

## MINISTERIE VAN LANDBOUW

N. 94 — 3036

[C — 16171]

**14 OKTOBER 1994.** — Ministerieel besluit tot vaststelling van de analysemethoden voor de officiële bepaling van de kwaliteit en de samenstelling van melk geleverd aan kopers

De Minister van Landbouw,

Gelet op de wet van 28 maart 1975 betreffende de handel in landbouw-, tuinbouw- en zeevisserijprodukten, inzonderheid op artikel 3, gewijzigd bij de wet van 29 december 1990;

Gelet op het koninklijk besluit van 3 maart 1994 betreffende de erkenning van interprofessionele organismen voor het bepalen van de kwaliteit en de samenstelling van melk;

Gelet op het koninklijk besluit van 17 maart 1994 betreffende de produktie van melk en tot instelling van een officiële controle van melk geleverd aan kopers;

Gelet op het ministerieel besluit van 17 maart 1994 betreffende de officiële bepaling van de kwaliteit en de samenstelling van melk geleverd aan kopers;

Gelet op Beschikking 91/180/EEG van de Commissie van 14 februari 1991 tot vaststelling van analyse- en testmethoden voor rauwe en voor warmtebehandelde melk;

Gelet op de Beschikking 92/608/EEG van de Raad van 14 november 1992 tot vaststelling van bepaalde analyse- en testmethoden voor warmtebehandelde melk voor rechtstreekse menselijke consumptie;

Gelet op de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, inzonderheid op artikel 3, § 1, gewijzigd bij de wetten van 9 augustus 1980, 16 juni 1989 en 4 juli 1989;

Gelet op de dringende noodzakelijkheid;

Overwegende dat het noodzakelijk is om onvervuld de analysemethoden die mogen gebruikt worden bij de officiële bepaling van de kwaliteit en de samenstelling van de melk geleverd aan kopers vast te stellen,

Besluit :

**HOOFDSTUK I. — Bepaling van de kwaliteit van de melk**

**Artikel 1. § 1.** De referentiemethode voor de bepaling van de bacteriologische kwaliteit is de telplaatmethode bij 30 °C, beschreven in bijlage 1.

§ 2. De bepaling van de bacteriologische kwaliteit mag ook uitgevoerd worden volgens :

- de Plate-Loop methode, beschreven in bijlage 2
- de Roll-Tube methode, beschreven in bijlage 3
- de Petrifilm-methode, beschreven in bijlage 4
- de epifluorescentiemicroscopie, beschreven in bijlage 5.

**Art. 2.** De referentiemethoden voor de bepaling van het gehalte aan somatische cellen zijn :

- de microscopische methode, beschreven in bijlage 6
- de fluoro-opto-elektronische methode, beschreven in bijlage 7.

**Art. 3.** De apparatuur aangewend bij de bepaling van de bacteriologische kwaliteit (kiemgetal) en van het gehalte aan somatische cellen (celgetal) van de melk, moet voorafgaandelijk erkend worden door de Dienst Dierlijke Produkten.

De aankoop van nieuwe apparatuur moet voorafgaandelijk ter kennis worden gebracht van hogervermelde dienst.

Deze zal een advies uitbrengen na raadpleging van een bevoegde wetenschappelijke instelling.

**Art. 4. § 1.** Vanaf 1 oktober 1994 worden remstoffen als volgt opgespoord :

1° Op de te onderzoeken monsters wordt een screeningsproef uitgevoerd, volgens methode A1 of A2 van bijlage 8.

2° Alle monsters die bij de screeningsproef onder punt 1° een positief of twijfelachtig resultaat vertonen, worden onderworpen aan een bevestigingsproef volgens methode B1 of B2 van bijlage 8.

3° Bij de monsters die bij de bevestiging volgens punt 2° een positief resultaat geven, wordt de aanwezigheid van sulfonamiden nagegaan volgens methode B3 of B4 van bijlage 8.

4° De monsters die geen residuen van sulfonamiden bevatten volgens punt 3° worden verder onderzocht op de aanwezigheid van penicillinen of andere groeiremmende stoffen volgens methode B5 van bijlage 8.

§ 2. Tot 30 september 1994 worden remstoffen opgespoord d.m.v. een methode met *Streptococcus thermophilus*, beschreven in de omzendbrief nr. 13.

## MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

F. 94 — 3036

[C — 16171]

**14 OCTOBRE 1994.** — Arrêté ministériel fixant les méthodes d'analyse pour la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs

Le Ministre de l'Agriculture,

Vu la loi du 28 mars 1975 relative au commerce des produits de l'agriculture, de l'horticulture et de la pêche maritime, notamment l'article 3, modifié par la loi du 29 décembre 1990;

Vu l'arrêté royal du 3 mars 1994 relatif à l'agrégation des organismes interprofessionnels pour la détermination de la qualité et de la composition du lait;

Vu l'arrêté royal du 17 mars 1994 relatif à la production du lait et instituant un contrôle officiel du lait fourni aux acheteurs;

Vu l'arrêté ministériel du 17 mars 1994 relatif à la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs;

Vu la Décision 91/180/CEE de la Commission du 14 février 1991 arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait cru et du lait traité thermiquement;

Vu la Décision 92/608/CEE du Conseil du 14 novembre 1992 arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait traité thermiquement destiné à la consommation humaine directe;

Vu les lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, notamment l'article 3 § 1, modifiées par les lois des 9 août 1980, 16 juin 1989 et 4 juillet 1989;

Vu l'urgence;

Considérant qu'il est nécessaire de fixer sans délai les méthodes d'analyse qui peuvent être utilisées lors de la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs,

Arrête :

**CHAPITRE 1er. — Détermination de la qualité du lait**

**Article 1er. § 1.** La méthode de référence pour la détermination de la qualité bactériologique est le comptage sur plaque à 30 °C, décrite à l'annexe 1.

§ 2. La détermination de la qualité bactériologique peut également s'effectuer selon :

- la méthode Plate-Loop, décrite à l'annexe 2
- la méthode Roll-Tube, décrite à l'annexe 3
- la méthode Petrifilm, décrite à l'annexe 4
- la microscopie par épifluorescence, décrite à l'annexe 5.

**Art. 2.** Les méthodes de référence pour la détermination du titre en cellules somatiques sont :

- la méthode microscopique, décrite à l'annexe 6
- la méthode fluoroptoélectronique, décrite à l'annexe 7.

**Art. 3.** L'appareillage utilisé dans le processus de la détermination de la qualité bactériologique (germes) et du titre en cellules somatiques dans le lait, doit être préalablement agréé par le Service Produits Animaux.

Tout achat de nouvel appareillage doit être signalé préalable au service susmentionné.

Celui-ci émettra un avis après consultation d'une institution scientifique compétente.

**Art. 4. § 1.** A partir du 1er octobre 1994, les substances inhibitrices sont détectées de la manière suivante :

1° Une épreuve de sélection est effectuée selon la méthode A1 ou A2 de l'annexe 8 sur les échantillons à examiner.

2° Tous les échantillons, qui ont présenté un résultat positif ou douteux lors de l'épreuve sous 1°, sont soumis à une épreuve de confirmation selon la méthode B1 ou B2 de l'annexe 8.

3° Pour les échantillons qui lors de l'épreuve de confirmation visée au point 2° ont donné un résultat positif, on examine la présence de sulfonamides selon la méthode B3 ou B4 de l'annexe 8.

4° L'analyse des échantillons qui ne contiennent pas de sulfonamides selon le point 3 est poursuivie pour déterminer la présence de penicilline ou d'autres substances inhibitrices selon la méthode B5 de l'annexe 8.

