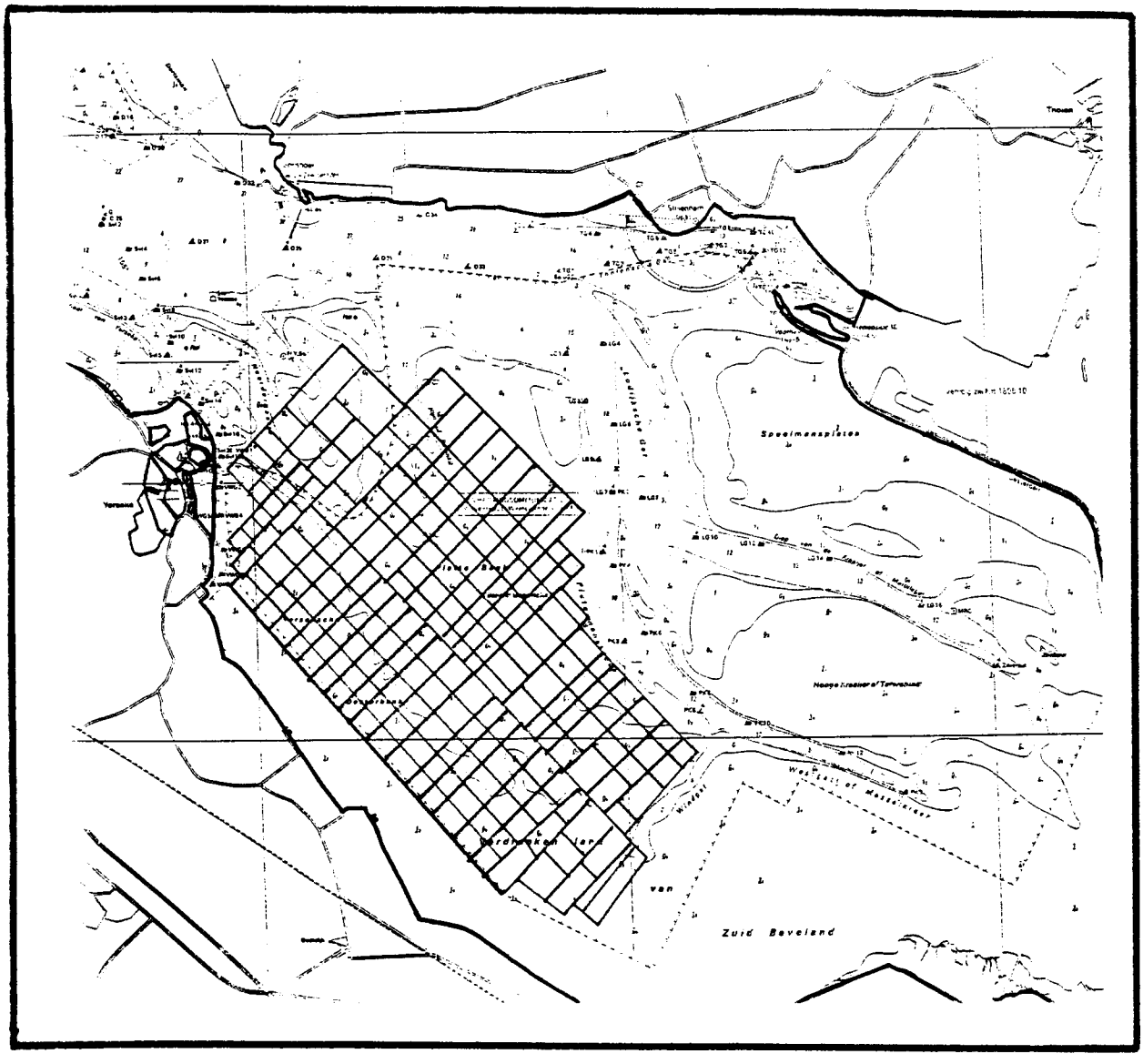
Bepaling: FC IN SCHELPDIERVLEES + -VOCHT (MOSSELEN)
Norm: 300 FC /100 ml schelpd. vlees + vocht (Richtl. 91/492/EEG; Publ. blad L 268)

DATA:		MONSTERTIJDSTIP:	FC / 100 ML:
DI:	INGANGSCONTR.	u.	
	UITGANGSCONTR.	u.	

Bijlage 2 : Mossel verwaterplaats Yerseke, ookwel "Nat-pakhuis" genoemd.

De mossel verwerkkings bedrijven in Yerseke kopen hun mosselen op de mossel veiling. De gekochte mosselen worden naar, een door het bedrijf gepacht, perceel gebracht waarop ze worden uitgestrooid. De mosselen worden hier opgeslagen tot dat ze in het bedrijf kunnen worden verwerkt. Tijdens het verblijf op deze percelen verwateren de mosselen.