§ 2. Jusqu'au 30 septembre 1994, les substances inhibitrices sont détectées par une méthode au *Streptococcus thermophilus*, décrite dans la circulaire n° 13.

**Art. 5.** De bepaling van het vriespunt wordt uitgevoerd volgens de referentiemethode (bij middel van een thermistorcryoscoop), beschreven in bijlage 9.

**Art. 6.** De zichtbare zuiverheid wordt nagegaan d.m.v. een filtratieproef, volgens de methode beschreven in bijlage 10.

**Art. 7.** Het onderzoek naar de afwezigheid van resten van oxyderende ontsmettingsmiddelen wordt uitgevoerd volgens de methode beschreven in bijlage 11.

## HOOFDSTUK II

### Bepaling van de samenstelling van de melk

**Art. 8.** De referentiemethode voor de bepaling van het vetgehalte van volle en afgeroomde melk is de Röse-Gottlieb-methode, zoals beschreven in bijlage 12.

**Art. 9.** De referentiemethode voor de bepaling van het eiwitgehalte van volle en afgeroomde melk is de Kjeldahlmethode, zoals beschreven in bijlage 13.

**Art. 10.** De referentiemethode voor de bepaling van het vetgehalte van room is de methode Röse-Gottlieb volgens de Belgische norm NBN V21-001, 3e uitg., 1988.

**Art. 11.** De referentiemethode voor de bepaling van het eiwitgehalte van room is de Kjeldahlmethode volgens de Belgische norm NBN V21-003, 2e uitg., 1987.

**Art. 12.** De bepaling van het vet- en het eiwitgehalte op grote schaal mag gebeuren bij middel van spectrometrie in het midden van het infraroodspectrum, zoals beschreven in bijlage 14.

**Art. 13.** Om het vet- en eiwitgehalte uit te drukken in gram per liter, zoals bepaald bij artikel 1, 3<sup>o</sup> van het ministerieel besluit van 17 maart 1994 betreffende de officiële bepaling van de kwaliteit en de samenstelling van melk geleverd aan kopers, moeten de resultaten van de referentiemethoden, uitgedrukt in gram per 100 g melk, in principe vermenigvuldigd worden met de volumemassa van het betrokken melkmonster.

De referentiemethode voor de bepaling van de volumieke massa is deze beschreven in bijlage 15.

**Art. 14.** De apparatuur voor de bepaling van het vet- en het eiwitgehalte moet voorafgaandelijk door de dienst Dierlijke Produkten worden goedgekeurd.

De aankoop van nieuwe apparatuur moet voorafgaandelijk ter kennis worden gebracht van hogervermelde dienst. Deze zal een advies uitbrengen na raadpleging van een bevoegde wetenschappelijke instelling.

**Art. 15.** Dit besluit heeft uitwerking met ingang van 1 juli 1994.

Brussel, 14 oktober 1994.

A. BOURGEOIS

**Art. 5.** La détermination du point de congélation s'effectue selon la méthode de référence (à l'aide d'un cryoscope à thermistance), décrite à l'annexe 9.

**Art. 6.** L'examen de la propreté visible du lait est effectué par une épreuve de filtration selon la méthode décrite à l'annexe 10.

**Art. 7.** La recherche de l'absence de traces de désinfectants est effectuée selon la méthode décrite à l'annexe 11.

## CHAPITRE II

### Détermination de la composition du lait

**Art. 8.** La méthode de référence pour la détermination de la teneur en matière grasse du lait entier et du lait écrémé est la méthode Röse-Gottlieb, décrite à l'annexe 12.

**Art. 9.** La méthode de référence pour la détermination de la teneur en protéines du lait entier et du lait écrémé est la méthode Kjeldahl, décrite à l'annexe 13.

**Art. 10.** La méthode de référence pour la détermination de la teneur en matière grasse de la crème est la méthode Röse-Gottlieb selon la norme belge NBN V21-001, 3<sup>e</sup> éd., 1988.

**Art. 11.** La méthode de référence pour la détermination de la teneur en protéines de la crème est la méthode Kjeldahl selon la norme belge NBN V21-003, 2<sup>e</sup> éd., 1987.

**Art. 12.** A une grande échelle la détermination des teneurs en matière grasse et protéines peut également s'effectuer selon la méthode de détermination par photométrie dans le spectre infrarouge moyen, décrite à l'annexe 14.

**Art. 13.** Pour exprimer les teneurs en matière grasse et protéines en grammes par litre, comme fixé à l'article 1er, 3<sup>o</sup> de l'arrêté ministériel du 17 mars 1994 relatif à la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs, les résultats des méthodes de référence, exprimés en grammes par 100 g de lait, doivent être multipliés, en principe, par la masse volumique de l'échantillon de lait concerné.

La méthode de référence pour la détermination de la masse volumique est celle décrite à l'annexe 15.

**Art. 14.** L'appareillage utilisé pour la détermination de la teneur en matière grasse et protéines doit être agréé au préalable par le Service Produits Animaux.

Tout achat de nouvel appareillage doit être signalé au préalable au service susmentionné. Celui-ci émettra un avis après consultation d'une institution scientifique compétente.

**Art. 15.** Le présent arrêté produit ses effets le 1er juillet 1994.

Bruxelles, le 14 octobre 1994.

A. BOURGEOIS

Bijlagen bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994 tot vaststelling van de analysemethoden voor de officiële bepaling van de kwaliteit en de samenstelling van melk geleverd aan kopers

Bijlage 1 : Bepaling van het aantal micro-organismen — telplaatmethode bij 30 °C

### 1. Definitie

De term « micro-organismen » betekent : organismen die bij aërobe bebroeding onder de beschreven omstandigheden telbare kolonies vormen.

### 2. Principe

Een bekend volume van de melk wordt in petrischalen gemengd met het voedingsmedium en gedurende 72 uur bij 30 °C bebroed. De kolonies worden geteld en het aantal micro-organismen per 1 ml rauwe of gepasteuriseerde melk of per 0,1 ml gepreïncubeerde UHT of gesteriliseerde melk wordt berekend.

### 3. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder :

#### 3.1. Apparatuur

— Hete luchtstoof, instelbaar op 170 tot 175 °C.

— Autoclaaf, instelbaar op 121 ± 1 °C.

— Broedstoof, waarin op elke plaats een temperatuur van 30 ± 1 °C kan worden gehandhaafd.

— pH-meter, met temperatuurcompensatie en nauwkeurig tot op ± 0,1 pH-eenheid.

— Waterbad, instelbaar op 45 ± 1 °C.

— Loep, vergroting 2-4x.

— Loep, vergroting 8-10x.

— Telapparaat.

— Menger, voor het mengen van 1 ml van het melkmonster of decimale verdunningen daarvan met 9 ml verdunningsvloeistof, werkend door middel van excentrische rotatie van de inhoud van de reageerbuis.

### 3.2. Glaswerk

— Reageerbuizen, met geschikte doppen en groot genoeg voor 10 ml van de eerste verdunning of van volgende decimale verdunningen en voldoende kopruimte om te mengen.

— Kolven, met een inhoud van 150 tot 250 ml of buizen van ongeveer 20 ml om het voedingsmedium in te bewaren.

— Pipetten (met wattenprop), van glas of steriel synthetisch materiaal met gave punt, een nominale inhoud van 1 ml en een uitstroomopening van 1,75 tot 3 mm.

— Petrischalen, van helder, ongekleurd glas of steriel synthetisch materiaal met een inwendige diameter van ongeveer 90-100 mm. De inwendige hoogte moet ten minste 10 mm zijn. De bodem mag geen onregelmatigheden hebben die bij het tellen van de kolonies kunnen storen.

— Sterilisatie van glaswerk.

Glaswerk moet volgens één van de volgende methoden worden gesteriliseerd :

a) door verhitting in een hete-luchtstoom gedurende tenminste 1 uur op 170 tot 175 °C;

b) door verhitting in een autoclaaf gedurende ten minste 20 minuten op  $121 \pm 1$  °C.

In de autoclaaf moet voor een voldoende stoomverdeling worden gezorgd; als het glaswerk bij voorbeeld in bakken wordt gesteriliseerd, mogen deze niet volledig worden afgesloten en moeten de doppen van de kolven loszitten.

Het in de autoclaaf gesteriliseerde glaswerk moet worden gedroogd door afzuiging van de stoom.

Pipetten moeten in een hete-luchtstoom worden gesteriliseerd.

### 4. Voedingsmedium — « Milk Plate Count Agar »

#### 4.1. Samenstelling

Gistextract : 2,5 g

Trypton : 5,0 g

D(+)-glucose of dextrose : 1,0 g

Magere-melkpoeder : 1,0 g

Agar : 10 tot 15 g; afhankelijk van de geleereigenschappen van de gebruikte agar

Water : 1.000 ml.

Het magere-melkpoeder moet vrij zijn van groeiremmende stoffen. Dit moet worden vastgesteld door vergelijkende proeven met magere-melkpoeder waarvan bekend is dat het geen groeiremmende stoffen bevat.

#### Bereiding

Suspendeer en los de bestanddelen in de volgende volgorde in het water op : gistextract, trypton, glucose en ten slotte magere-melkpoeder. Verwarming van de suspensie zal het oplossen versnellen. Voeg de agar toe en breng onder voortdurend roeren aan de kook totdat de agar volledig is opgelost, of stoom gedurende ongeveer 30 minuten.

Filtreer zo nodig door filtreerpapier.

Controleer de pH met een pH-meter en corrigeer de pH zo nodig met een oplossing van natriumhydroxide of zoutzuur (ten minste 0,1 mol/l), zodat na sterilisatie de pH  $6,9 \pm 0,1$  bedraagt bij 25 °C.

#### 4.2. Verdeling, sterilisatie en bewaring van het voedingsmedium

Verdeel het medium in hoeveelheden van 100 tot 150 ml in kolven of van 12 tot 15 ml in buizen. Sluit kolven en buizen af.

Steriliseer gedurende 15 minuten in de autoclaaf bij  $121 \pm 1$  °C.

Controleer de pH van het medium.

Bewaar het medium, als het niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, doch niet langer dan één maand na de bereiding.

#### 4.3. In de handel verkrijgbaar gedroogd voedingsmedium

Het voedingsmedium kan worden bereid uit in de handel verkrijgbaar gedroogd medium. Volg de aanwijzingen van de fabrikant op, maar voeg vóór het oplossen magere melkpoeder toe als dit er geen bestanddeel van vormt.

Stel de pH in op  $6,9 \pm 0,1$  bij 25 °C (zoals beschreven in punt 4.1) en verdeel, steriliseer en bewaar het medium volgens punt 4.2.

### 5. Verdunningsvloeistoffen

#### 5.1. Pepton/zoutoplossing

Samenstelling :

Pepton : 1,0 g

Natriumchloride (NaCl) : 8,5 g

Water : 1.000 ml.

#### Bereiding :

Los de bestanddelen op in water en verwarm zo nodig.

Controleer de pH met een pH-meter en stel zo nodig de pH in zodat deze na sterilisatie  $7,0 \pm 0,1$  is bij 25 °C; gebruik hiervoor een oplossing (ten minste 0,1 mol/l) van natriumhydroxide of zoutzuur.

#### 5.2. Verdeling, sterilisatie en bewaring van de verdunningsvloeistof

Verdeel de verdunningsvloeistof in reageerbuizen zodat na sterilisatie elke buis een hoeveelheid van  $9,0 \pm 0,2$  ml verdunningsvloeistof bevat. Sluit de buizen af.

Steriliseer deze gedurende 15 minuten in de autoclaaf op  $121 \pm 1$  °C.

Controleer de pH van de verdunningsvloeistof.

Bewaar de verdunningsvloeistof, als deze niet direct wordt gebruikt, in het donker bij een temperatuur tussen 1 en 5 °C, maar niet langer dan één maand na de bereiding.

#### 5.3. In de handel verkrijgbare gedroogde verdunningsvloeistoffen

De verdunningsvloeistof kan worden bereid uit in de handel verkrijgbare gedroogde tabletten of poeders. Volg de aanwijzingen van de fabrikant. Stel de pH in zoals in punt 5.1. is beschreven en verdeel, steriliseer en bewaar de verdunningsvloeistoffen volgens punt 5.2.

## 6. Werkwijze

## 6.1. Smelten van het medium

Smelt vóór het begin van het microbiologische onderzoek de benodigde hoeveelheid van het medium snel en koel het medium tot  $45 \pm 1$  °C in een waterbad.

## 6.2. Voorbehandeling van het melkmonster

Meng de melk grondig om de micro-organismen zo gelijkmatig mogelijk te verdelen door de monsterpot snel 25 keer om te keren. Vermijd de vorming van schuim en laat ontstaan schuim oplossen. Tussen het mengen en het nemen van een te onderzoeken hoeveelheid mogen niet meer dan drie minuten verstrijken.

6.3. Bereiding van de eerste verdunning ( $10^{-1}$ )

Breng met een steriele pipet 1 ml van het melkmonster (punt 6.2.) over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 5.1.) en vermijd daarbij contact tussen pipet en verdunningsvloeistof. De temperatuur van de verdunningsvloeistof moet ongeveer gelijk zijn aan die van het monster melk. Meng deze eerste verdunning gedurende 5 tot 10 seconden zorgvuldig met de menger.

Op deze wijze wordt een eerste verdunning van  $10^{-1}$  verkregen.

## 6.4. Bereiding van verdere decimale verdunningen

Breng met een steriele pipet 1 ml van de eerste verdunning (punt 6.3.) over in 9 ml verdunningsvloeistof (punt 5.1.) volgens de aanwijzingen in punt 6.3.

Zo wordt de  $10^{-2}$ -verdunning verkregen.

Herhaal deze handelingen om verdere decimale verdunningen te maken totdat naar verwachting een geschikt aantal micro-organismen wordt verkregen (punt 7.1.).

## 6.5. Enten van de petrischalen

Breng met een steriele pipet 1 ml van het monster en/of de gewenste verdunning in een schaal. Ten minste twee verdunningen moeten worden onderzocht. Ent met elke gekozen verdunning (punt 7.1.) één schaal.

## 6.6. Gieten

Giet 15 tot 18 ml medium (punt 6.1.) in elke geënte schaal.

Meng, na het gieten, direct door de petrischaal voldoende te zwenken om na bebroeding gelijkmatig verdeelde kolonies te krijgen.

Tussen de voorbehandeling van het monster melk en, afhankelijk van de soort melk, het mengen van de te onderzoeken hoeveelheid of de verdunning met het medium mogen niet meer dan 15 minuten verlopen.

Laat stollen op een schoon en koel horizontaal oppervlak.

## 6.7. Bebroeden van petrischalen

Breng de schalen in de broedstof. Bebroed de schalen met de bodem naar boven. Zet niet meer dan zes schalen op elkaar. Gestapelde schalen mogen elkaar en de wand en bovenkant van de stof niet raken.

Bebroed  $72 \pm 2$  uur bij  $30 \pm 1$  °C.

## 6.8. Telling van de kolonies

Tel de kolonies in de platen met niet meer dan 300 kolonies.