Hieronder is een percelenkaart van het natpakhuis, gelegen in de kom van de Oosterschelde.



Bijlage 3 : NEN 6570, Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater.

Voorschrift voor het kwantificeren van thermotolerante bacteriën van de coligroep met behulp van membraanfiltratie.

Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater
Kwantificeren van thermotolerante bacteriën van de coligroep met behulp van membraanfiltratie

Bacteriological examination of surface water
Enumeration of thermotolerant coliform bacteria by means of membrane filtration

NEDERLANDSE NORM

NEN 6570

1e druk, oktober 1982

1 **Onderwerp**

Deze norm geeft een methode voor het aantonen van thermotolerante bacteriën van de coligroep door het filtreren van een monster water door een membraanfilter, het incuberen van het filter op een geschikte, selectieve voedingsbodem en het bevestigen van typische kolonies.

Opmerkingen

1. Raadpleeg bij deze norm NPR 6554.
2. Indien de aanwezigheid van niet-thermotolerante bacteriën van de coligroep moet worden onderzocht, gebruik dan NEN 6571.

2 **Toepassingsgebied**

De norm is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater en andere watersoorten, tenzij de aard van en/of het gehalte aan zwevend stof de bepaling verstoren.

Opmerking

Zie ook NEN 6572 voor het aantonen van bacteriën van de coligroep in oppervlaktewater met behulp van gistingsproeven.

3 **Definitie**

thermotolerante bacteriën van de coligroep: Facultatief anaerobe, Gram-negatieve, niet-sporevormende, staafvormige bacteriën die in een medium met briljantgroen en rundergal bij 44 ± 0,5 °C lactose in minder dan 48 h vergisten onder vorming van zuur en gas.

4 **Beginsel**

Filtratie van het monster water door een geschikt membraanfilter. Incubatie van het filter bij 25 °C gevolgd door incubatie bij 44 °C op een vast, lactosehoudend medium met zodanige selectieve eigenschappen dat bacteriën van de coligroep goed gedefinieerde, typische kolonies vormen. Nadere bevestiging van de identiteit van deze typische kolonies door enting in een lactosehoudend vloeibaar medium, gevolgd door incubatie bij 44 °C.

5 **Monsterneming**

Neem een monster water volgens NEN 6559.

6 **Toestellen en glaswerk**

6.1 Toestellen

6.1.1 Autoclaven voor het steriliseren van glaswerk en voedingsbodems.

6.1.2 Droogstoof voor het steriliseren van glaswerk.

6.1.3 Broedstoof ingesteld op 25 ± 1 °C.

6.1.4 Broedstoof of waterbad ingesteld op 44 ± 0,5 °C.

6.1.5 Opstelling voor membraanfiltratie met steriliseerbare trechters.

6.2 Glaswerk

Het glaswerk dient van een zodanige kwaliteit te zijn dat het bestand is tegen veelvuldig steriliseren. Borosilicaatglas voldoet aan deze eis. Het gebruik van steriele, verpakte kunststofmaterialen is toegestaan.

6.2.1 Petrischalen.

6.2.2 Cultuurbuizen 14-18 mm × 160 mm.

6.2.3 Durhambuisjes, passend in de cultuurbuizen (6.2.2).

6.2.4 Maatcilinders, 100 ml.

6.2.5 Maatpipetten, inhoud 10 ml verdeeld in 1 ml en inhoud 1 ml verdeeld in 0,1 ml.

6.3 Steriliseren van het glaswerk

Steriliseer het glaswerk volgens één der beide onderstaande methoden:
- natte sterilisatie bij 121 ± 1 °C gedurende ten minste 15 min
- droge sterilisatie bij 170 - 175 °C gedurende ten minste 1 h exclusief de opwarmtijd.

6.4 Diversen

6.4.1 Pincetten met afgeronde hoeken voor het opnemen van membraanfilters.

6.4.2 Entnaald van platina-iridium of chroom-nikkel.

7 Voedingsbodems, ingrediënten, reagentia en filters

7.1 Voedingsbodems

Gebruik bij voorkeur in droge toestand verkrijgbare voedingsbodems waarvan de samenstelling overeenkomt met de onder 7.1.1 en 7.1.2 gegeven samenstelling. Volg bij de bereiding daarvan de aanwijzingen van de fabrikant.

Bij de bereiding van voedingsbodems volgens deze norm dient zoveel mogelijk gebruik te worden gemaakt van speciaal voor dit doel in de handel gebrachte ingrediënten. Gebruik alleen chemicaliën van analytisch zuivere kwaliteit en vers gedestilleerd of gedemineraliseerd water dat vrij is van toxische of groeiremmende bestanddelen. Tenzij anders aangegeven zijn de bereide media, mits koel en in het donker bewaard en beschermd tegen uitdroging, gedurende een maand houdbaar.