Onderzoek de platen in indirect licht. Ter vereenvoudiging van het tellen kan een geschikte loop en/of een telapparaat worden gebruikt. Verwar bij het tellen geen vaste deeltjes in de schalen met zeer kleine kolonies. Onderzoek waar nodig twijfelachtige deeltjes zorgvuldig met een sterker vergrotende loop om kolonies van vreemde deeltjes te kunnen onderscheiden.

Spreadende kolonies worden als een enkele kolonie beschouwd. Tel, als minder dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid, de kolonies op het resterende deel van de plaat en herleid dit resultaat tot de totale oppervlakte van de plaat. Laat de plaat buiten beschouwing als meer dan een kwart van de plaat door kolonies is overgroeid.

## 7. Berekening en weergave van de resultaten

7.1. Gebruik de uitkomsten van alle platen met tussen de tien en 300 kolonies (punten 7.3. en 7.4.).

7.2. Het aantal micro-organismen per ml melk wordt gegeven door de formule :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

waarin :

$\sum C$  = de som van alle volgens punt 7.1. getelde kolonies

$(n_1 + 0,1 n_2) d$  = het volume van het in de schalen gebrachte monster, waarin :

$n_1$  = het aantal getelde platen met de eerste verdunning,

$n_2$  = het aantal getelde platen met de tweede verdunning,

$d$  = de verdunningsfactor waarbij de eerste telling werd uitgevoerd.

Het getal wordt afgerond op de eerste twee cijfers. Indien het af te ronden cijfer een 5 is, rond dan zo af dat het cijfer links ervan even blijft of wordt.

Voorbeeld :

Verdunning  $10^{-2}$  : 278 en 290 kolonies

Verdunning  $10^{-3}$  : 33 en 28 kolonies

$$\text{Aantal/ml} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}}$$

$$= \frac{629}{0,022}$$

$$= 28.590$$

$$= 29.000$$

$$= 2,9 \times 10^4$$

7.3. Als alle tellingen een lagere uitkomst geven dan 10, geef dan het aantal micro-organismen per millimeter op als « minder dan  $10 \times d$  per ml »; «  $d$  » is hierbij de reciproke van de laagste verdunningsfactor.

7.4. Als alle tellingen hoger zijn dan 300 kolonies, maar telling mogelijk is, bereken dan een geschat aantal en vermenigvuldig dat met de reciproke van de verdunningsfactor. Rapporteer het resultaat als « geschat aantal micro-organismen per ml ».

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

#### Bijlage 2 :

Bepaling van micro-organismen — Telling van het aantal aërobe koloniën bij 30 °C : Plate Loop-methode

##### 1. Principe

Een melkmonster wordt opgenomen met een öse met vastgelegde afmetingen en afgespoten met steriele Ringeroplossing in een petriplaat. Na het toevoegen van de voedingsbodem en incubatie gedurende  $72 \pm 2$  uur bij  $30 \pm 1$  °C wordt het aantal kolonies geteld.

##### 2. Voedingsmedium en verdunningsvloeistoffen

###### 2.1. Ingrediënten

Om de betrouwbaarheid van de resultaten te verbeteren, is het aan te raden om voor de bereiding van het voedingsmedium en van de verdunningsvloeistoffen, droge ingrediënten of een volledig, droog medium te gebruiken. De aanwijzingen van de fabrikant moeten nauwkeurig nageleefd worden.

De gebruikte chemische produkten moeten van analytische kwaliteit zijn.

Het gebruikte water moet gedestilleerd zijn in een glazen toestel, of gedemineraliseerd. Het moet vrij zijn van stoffen die de groei van micro-organismen in de proefomstandigheden zouden kunnen remmen en dient daartoe regelmatig gecontroleerd te worden, speciaal in het geval van gedemineraliseerd water.

Voor het instellen van de pH van de verdunningsvloeistoffen of van het voedingsmedium moeten natriumhydroxide- of chloorwaterstofzuuroplossingen gebruikt worden van ongeveer 0,1 mol/l.

Indien het voedingsmedium of de verdunningsvloeistoffen niet onmiddellijk gebruikt worden, moeten ze in het donker bewaard worden tussen 0 — 5 °C gedurende ten hoogste 1 maand, onder omstandigheden waarin geen rijziging in hun samenstelling optreedt.

###### 2.2. Voedingsmedium

Trypton : 5,0 g

Gistextract : 2,5 g

Glucose ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ) : 1,0 g

Afgeroomde melkpoeder : 1,0 g

Agar, afhankelijk van de geleereigenschappen : 12 — 18 g

Water : 1000 ml

pH, na sterilisatie bij 25 °C :  $6,9 \pm 0,1$

Het afgeroomde melkpoeder moet vrij zijn van inhiherende stoffen.

Los de ingrediënten of het volledige droge medium op in het verwarmd water dat daarna afgevoerd is aan de kook wordt gebracht, tot alle ingrediënten zijn opgelost. Ingeval een volledig medium wordt gebruikt, volg de instructies van de fabrikant, maar voeg steeds het afgeroomde melkpoeder toe aan het medium dat er geen bevat, ook al beschouwt de fabrikant deze toevoeging als overbodig.

Meet de pH bij 45 °C en stel hem eventueel in tussen 7,0 en 7,1, teneinde na sterilisatie de vereiste pH te bekomen.

Verdeel het medium over proefbuizen à rato van 12 tot 15 ml per buis, of over flessen à rato van 100 tot 150 ml per fles.

Steriliseer in de autoclaaf gedurende 15 min. bij 121 °C.

###### 2.3. Verdunningsvloeistoffen

###### 2.3.1. Pepton-zoutoplossing

Pepton : 1,0 g

Natriumchloride : (NaCl) 8,5 g

Water : 1000 ml

Los de bestanddelen op in water, verwarm indien nodig. Controleer de pH en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen.

###### 2.3.2. Ringeroplossing — 1/4 sterkte

Natriumchloride (NaCl) : 2,25 g

Kaliumchloride (KCl) : 0,105 g

Calciumchloride, watervrij ( $CaCl_2$ ) : 0,06 g

Natriumwaterstofcarbonaat ( $NaHCO_3$ ) : 0,05 g

Water : 1000 ml

Los de zouten op in water.

Controleer de pH en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen.

###### 2.3.3. Peptonoplossing

Pepton : 1,0 g

Water : 1000 ml

Los het pepton op in het water.

Controleer de pH en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen.

###### 2.3.4. Verdelling en sterilisatie van de verdunningsvloeistoffen

Verdeel de verdunningsvloeistof in flessen of in proefbuizen, zodat na sterilisatie elke fles 90 ml en elke proefbuis 9,0 ml bevat.

Steriliseer in de autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 min.

### 3. Apparatuur en glaswerk

#### 3.1. Entinstrument

Het materiaal wordt weergegeven in figuur 1. Men gebruikt een oogje dat geschikt is om 0,001 ml melk op te nemen en gemaakt is uit een platina-rhodium of een platina-iridium draad met een diameter van 0,4 mm (vb. B & S standaardmaat nr. 26). Het oogje moet volkomen rond zijn en bevestigd aan een draad van 70 mm. Deze laatste dient de volgende vorm te hebben:

het oogje wordt omgebogen over een hoek van 30° op 3 tot 4 mm van het uiteinde.

Het andere uiteinde van de draad wordt op verschillende plaatsen gebogen.

Dit gebogen deel wordt in een hypodermische Luer-Lok injectienaald (standaardmaat 13), afgezaagd op een lengte van 24-28 mm van de basis van het naaldgedeelte, bevestigd. Het uitstekende deel moet 12-14 mm lang zijn.

Opmerking: de in de handel verkrijgbare oognaalden worden bij voorkeur gebruikt. De interne diameter dient tussen 1,25-1,50 mm te liggen.