7.1.1 *Laurylsulfaatagar* (LSA)

7.1.1.1 *Samenstelling*

Pepton	40 g
Gistextract	6 g
Lactose	30 g
Fenolrood, waterige oplossing, 4 g/l	50 ml
Natriumlaurylsulfaat ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$)	1 g
Agar	15 g
Water	tot 1000 ml

7.1.1.2 *Bereiding*

Los de pepton, het gistextract en de agar op onder koken in water en voeg daarna de lactose, het fenolrood en natriumlaurylsulfaat toe. Het medium zal bij sterilisatie een pH-verlaging ondergaan die afhankelijk is van de duur en de temperatuur van de sterilisatie.

Stel daarom de pH zodanig in dat na sterilisatie een pH van 7,4 tot 7,5 wordt bereikt. Verdeel het medium dan in porties van ten hoogste 250 ml over flessen of kolven en steriliseer gedurende 15 min bij 121 °C. Indien gewenst kan het medium ten hoogste een maand bij 4 °C worden bewaard. Laat (eventueel na opsmelten) het medium afkoelen tot 50 °C en giet het direct uit tot een laagdikte van ten minste 4 mm (bijv. ten minste 10 ml in een petrischaal met een middellijn van 55 mm).

7.1.2 *Briljantgroen-gal-lactose bouillon* (BGLB)

7.1.2.1 *Samenstelling*

Pepton	10 g
Lactose	10 g
Rundergal (gedroogd)	20 g
Briljantgroen, oplossing in water, 10 g/l	1,33 ml
Water	tot 1000 ml

7.1.2.2 *Bereiding*

Los de pepton onder verwarmen op in 500 ml gedestilleerd water en voeg de gedroogde rundergal toe na deze te hebben opgelost in 200 ml water. Vul aan met water tot ongeveer 975 ml en voeg de lactose toe. Stel de pH zodanig in dat na sterilisatie een pH van 7,4 wordt bereikt, voeg het briljantgroen toe en vul aan tot 1 l. Breng porties van 5 ml in de cultuurbuizen (6.2.2) voorzien van een Durhambuisje (6.2.3) en steriliseer 15 min bij 121 ± 1 °C.

7.2 Verdunningsvloeistof

Pepton-fysiologische zoutoplossing (PFZ)

7.2.1 *Samenstelling*

Pepton	1 g
Natriumchloride	8,5 g
Water	tot 1000 ml

7.2.2 *Bereiding*

Los de ingrediënten in het water op.

Stel de pH zodanig in dat deze na sterilisatie 7,0 ± 0,1 bedraagt bij 25 °C. Verdeel de verdunningsvloeistof dan in porties van ten hoogste 250 ml over flessen of kolven en steriliseer gedurende 15 min bij 121 °C. Breng porties van 7,5 ml in cultuurbuizen (6.2.2).

7.3 **Membraanfilters van cellulosenitraat of cellulose-acetaat of een mengsel daarvan**

De filters dienen een poriëngrootte van 0,45 µm te hebben, een middellijn van ten minste 47 mm en vrij te zijn van groeiremmende of -bevorderende eigenschappen. Veelal verdient het de voorkeur gebruik te maken van filters die door middel van snijdende lijnen in een aantal vierkanten zijn onderverdeeld. De hiervoor gebruikte drukinkt mag geen invloed op de groei van bacteriën hebben.
Steriliseer de filters volgens één der onderstaande methoden:
- in een autoclaaf gedurende 15 min bij 121 ± 1 °C;
- koken in water gedurende 30 min.

Het gebruik van gesteriliseerde verpakte filters is toegestaan. Het filter mag dan geen residu van desinfectiemiddelen bevatten.

8 **Voorbereiding van het onderzoek**

Begin het onderzoek onmiddellijk na de monsterneming. Bij koeling van het monster bij 0-4 °C moet binnen 24 h na monsterneming met het onderzoek worden begonnen.

9 **Uitvoering van het onderzoek**

9.1 Bereiding van verdunningen

De hoeveelheid vloeistof die in 9.2 in bewerking wordt genomen dient ten minste 10 ml te bedragen. Indien het te verwachten aantal kolonies kleiner is dan 80 per 10 ml kan het monster rechtstreeks worden onderzocht. Indien het te verwachten aantal kolonies groter is dan 80 per 10 ml onderzoek dan verdunningen van het monster zodanig dat één verdunning een aantal typische kolonies gelegen tussen 20 en 80 zal opleveren.