De hypodermische Luer-Lok met het oognaaldje wordt op een Cornwall spuit bevestigd. De spuit is door een gummislang verbonden met een erlenmeyer die steriele Ringeroplossing (1/4 sterkte) bevat. De Cornwall spuit moet 2 ml verdunningsvloeistof kunnen pipetteren. De interne diameter van de gummislang bedraagt 3,0 mm.

#### 3.2. Gebruikelijke apparatuur en glaswerk voor het microbiologische laboratorium

Voorgesteriliseerd materiaal voor éénmalig gebruik mag aangewend worden i.p.v. gewoon glaswerk, op voorwaarde dat zijn kwaliteit aanvaardbaar is. Het gewone glaswerk moet chemisch inert zijn en bestand tegen herhaald steriliseren.

##### 3.2.1. Apparatuur

— Autoclaaf, regelbaar op 121 °C.

— Warme-luchtoven, die op een temperatuur tussen 170 en 175 °C kan gehouden worden.

— Incubator waarin een uniforme temperatuur van 30 ± 1 °C kan bekomen worden.

— pH-meter met temperatuurscompensatie, nauwkeurig tot op 0,1 pH-eenheid.

— Balans, nauwkeurig tot op 0,01 g.

— Waterbad, regelbaar op 45 ± 1 °C

— Kolonieteltoestel met verlichting en vergrootglas.

— Mengapparaat, in staat om 1 ml monster of verdunning te mengen met verdunningsvloeistof en waarvan het principe gebaseerd is op excentrische rotatie van de proefbuizen (Vortex menger).

##### 3.2.2. Glaswerk

— Verdunningsflessen met voldoende inhoud voor 90 ml verdunningsvloeistof.

— Proefbuizen van 15 tot 20 ml.

— Flessen van 150 tot 250 ml of proefbuizen van 15 tot 20 ml, bestemd om het voedingsmedium te bevatten.

— Pipetten van 1 ml met maatverdelingen van 0,1 ml en pipetten van 10 ml met maatverdelingen van 1 ml. Zij dienen bovenaan afgesloten te zijn met een watten prop. De opening van de uitloop bedraagt 2 tot 3 mm.

— Petriplaten van doorzichtig en kleurloos glas of kunststof met een binnendiameter van 85 tot 100 mm. De bodem mag geen onregelmatigheden noch verhevenheden vertonen, die kunnen interfereren bij de kolonietelling.

### 4. Werkwijze

4.1. Steriliseer de Petriplaten in een hete luchtoven bij 170 °C gedurende minstens 1 uur of indien geen hete luchtoven aanwezig is, in een autoclaaf gedurende 20 min. bij 121 ± 1 °C.

4.2. Steriliseer alle elementen van het entinstrument door het te koken in water gedurende 10 minuten. Monteer aseptisch de verschillende onderdelen zoals in de figuur is weergegeven.

Laat het instrument afkoelen.

Pomp snel verdunningsvloeistof in de syringe.

Vooraleer met het bacteriologisch onderzoek begonnen wordt zal men de oognaald in een vers bereide hypochloriet-oplossing (50 mg/l actief chloor) dippen. De oognaald wordt een paar maal met verdunningsvloeistof afgespoten. Tenslotte brengt men 1 ml verdunningsvloeistof in een Petriplaat. Deze plaat wordt gemerkt met « blanco van het entinstrument ».

#### 4.3. Smelten van de voedingsbodem.

Vóór aan het microbiologisch onderzoek te beginnen de benodigde hoeveelheid voedingsmedium snel laten smelten in kokend water of onder stoom en zo snel mogelijk afkoelen in het waterbad, afgesteld op 45 °C.

#### 4.4. Voorbereiding van het monster

Homogeniseer het melkmonster door het recipiënt met het monster 25 maal om te keren. Vermijd schuimvorming of laat het schuim dispergeren. De tijdspanne tussen het mengen en het nemen van de proefportie mag niet meer dan 3 min. bedragen.

#### 4.5. Monsterneming met de oognaald

Dompel het oogje zorgvuldig driemaal opeenvolgend vertikaal in het monster tot aan het buigpunt (d.i. 3 tot 4 mm). De opgaande en neergaande bewegingen dienen zoveel mogelijk uniform te zijn en gebeuren over een afstand van ongeveer 30 mm. Elke verticale beweging zal ongeveer 1 seconde duren. De uniforme uitvoering van het indompelen en uittrekken van de oognaald kan vergemakkelijkt worden door gebruik te maken van een metronoom. De snelheid van het uittrekken heeft een invloed op de hoeveelheid opgenomen melk (bij te traag uittrekken zal het volume kleiner zijn dan 0,001 ml; indien te snel zal het volume groter zijn dan 0,001 ml).

#### 4.6. Enting van de Petriplaten

Hef het deksel van een steriele Petriplaat op, breng de oognaald in de plaat en spuit de oognaald met 1 ml Ringeroplossing af.

#### 4.7. Gieten van de voedingsbodem in de Petriplaten

Giet in iedere geënte plaat 10 tot 12 ml van het gesmolten en tot 45 °C afgekoelde voedingsmedium (dikte 3-4 cm).

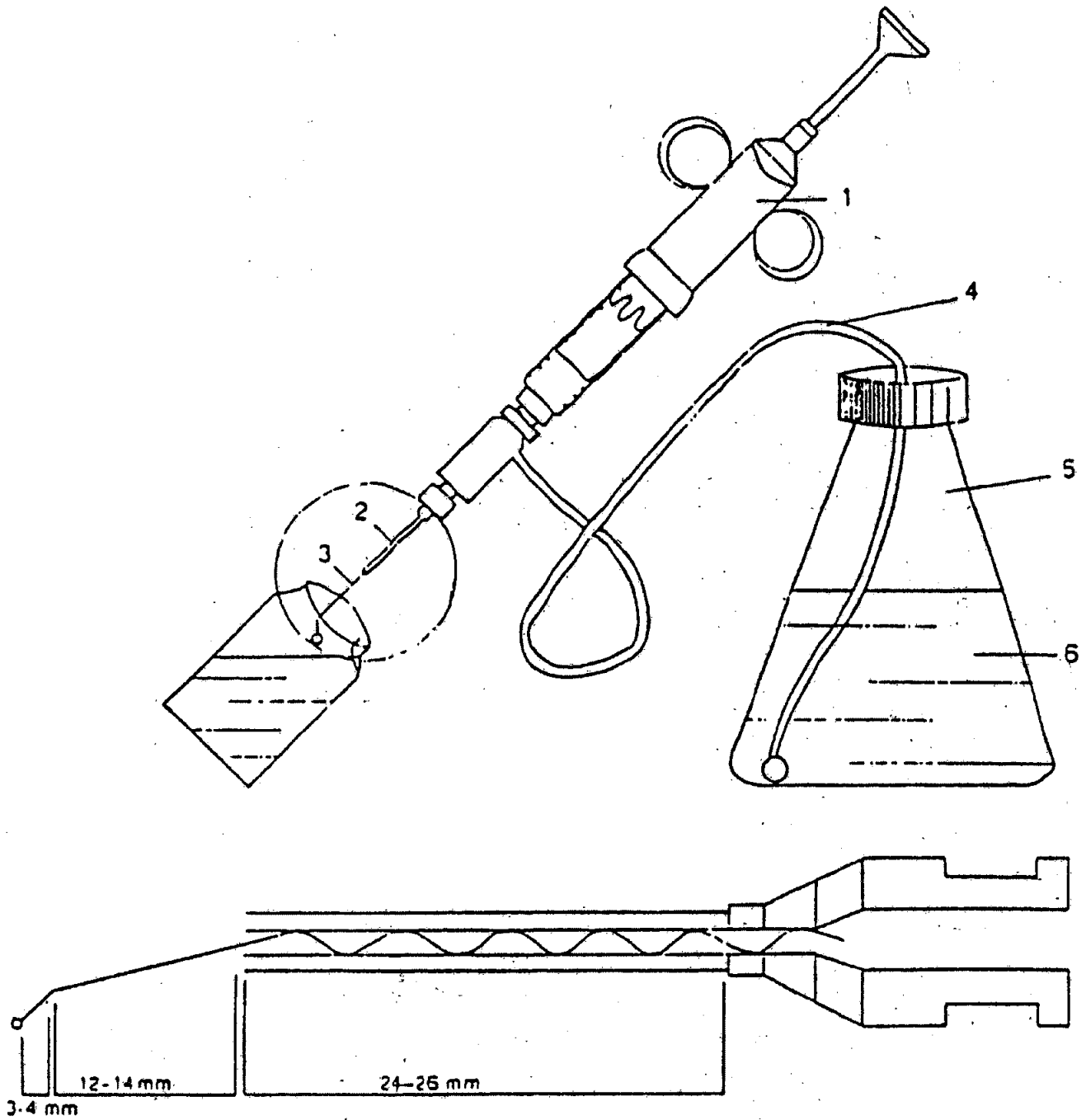
Meng, onmiddellijk na het inbrengen, het voedingsmedium zorgvuldig met het inoculum door rondraaien van de plaat.

Laat de petriplaten staan op een horizontaal en proper oppervlak tot het voedingsmedium gestold is.

#### 4.8. Incubatie

Zet de petriplaten omgekeerd in de incubator; het is wenselijk niet meer dan 6 platen op elkaar te stapelen. De stapels platen mogen mekaar onderling niet raken, noch contact maken met de wanden of de bovenzijde van de incubator.

Incubeer gedurende 72 ± 2h bij 30 °C.



1. Cornwall spuit

2. hypodermische Luer-Lok injectienaamd

3. oognaald

4. gummislang, interne diameter 0,3 cm

5. recipient met verdunningsvloeistof

6. verdunningsvloeistof

Figuur : Entinstrument

## 4.9. Telling van de koloniën

Tel de koloniën op de petriplaten binnen de 4h na het einde van de incubatie. Om het tellen te vergemakkelijken, is het aangeraden een kolonietel-toestel met verlichting en vergrootglas te gebruiken.

Een overwoekerende kolonie moet geteld worden als één kolonie. Zo minder dan een kwart van de plaat overdekt is met overwoekerende koloniën, tel dan de koloniën op het niet aangetaste deel van de plaat en bereken het overeenstemmende aantal voor de volledige plaat. Zo meer dan een kwart van de plaat overdekt is met overwoekerende koloniën, elimineer dan de plaat.

## 5. Uitdrukking van het resultaat

Bereken het kiemgetal per ml door het aantal kolonies te vermenigvuldigen met 1000.

Opmerking : verricht voldoende blankobepalingen ter controle van de steriliteit van de voedingsbodem, de verdunningsvloeistof, de Petriplaten, enz...

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,

A. BOURGEOIS

## Bijlage 3 :

Bepaling micro-organismen — Telling van het aantal aërobe koloniën bij 30 °C : Roll-Tube-methode

## 1. Definitie

Onder micro-organismen wordt verstaan : organismen die telbare koloniën vormen bij een aërobe incubatie onder de beschreven voorwaarden.

## 2. Principe

Een monster wordt in een proefbuis gebracht met verdunningsvloeistof. Na toevoeging van voedingsbodem wordt de proefbuis afgesloten. De voedingsbodem wordt in een film op de proefbuis gebracht door gelijktijdige horizontale rotatie en koeling van de proefbuis. Na incubatie bij 30 °C gedurende 72h worden de koloniën visueel of automatisch met een koloniënteller geteld.

## 3. Apparatuur en glaswerk

## 3.1. Apparatuur

- Hete luchtoven, werkzaam bij 170-175 °C
- Autoclaaf, werkzaam bij 121 °C
- Broedstoof, op elk punt werkzaam bij 30 °C
- Automatisch pipetteerapparaat met reiniging tussen de monsternamen
- Ose-apparaat met verschillende ösen gemaakt uit een nikkelchromlegering. De ösen moeten allen dezelfde hoeveelheid melk kunnen overbrengen. Een intermediaire reiniging moet mogelijk zijn. De ösen zullen in een hoek van 10° staan ten opzichte van de as om een goede menging in zowel monster, verdunningsvloeistof als reinigingsvloeistof (hypochloriet) mogelijk te maken
- Automatische dispenser voor voedingsbodem bestaande uit een dubbelwandige container met circulerend water om een constante temperatuur van de voedingsbodem van 47 °C te waarborgen
- Rotatietoestel voor proefbuizen met gelijktijdige koeling via leidingwater
- pH-meter, met temperatuurcompensatie, nauwkeurig tot 0,1 pH-eenheid
- Koloniënteller werkend volgens het « light scattering »-principe.

## 3.2. Glaswerk

Steriele proefbuizen met geschikte steriele siliconestoppen. De sterilisatie gebeurt in de hete luchtoven of in de autoclaaf.

## 4. Verdunningsvloeistoffen en voedingsbodem

Om de betrouwbaarheid van de resultaten te verbeteren, is het aan te raden om voor de bereiding van het voedingsmedium en van de verdunningsvloeistoffen, droge ingrediënten of een volledig, droog medium te gebruiken. De aanwijzingen van de fabrikant moeten nauwkeurig nageleefd worden.

Alle ingrediënten zullen van « pro analyse » kwaliteit zijn. Om de pH aan te passen kan een oplossing van HCl (0,1 molair) of NaOH (0,1 molair) gebruikt worden.

Indien de verdunningsvloeistof niet onmiddellijk gebruikt wordt, dan kan ze bewaard worden bij 0 tot 5 °C in het donker. Na bereiding mag de bewaarduur maximaal 1 maand bedragen.

## 4.1. Verdunningsvloeistoffen

## 4.1.1. Pepton-zoutoplossing

Pepton 1,0 : g  
Natriumchloride (NaCl) : 8,5 g  
Water : 1000 ml

Los de bestanddelen op in water, verwarm indien nodig. Controleer de pH en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen.

## 4.1.2. Ringeroplossing — 1/4 sterkte

Natriumchloride (NaCl) : 2,25 g  
Kaliumchloride (KCl) : 0,105 g  
Calciumchloride (CaCl<sub>2</sub>) : 0,06 g  
Natriumbicarbonaat (NaHCO<sub>3</sub>) : 0,05 g  
Water : 1000 ml

Los de zouten op in water.

Controleer de pH en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen.

## 4.1.3. Verdeling, sterilisatie en bewaring van de verdunningsvloeistoffen

Verdeel de verdunningsvloeistof in proefbuizen zodat elke buis na sterilisatie ca. 1,3 ml bevat. Steriliseer in een autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 min.



## 4.2. Voedingsbodem

### 4.2.1. Samenstelling

Plate Count Agar : 28,5 g

Agar : 10 tot 15 g, afhankelijk van de geleereigenschappen

Afgeroomd melkpoeder : 1,0 g

Water : 1000 ml

Het afgeroomde melkpoeder moet vrij zijn van remmende stoffen.

### 4.2.2. Bereiding

Gebruik bij voorkeur een gedroogd handelspreparaat (\*).

Meng het handelspreparaat (voor de hoeveelheid : zie de instructies van de fabrikant) en de agar met het water. De toevoeging van het afgeroomd melkpoeder en de overmaat agar is noodzakelijk.

Controleer de pH en stel eventueel in om na sterilisatie een pH van 6,9 te bekomen bij 25 °C.