Opmerking

Wanneer het te verwachten aantal typische kolonies niet bekend is, dan dienen er verschillende volumina en/of verdunningen van het monster te worden onderzocht. Door tussen de opeenvolgende verdunningen of volumina een verhouding te kiezen van 4:1, mag worden verwacht dat één verdunning een aantal typische kolonies, gelegen tussen 20 en 80, zal opleveren.
Verdunningen van 1:4 kunnen als volgt worden verkregen: Breng 2,5 ml van het oorspronkelijke monster met een steriele pipet in een buis met 7,5 ml peptón-fysiologische zoutoplossing (7.2). Draag zorg voor een goede menging. Bereid op deze wijze voor elke verdunningsstap 3 buizen. Bereid met een van deze buizen op soortgelijke wijze een verdere verdunning tot 1:16, enz. Gebruik de 2 buizen voor het onderzoek.

Van een monster van onbekende samenstelling kunnen bijv. de volgende volumina worden onderzocht:
- 40 ml (onverdund);
- 10 ml (onverdund);
- 10 ml (1:4 verdund);
- 10 ml (1:16 verdund);
- 10 ml (1:64 verdund).

9.2 Isolatie

Filtreer de te onderzoeken hoeveelheid monster of een verdunning daarvan in tweevoud door een membraanfilter en spoel de trechter na met steriel water. Zuig het filter net droog en breng het zodanig op de laurylsulfaatagar (7.1.1) dat zich geen luchtbellen onder het filter vormen.

Incubeer de platen gedurende 5 ± 1 h bij 25 °C, gevolgd door 14 ± 2 h bij 44 °C. Tel na afloop van de incubatie het aantal gele kolonies.

9.3 Nader onderzoek van gele kolonies

Selecteer een aantal gele kolonies voor nader onderzoek.
Kies het aantal zo groot mogelijk, doch ten minste vijf.
Indien het aantal te onderzoeken kolonies kleiner is dan het totale aantal op een membraan, kies dan de te onderzoeken kolonies op aselecte wijze, bijvoorbeeld alle kolonies van een bepaalde sector van het membraan.
Ent de te onderzoeken kolonies elk apart in een buis briljantgroen-gal-lactosebouillon (7.1.2). Incubeer de buis bij 44 °C. Ga na 22 ± 2 h respectievelijk 44 ± 4 h na of gas is gevormd.

10 **Berekening**

Indien geen typische kolonies op de membranen aanwezig zijn, geef dan het resultaat van het onderzoek als volgt weer:

"geen bacteriën van de coligroep aangetoond in *V*"

waarin:
V is het volume van de grootste onderzochte hoeveelheid, in ml.

Indien wèl typische kolonies aanwezig zijn, bereken dan het aantal thermotolerante bacteriën van de coligroep met de formule

$$N_{tc} = \frac{m \cdot \rho}{V} \cdot f$$

waarin:
N_{tc} is het aantal thermotolerante bacteriën van de coligroep per volume monster, in ml^{-1}, afgerond volgens NEN 1047 blad 2.1.;
m is het gemiddelde van het aantal kolonies aanwezig op de duplоplaten;
ρ is de fractie van het aantal volgens 9.3 onderzochte kolonies dat tot gasvorming in staat bleek te zijn;
V is het volume van de onder 9.2 in onderzoek genomen hoeveelheid monster of verdunning daarvan, in ml;
f is de eventueel gebruikte verdunningsfactor.

Geef het aantal thermotolerante bacteriën van de coligroep op als $a \times 10^{b}$ ml^{-1} waarbij a een getal met een decimaal is, dat varieert tussen 1.0 en 9.9 en b een heel getal is.

11 **Verslag**

Vermeld in het verslag:
a. de gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van het monster;
b. de toegepaste methode: volgens NEN 6570 (1982);
c. het gevonden aantal thermotolerante bacteriën van de coligroep per ml onderzocht water;
d. de eventuele bijzonderheden, tijdens de behandeling waargenomen;
e. alle niet in de norm voorgeschreven handelingen die het resultaat kunnen hebben beïnvloed.

Titels van de vermelde normen:

NEN 1047 blad 2.1	Receptbladen voor de statistische verwerking van waarnemingen - Afronden van waarnemingen
NEN 6554	Water - Toelichting bij het onderzoek van bacteriën van de coligroep met behulp van membraanfiltratie volgens NEN 6552, 6553, 6570 en 6571
NEN 6559	Bacteriologisch onderzoek van water - Monsterneming
NEN 6571	Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater - Kwantificeren van bacteriën van de coligroep met behulp van membraanfiltratie
NEN 6572	Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater - Kwantificeren van bacteriën van de coligroep en thermotolerante bacteriën van de coligroep met behulp van gistingsproeven.

Normcommissie 390 04 "Bacteriologisch onderzoek van water"

Niets uit deze norm mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het NNI.

Nederlands Normalisatie-instituut
Kalfjeslaan 2, Postbus 5059, 2600 GB Delft, telefoon (015) 61 10 61*, telex 38144, postrekening 25301

Bijlage 4 Brieven en invulformulieren

De invulformulieren voor de bedrijven is in principe het zelfde als de brief welke naar de bedrijven wordt verstuurd. Bij een invulformulier is op de plaats waar de resultaten en gegevens over het monster staan is niets ingevuld. Met behulp van een computer worden de resultaten in de uiteindelijke brief verwerkt.

Brief welke naar Barbé BV. J. wordt verstuurd. (Barbé is een mosselverwerkings-bedrijf)
(blad 1 en 2)

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

Barbé BV. J.
Korringaweg 53
4401 NV YERSEKE

rivo-dlo

uw brief van	uw kenmerk	ons kenmerk	datum
		AQ 953350 / RD	1 - 12 - 1995
onderwerp		doorkiesnummer	bijlagen
Bacteriële controle		0113 - 572781	

Naar aanleiding van uw verzoek wekelijks direct op de hoogte te willen blijven betreffende de kwaliteit van de mosselen / proceswater op uw bedrijf aan de Korringaweg bericht ik U dat tijdens de bemonsteringen, uitgevoerd door het RIVO, in week 48 enkele Faecale Colibacteriën (FC) in het UV - behandeld water zijn waargenomen. De resultaten zijn in onderstaand staatje weergegeven.

Week : 48

Bepaling: FC IN SCHELPDIERVLEES + -VOCHT (MOSSELEN)
Norm: <300 FC /100 ml schelpd. vlees + vocht (Richtl. 91/492/EEG;Publ. blad L 268)

DATA:	MONSTERTIJDSTIP:	FC / 100 ML:
WO: 29 - 11	'gewichtslijn' 14.30 u.	30

Bijlage 4 blad 1

Tweede blad van de brief voor Barbé BV. J.
Ook de resultaten van de watermonsters worden per brief verstuurd.

bladnummer	ons kenmerk	datum
2	AQ 953350 / RD	1 - 12 - 1995

Bepaling: FC IN WATER VOOR EN NA UV BEHANDELING

WO: 29 - 11
Tijdstip monstername op het bedrijf: 14.30 u.
LW : 14.29 uur. / HW : 08.21 uur.

FC/200ml	vòòr UV:	16	
	ná UV:	2	Afdoding : 88 %
FC/100ml	ná UV:	1	

De norm voor het proceswater (< 14 FC / 100 ml) is door de Directeur van het RVV vastgesteld op grond van artikel 16 van de Warenwetregeling Visserijprodukten in samenhang met Hoofdstuk 3 punt 1, onderdeel a van Bijlage 7.

Met vriendelijke groeten,
b.a.

Drs. Renger Dijkema
(Hoofd afdeling Aquacultuur)

Invulformulier voor de resultaten van Project 30002 - 361 (Sanitair schelpdier-onderzoek).

NW. V.A's AANTEKENFORMULIEREN 95

PROJECT; 30.002-361 | SANITAIR SCHELPDIERONDERZOEK 1995

WEEKNO;

sedIment en zw. stol monsters worden In de even weeknummers gemonsterd

DATUM	monstername door :	CODE	MONSTER	LOCATIE	monster tijdstip	water temp.	windkr. en richt.	vlagen schaal	aanwezigheid schepen	aanwezigheid meeuwen	CODE	Analyse resultaten				
	Cornelis Bos	WW 1	mos	Scheurrak 29							WW 1					
	Stormvogel	WW 2	mos	Meep 12							WW 2					
	Krukel	OWW	kok	Friese Wad							OWW					
	Heider	OWO	kok	Groninger Wad							OWO					
	Kobhaan	OS 1	kok	Ilsm. 174							OS 1					
	Kobhaan	OS 2	mos	LMNO							OS 2					
	Kobhaan	OS 3	mos	Mastgat 23							OS 3					
	Valk	OS 4	mos	Zandkreek 36							OS 4					
	Valk	OS 5	mos	Dortsman 120							OS 5					
	Valk	KOM 1	mos	Speelman 32							KOM 1					
	Valk	KOM 1	sed	Speelman 32							KOM 1	1)	2)			
	Valk	KOM 2	mos/zw.stof	Ya-Bank 185							KOM 2					
	Valk	KOM 2	sed	Ya-Bank 185							KOM 2	1)	2)			
	Valk	KOM 2A	sed	Ya-Bank 100							KOM 2 A	1)	2)			
	Valk	KOM 3	mos/zw.stof	Bedrijfsgeul 1 (Delta M)							KOM 3					
	Valk	KOM 3	water	Bedrijfsgeul 1 (Delta M)							KOM 3					
	Valk	KOM 4	mos/zw.stof	Bedrijfsgeul 2 (Verwijs)							KOM 4					
	Valk	KOM 4	water	Bedrijfsgeul 2 (Verwijs)							KOM 4					
	Alva	WS	kok	Oat van Borssele							WS					
	Alva	VD	kok/mos	Stellendam/Brouwersdam							VD					
	Alva	GR	oest	Archipel/Veermansplaat							GR					
	Alva	OP 14	oest	Cornelisse							OP 14					
	Alva	OP 13	oest	Verwijs							OP 13					
	Alva	OP 12	oest	Scheele							OP 12					

monsters: TFC / ml x groot # 0.3
water - TFC / 100 ml
sedimenti- TFC / 25 ml
1 2 3 4 5 tot tfg / ml

RIVO-DLO AQUACULTUUR OPMERKING zw .stof - monstername in 1 liter plastic fles.