Steriliseer in een autoclaaf gedurende 15 minuten bij 121 °C.

Breng voor gebruik de voedingsbodem steriel over in de dubbelwandige container van de dispenser.

## 5. Werkwijze

5.1. Meng de melk grondig om de micro-organismen zo gelijkmatig mogelijk te verdelen door de monsterpot spel 25 keer om te keren. Vermijd de vorming van schuim en laat ontstaan schuim oplossen. Tussen het mengen en het nemen van een te onderzoeken hoeveelheid mogen niet meer dan drie minuten verstrijken.

5.2. Breng met het pipetteerapparaat ca. 1 ml monster in een steriele proefbuis.

5.3. Breng met het öse-apparaat ca. 1 µl melk over in een steriele proefbuis met verdunningsvloeistof. De proefbuizen met verdunningsvloeistof zullen vooraf op ca. 40 °C gebracht worden.

5.4. Gedurende de onderdompeling van de öse in het monster zal de öse rond haar as draaien om een goede menging van het monster te verkrijgen.

5.5. Voeg met de dispenser 3 ml voedingsbodem van 47 °C toe aan iedere proefbuis. De temperatuur van het mengsel verdunningsvloeistof en voedingsbodem zal ongeveer 45 °C bedragen.

5.6. Plaats op iedere proefbuis een steriele siliconestop.

5.7. Plaats de proefbuizen horizontaal in het rotatie-apparaat en laat de voedingsbodem vast worden aan de wand van de proefbuis. De dikte van de laag zal ongeveer 1,5 mm bedragen. Om een vlugger resultaat te bereiken worden de proefbuizen gekoeld met leidingwater.

5.8. Incubeer bij 30 °C gedurende 72 ± 2h.

5.9. Lees het aantal koloniën visueel of elektronisch af.

## 6. Berekening en uitdrukking van het resultaat

Bereken het kiemgetal per ml door het aantal kolonies te vermenigvuldigen met 1000.

Opmerking : verricht voldoende blankobepalingen ter controle van de steriliteit van de voedingsbodem, de verdunningsvloeistof, de Petri-platen, enz...

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

### Bijlage 4 : Bepaling van micro-organismen Telling van het aantal aërobe koloniën bij 30 °C : Petrifilm-methode

#### 1. Definitie

Onder micro-organismen wordt verstaan : organismen die telbare koloniën vormen bij een aërobe incubatie onder de beschreven voorwaarden.

#### 2. Principe

Petrifilms zijn opgebouwd uit twee kunststoflagen : de onderste laag dient als drager voor de voedingsbodem, de bovenste laag bevat tetrazoliumchloride als indicator. Het monster (of de verdunning) wordt op de voedingsbodem gebracht. Na incubatie bij de aangewezen temperatuur worden de gevormde koloniën geteld.

#### 3. Apparatuur en glaswerk

##### 3.1. Apparatuur

- Petrifilm SM + bijhorend kunststofplaatje.
- Hete luchtoven, werkzaam bij 170-175 °C
- Autoclaaf, werkzaam bij 121 ± 1 °C
- Broedstoof, op elk punt werkzaam bij 30 °C
- Menger volgens het principe van de excentrische rotatie
- pH-meter, met temperatuurcompensatie, nauwkeurig tot 0,1 pH-eenheid.

##### 3.2. Glaswerk

— Proefbuizen met geschikte stoppen en een voldoende mengcapaciteit voor 10 ml van de eerste verdunning of verdere decimale verdunningen.

Pipetten uit gals of steriel synthetisch materiaal met ongeschonden tip en een nominale capaciteit van 1 ml. De diameter van de uitlaat moet 1,75 tot 3 mm bedragen.

— Sterilisatie van het glaswerk.

Steriliseer het glaswerk ofwel gedurende ten minste 20 min. bij 121 ± 1 °C in de autoclaaf of gedurende ten minste 1h in de warme-luchtoven waarvan de temperatuur ingesteld werd tussen 170 en 175 °C.

(\*) Plate Count Agar en afgeroomd melkpoeder zijn als samengestelde voedingsbodem verkrijgbaar onder de naam « Plate Count Skim Milk Agar ».

**4. Verdunningsvloeistoffen**

Alle ingrediënten zullen van « pro analyse » kwaliteit zijn.

**4.1. Pepton-zoutoplossing**

Pepton : 1,0 g

Natriumchloride (NaCl) : 8,5 g

Water (gedestilleerd in glazen toestel) : 1000 ml

Los de bestanddelen op in water, verwarm indien nodig. Controleer de pH met een pH-meter en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen. Om de pH aan te passen kan een oplossing van HCl (0,1 molair) of NaOH (0,1 molair) gebruikt worden.

**4.2. Ringeroplossing — 1/4 sterkte**

Natriumchloride (NaCl) : 2,25 g

Kaliumchloride (KCl) : 0,105 g

Calciumchloride (CaCl<sub>2</sub>) : 0,06 g

Natriumbicarbonaat (NaHCO<sub>3</sub>) : 0,05 g

Water : 1000 ml

Los de zouten op in water.

Controleer de pH met een pH-meter en pas, indien nodig, aan zodat na sterilisatie, een pH = 7,0 bij 25 °C wordt bekomen. Om de pH aan te passen kan een oplossing van HCl (0,1 molair) of NaOH (0,1 molair) gebruikt worden.

**4.3. Verdeling, sterilisatie en bewaring van de verdunningsvloeistoffen**

Verdeel de verdunningsvloeistof in proefbuizen zodat elke buis na sterilisatie 3,0 ml bevat.

Steriliseer in een autoclaaf bij 121 °C gedurende 15 minuten.

Controleer de pH van de verdunningsvloeistof. Indien de verdunningsvloeistof niet onmiddellijk gebruikt wordt, dan kan ze bewaard worden bij 0 tot 5 °C in het donker. Na bereiding mag de bewaarduur maximaal 1 maand bedragen.

Opmerking : De verdunningsvloeistoffen kunnen ook bereid worden uitgaande van tabletten verkrijgbaar in de handel.

**5. Werkwijze****5.1. Bereiding van het analysemonster en van de verdunningen**

5.1.1. Homogeniseer het melkmonster door het recipiënt met het monster 25 maal om te keren. Vermijd schuimvorming of laat schuim dispergeren. De tijdsperiode tussen het mengen en het nemen van de proefportie mag niet meer dan 3 min. bedragen.

5.1.2. Breng met behulp van een steriele pipet, 1 ml of 10 ml melkmonster over in 9 ml resp. 90 ml steriele verdunningsvloeistof.

5.1.3. Meng door 25 maal te schudden in 10s met een beweging met een amplitude van ongeveer 30 cm. Aldus bekomt men de verdunning 10<sup>-1</sup>.

5.1.4. Breng 1 ml of 10 ml van de verdunning 10<sup>-1</sup> in 9 ml resp. 90 ml van de gepaste steriele verdunningsvloeistof. Meng zorgvuldig met het mengapparaat of in geval van de grotere hoeveelheid door manuele menging volgens 5.1.3.

Aldus bekomt men de verdunning 10<sup>-2</sup>.

5.1.5. Breng 1 ml of 10 ml van de verdunning 10<sup>-2</sup> in 9 ml resp. 90 ml van de gepaste steriele verdunningsvloeistof. Meng zorgvuldig met het mengapparaat of in geval van de grotere hoeveelheid door manuele menging volgens 5.1.3. Aldus bekomt men de verdunning 10<sup>-3</sup>.

5.1.6. Indien nodig kunnen op dezelfde wijze nog verdere verdunningen gemaakt worden.

**5.2. Enten van de Petrifilms**

Plaats de Petrifilm op een effen oppervlak.