AD VAN GOOL, APRIL 1995 water - monstername in : 250 ml steriel flesje / 150 ml steriel sedIment bakerije / 'gamma steriel' plastic zakje

Brief voor het P.V. (Produktschap Vis).
In deze brief wordt zowel de resultaten vermeld van het bacteriologisch onderzoek als van het fytoplankton onderzoek.

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Rijksinstituut voor Visserijonderzoek

RESULTS OF THE RIVO-DLO MONITORING PROGRAMME OF THE SANITARY WATER QUALITY IN DUTCH PRODUCTION AREAS OF BIVALVE MOLLUSCS

YEAR: 1995
WEEK NR: 48

PRODUCTION AREA	Sampling station	Faecal Coliforms (counts/100 ml of meat+liquor) Norm: < 300 FC / 100 ml.	Toxic dinoflagellates (Cells/l *)			Bivalve meat toxicity (Level **)		
			PSP	DSP	ASP	PSP	DSP	ASP
Wadden Sea East	1							
	2							
Wadden Sea West	1	0					-	
	2	0					-	
	3						-	
	4						-	
	5						-	
	6						-	
	7						-	
	8		-	-	-			
	9		-	-	-			
	10							
	11						-	
Dutch North Sea	1							
	2							
	3							
Lake Grevelingen	1							
Oosterschelde								
Culture plots	1	0	-	-	-		-	
	2	0						
	3	30						
	4	0						
	5	0						
	6						-	
Rewatering plots	1	270						
	2	270					-	
Intake water for process	3	90						
	4	0						
Oyster basins	1	0						
	2	0						
	3	0						
Westerschelde	1							

Microscopic algal survey
*) Numbers of cells per l.

	(+++)	: high amounts
	(++)	: significant am'ts
	(+)	: low amounts
	(-)	: absent
PSP:	(+++)	= >10^5
	(++)	= 10^4-10^5
	(+)	= 10^3-10^4
	(-)	= <1000
DSP:	(+++)	= >1000
	(++)	= 100-1000
	(+)	= 10-100 (<15°C)
	(-)	= <10
ASP:	(+++)	= >10^6
	(++)	= 10^5 -10^6
	(+)	= 10^4 -10^5
	(-)	= <10^4

Toxicity level
**) Levels per 100 g. tissue

BIOASSAY

DSP:
(+++) = high toxicity
(++) = moderate toxicity
(+) = low toxicity
(-) = negative

(Okadaic Acid)
(+++) = >40 µg OA
(++) = 30 - 40 µg OA
(+) = 20 - 30 µg OA
(-) = <20 µg OA

HPLC

ASP: (+) = >20 µg domoic acid
PSP: (+) = >80 µg saxitoxin

Netherlands Institute for Fisheries Research
(RIVO-DLO)
Korringaweg 5
P.O. Box 77
4400 AB Yerseke
The Netherlands
Phone: +31 (0)113 572781
Facs: +31 (0)113 573477
Internet:
postmaster@rivo.agro.nl

RIVO IJmuiden
Phone: +31 (0)255 564646
Facs: +31 (0)255 564644

Drs. R. Dijkema (Head aquaculture department)

rivo-dlo

Bijlage 5: Artikel uit Nieuwsbrief nr. 7 (oktober 1995) van PCM Diagnostica.



EEN MEDIABEREIDER IN DE ROL VAN DETECTIVE



Voedingsbodems bereiden is geen eenvoudige zaak.

Niet zelden wordt PCH-Diagnostica gebeld wanneer ergens de kwaliteit van een batch bodems niet aan alle eisen voldoet.

Hier volgt een mogelijke oplossing.

Media bereiden voor microbiologisch onderzoek lijkt een eenvoudig "karweitje": Je weegt wat poedermedium af, lost het op in water, kookt of steriliseert het in de autoclaaf, laat het medium afkoelen, voegt er nog een supplement aan toe, giet het in petrischalen en...klaar is Kees!
Vaak gaat het goed, gedurende jaren zelfs, maar soms gaat er ineens iets mis, schijnbaar zonder enige aanwijsbare reden. "We doen het al jaren zo, dit hebben we nog nooit meegemaakt."
Het medium ziet er raar uit, heeft een andere kleur, de pH klopt niet, de agar is te zacht, een bepaalde bacterie wil niet groeien, andere bacteriën die geremd moeten worden, groeien toch.
Menig laboratoriummedewerker kan verslag doen van de zoektocht naar de oorzaak, soms een ware detective-story.
Hier volgt er één die zich afspeelde in een groot Streeklaboratorium in de Randstad.

Het probleem

Plots groeide een aantal stafylokokken niet meer op de Cled Agar. Gram negatieve staven en enterokokken groeiden nog wel. Dit verschijnsel deed zich meerdere malen voor.
Alle mogelijke oorzaken werden op een rij gezet en één voor één nauwkeurig onderzocht.
Misschien was er een kwaliteitsverschil tussen de verschillende potten medium, ondanks het feit dat ze tot dezelfde batch behoorden. Om dit te testen werden gedurende een maand een aantal platen geproduceerd met media afkomstig van verschillende potten en werden diverse gegevens gemeten en nauwkeurig genoteerd. De kwaliteit van de platen werd nagegaan door ze te beënten met een verdunde en een onverdunde suspensie van een ATCC-stam en met één afkomstig van de routinekweken. Deze gegevens konden geen bijdrage leveren aan de oplossing van het probleem.
Enige tijd later deed hetzelfde verschijnsel zich voor bij de Iso Sensitest Agar, die voor de gevoeligheidsbepalingen wordt gebruikt: stafylokokken groeiden niet, Enterobacteriaceae en enterokokken wel.
Men ging toen denken aan de mogelijkheid dat de pH van het pyrogeenvrij aqua dest. de oorzaak zou kunnen zijn of dat de pH van de diverse flessen water zou kunnen verschillen. Echter de pH-metingen, verricht door de apotheek waar de flessen water worden geproduceerd en de pH-meting verricht op de "bodemkamer", lieten geen verschil zien. Daarom werden van nu af aan wat meer gegevens dan tot nu toe gebruikelijk was, genoteerd: batchnummers en nummers van media en flessen, pH vóór en na bereiding van het medium en de resultaten van de diverse kwaliteitscontrole-tests.

Het probleem breidt zich uit

Na enige tijd breidde het probleem zich uit: op een partij Cled Agar werden behalve stafylokokken nu ook coliforme Gram negatieve staven geremd. Enterokokken en *Pseudomonas* groeiden nog wel.
Uitgebreide kwaliteitscontrole met ATCC-stammen en een "wilde" stam van *S. aureus, E. coli* en *Pseudomonas aeruginosa* in een verdunde en een onverdunde suspensie bracht het probleem niet tot een oplossing.
Uiteindelijk werd het probleem aan PCH-Diagnostica voorgelegd. Daar kwam het raadsel niet onbekend voor; voor dit probleem werd wel eens vaker advies gevraagd.

De oplossing

Misschien was het raadzaam eens bij te houden welke media na elkaar in de mediabereider werden bereid en welke slangen voor het gieten van elk medium waren gebruikt. Werden vaten en slangen, voor om het even welk medium, door elkaar gebruikt, voor selectieve media waarin allerlei remmende stoffen voor bacteriën aanwezig zijn, maar ook voor de niet-selectieve media? Wanneer steeds hetzelfde vat en dezelfde slang voor de bereiding van zeer verschillende media worden

gebruikt en deze niet goed gereinigd worden, bestaat het gevaar dat remmende stoffen aan het oppervlak van vaten en slangen blijven kleven. Ze kunnen zo in het volgende te bereiden medium terechtkomen, zelfs in een concentratie waarbij de remmende werking behouden blijft, met als resultaat dat bacteriën die gevoelig zijn voor die stoffen, niet op de voedingsbodem groeien.
Deze mogelijkheid werd op het Streeklaboratorium nog niet zo gek gevonden want men werkt er niet met voor bepaalde media gereserveerde vaten en uitvulslangen. Men besloot die mogelijkheid te toetsen.
Daarom werd in de mediabereider een liter CIN-Agar voor het kweken van Yersinia gemaakt. Het vat werd daarna op de gebruikelijke wijze gereinigd: enkele malen omspoelen met leidingwater. Vervolgens werd in hetzelfde vat een liter Cled Agar gemaakt. De petrischalen werden gegoten met een andere uitvulslang.
De kwaliteitscontrole-test op de Cled Agar gaf eenzelfde beeld te zien als het probleem dat zich steeds voordeed: stafylokokken en coliforme bacteriën groeiden niet, Pseudomonas en enterokokken wel.
Het aanvullende bewijs werd geleverd toen opnieuw een liter Cled Agar werd gemaakt, maar nu in een ander vat. De uitvulslang waarmee de platen werden gegoten werd op de gebruikelijke wijze schoongemaakt, nl. 5 minuten doorspoelen met heet leidingwater en daarna 15 minuten bij 121°C stoom-steriliseren. Bij controle van de Cled Agar bleek dat stafylokokken en coliforme Gram negatieve staven als kleine kolonies groeiden, Pseudomonas en enterokokken-kolonies waren normaal van grootte.
Hieruit bleek dat remmende componenten, aanwezig in selectieve voedingsbodems, tijdens de bereiding via een mediabereider en een slang kunnen worden overgebracht naar niet-selectieve voedingsbodems.

Advies

Daarom het volgende advies: Reserveer voor de produktie van niet-selectieve voedingsbodems per soort medium een eigen uitvulslang en gebruik een vat waar nooit selectieve voedingsbodems in worden gesteriliseerd. Daartoe moeten vaten en slangen worden gemerkt en de code op het bereidingsformulier worden vermeld zodat eventuele fouten kunnen worden opgespoord.

Literatuur

E. Bridson.
The development, manufacture and control of microbiological culture media. Oxoid-uitgave. Bestlecode LT 445A.

Bijlage 6: Voorschriften voor Mac. Conkey agar nr. 3 van Oxoid.

MACCONKEY AGAR NO.3

Coce: CM115

A selective medium giving excellent differentiation between coliforms and non-lactose fermenters with inhibition of Gram-positive micrococci.

Formula	gm/litre
Peptone	20.0
Lactose	10.0
Bile salts No.3	1.5
Sodium chloride	5.0
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.001
Agar	15.0
pH 7.1 ± 0.2	

Directions
Suspend 51.5g in 1 litre of distilled water. Bring to the boil to dissolve completely. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

Description
A more selective modification of MacConkey medium which is suitable for the detection and enumeration of coliform organisms and also for the detection and isolation of *Salmonella* and *Shigella* species occurring in pathological and food specimens. Due to the inclusion of a specially prepared fraction of bile salts in addition to crystal violet, the medium gives improved differentiation between coliforms and non-lactose fermenting organisms whilst Gram-positive cocci are completely inhibited.

This formulation corresponds with that recommended by the American Public Health Association[1] for the direct plating of water samples for coliform bacilli, for the examination of food samples for food poisoning organisms[2] and for the isolation of *Salmonella* and *Shigella* species in cheese[3].

Amongst other examples of the use of Oxoid MacConkey Agar No.3 are: the count of coli-aerogenes bacteria in poultry caecal specimens[4]; the count of coli-aerogenes bacteria in cattle and sheep faeces[5]; the count of coli-aerogenes and non-lactose fermenting organisms in poultry carcases[6]; bacterial counts on irradiated canned minced chicken[7]; the recognition of coli-aerogenes bacteria during investigations on the genus *Aeromonas*[8].

Anderson et al.[9] added 10µg/ml of kanamycin to MacConkey Agar to isolate epidemic strains of *Citrobacter diversus* which were causing neonatal meningitis.

The addition of 100mg of 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide to one litre of MacConkey Agar detects the enzyme β-glucuronidase[10]. The cleaved 4-methylumbelliferyl moiety is fluorescent at 366nm. Thus colonies of *Esch. coli* can be detected rapidly in mixed cultures by examining the plate under a UV lamp after overnight incubation at 35°C. However it should be remembered that other organisms may also be β-glucuronidase positive.

Technique
After inoculation the plates are usually incubated for 18 to 24 hours at 35°C and for a further 24 hours if non-lactose fermenting organisms are sought and have not appeared. Lower incubation temperatures may sometimes be used for more psychrophilic species. After 18 hours at 35°C, coliforms produce intense violet-red colonies whilst non-lactose fermenters are colourless.

Storage conditions and Shelf life
The dehydrated medium should be stored below 25°C and used before the expiry date on the label.

Store the prepared medium at 2–8°C

Quality Control
Positive control:
Escherichia coli ATCC® 25922
Shigella sonnei ATCC® 25931

Negative control:
Enterococcus faecalis ATCC® 29212

Precautions
Prolonged incubation may lead to confusing results. Do not incubate beyond 48 hours.
Test the medium with a laboratory stock strain of *Shigella* species which is in the R-phase. R-phase shigellae should grow satisfactorily on MacConkey Agar.

Bijlage 7 : Aantallen bacteriesoorten per monster.

Aantallen zijn weergegeven in KVE/3,33 ml monster.

Aantallen voor de verschillende bacteriën per monster.

Monster	Totaal kolonies	E. Coliformen	C. freundii	P. Stuartii	Micrococcaceae	Coryne/Liste	Corynebacterla	* staaf X *
KOM 3 Hospi	223	2	1	0	107	8	10	95
KOM 3 RIVO	7	1	6	0	0	0	0	0
KOM 4 Hospi	330	8	0	0	0	69	5	248
KOM 4 RIVO	12	5	4	3	0	0	0	0