Neem de bovenlaag weg en inoculeer 1 ml monster (of verdunning) in het midden van de onderlaag.

Breng voorzichtig de bovenlaag terug op de voedingsbodem.

Plaats het kunststofplaatje op de film en verdeel het monster egaal over de film door een lichte druk toe te passen op het midden van het plaatje. Laat het plaatje ongeveer 1 minuut op de Petrifilm om de gel te laten vast worden.

**5.3. Incubatie van de Petrifilms**

Incubeer de films horizontaal met de heldere zijde bovenaan gedurende 72 ± 3h bij 30 ± 1 °C. Plaats niet meer dan 20 films op elkaar.

**5.4. Telling van de koloniën**

Tel de rode koloniën op de Petrifilms.

**6. Berekening en uitdrukking van het resultaat**

6.1. Houd slechts rekening met de platen die 10 tot 300 koloniën bevatten.

6.2. Bereken het aantal micro-organismen N per milliliter melk, met behulp van de vergelijking

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

waarin

$\sum c$  de som is van de koloniën geteld op alle platen in 6.1;

$n_1$  het aantal onderzochte platen is van de eerste verdunning;

$n_2$  het aantal onderzochte platen is van de tweede verdunning;

$d$  de verdunning is waarop de eerste tellingen bekomen werden.

6.3. Rond de in 6.2 berekende resultaten af op twee significante cijfers.

Druk het resultaat uit in een getal begrepen tussen 1,0 en 9,9 vermenigvuldigd met 10<sup>n</sup>, waarbij n de gepaste macht van 10 is.

6.4. Indien de geënte platen minder dan 10 kolonies bevatten, geef dan het aantal micro-organismen per milliliter weer als « minder dan  $10 \times d$  », waarbij  $d$  de reciproke is van de laagste verdunning.

6.5. Indien de platen die geënt werden met de grootste verdunning meer dan 300 koloniën bevatten, bereken dan het geschatte aantal micro-organismen uit de platen met een aantal kolonies die het dichtst de 300 benadert. Vermenigvuldig met de reciproke van de beschouwde verdunning. Druk het resultaat uit als « het geschatte aantal micro-organismen per milliliter ».

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

Bijlage 5 : Bepaling van micro-organismen  
Telling van het aantal aërobe bacteriën : epifluorescentiemicroscopie

1. Definitie

Bij deze methode wordt het aantal micro-organismen bepaald door het detecteren van fluorescerende pulsen afkomstig van fluorescerende bacteriën (Bactoscan) of door het rechtstreeks tellen van fluorescerende bacteriën (Cobra). Wat de Bactoscan betreft worden deze resultaten herleid tot kolonievormende eenheden per ml; de Cobra geeft de meting direct weer in kolonievormende eenheden per ml.

2. Principe

Kleuring van bacteriën met acridine-oranje en telling van de fluorescerende bacteriën met behulp van een epifluorescentiemicroscoop.

3. De Bactoscan

3.1. Toestel-werkwijze

In de Bactoscan (Foss-Electric, Hillerød, Denemarken) wordt het melkmonster behandeld met een lyseer-oplossing om de caseinemicellen en de somatische cellen af te breken. Via centrifugatie en filtratie worden de bacteriën gescheiden van de overige melkcomponenten. De resterende eiwitten worden enzymatisch verwijderd. De bacteriën worden gekleurd met acridine-oranje. Een vastgesteld volume van het mengsel wordt overgebracht als een dunne film op een draaiende schijf die dienst doet als objectief vlak voor de epifluorescentiemicroscoop. De fluorescerend gekleurde bacteriën worden gedetecteerd als lichtpulsen (Bactoscanpulsen). Het aantal lichtpulsen wordt weergegeven in duizendtallen per ml en wordt via calibratiecurven getransformeerd in kolonievormende eenheden per ml.

3.2. Uitvoering analyse

3.2.1. De reagentia

De reagentia nodig om de stock- en gebruiksoptellingen aan te maken zijn verkrijgbaar bij de fabrikant van het toestel. Het aannemen gebeurt overeenkomstig de voorschriften van de fabrikant.

3.2.2. Voorbehandeling van het monster

Het monster wordt in een waterbad verwarmd tot  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Het monster wordt onmiddellijk daarop gemengd door het minimaal 10 maal om te keren ( $180 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Schuimvorming wordt hierbij vermeden.

3.2.3. Opstarten van het toestel

Het toestel wordt vóór gebruik afgesteld met behulp van een BZ-standaard verkrijgbaar bij de fabrikant van het toestel. Het verband tussen het aantal te tellen bacteriën en de drempel waarboven de telling wordt uitgevoerd, wordt op deze manier bepaald. De afstelling wordt volgens de aanwijzingen van de fabrikant uitgevoerd. Daarna worden vier blanco's (gedistilleerd of gedioniseerd water — gefiltreerd) gemeten. Elk resultaat moet lager liggen dan 20 en het gemiddelde ervan lager dan 10 lichtpulsen (Bactoscanpulsen).

3.2.4. Telling van het aantal bacteriën

De telling wordt binnen de 15 minuten na het uitvoeren van de voorbehandeling van het monster uitgevoerd overeenkomstig de instructies van de fabrikant.

Verdere verdunning en behandeling van het monster vindt automatisch in het apparaat plaats.

Minimaal om de 50 monsters wordt een blanco gemeten. Het resultaat ervan moet lager liggen dan 20 Bactoscanpulsen.

3.2.5. Resultaat

Het aantal pulsen waargenomen door het apparaat wordt omgerekend naar een aantal koloniën, bepaald op basis van vergelijking met de referentiemethode.

3.3. De verdere voorschriften voor de uitvoering van de bepaling dienen beschreven te worden in de protocollen opgesteld door de interprofessionele organismen.

4. De cobra

4.1. Toestel

De « Cobra » (Biocom, Les Ulis-France) is een modulair apparaat voor de telling van de aërobe bacteriën in melk. Het is samengesteld uit drie modules :

— de module voor de monsterverdeling en de voorbereiding van de monsters.

Deze module is samengesteld uit een automatisch monsternameapparaat met siringe. Het apparaat maakt gebruik van een uitwisselbare polypropyleenblok voorzien van 24 filtratieopeningen (4 rijen van 6 openingen). Het aanbrengen van de monsters in de filtratieopeningen gebeurt sequentieel.

— De module voor de filtratie en de kleuring.

Deze module bestaat uit een geprogrammeerde automaat die diverse pompen omvat. Een lade ondersteunt de analysefilter gemonteerd in een vast kader en de polypropyleenblok met openingen die de voorbereide monsters bevat.

— De module voor de analyse van de monsters en de verwerking van de resultaten.

Deze module bestaat uit een epifluorescentiemicroscoop verbonden met een camera en een videoscherm, een gemotoriseerde draagtafel en een beeldanalysetoestel. De draagtafel is verbonden met een vacuumpomp, hiermee wordt de filter vlak gehouden om een goede aflezing mogelijk te maken.

**4.2. Werkwijze**

De monsterverdelingsautomaat brengt de te analyseren koude, goed gemengde, rauwe melk en een mengsel van triton en trypsine in de voorafgaandelijk opgewarmde polypropyleenblokken (50 °C) met gesteriliseerd water. Het geheel reageert gedurende 10 minuten om de somatische cellen en de caseïnemicellen te vernietigen en de melk beter filtreerbaar te maken.

De blok wordt overgebracht naar de filtratieëenheid waar de 24 monsters tergelijktijd behandeld worden.

Het mengsel van melk, water en lyseeroplossing wordt onder druk gefiltreerd doorheen een membraan van polycarbonaat. De filter wordt gespoeld door middel van een citraatbuffer (pH = 3). De bacteriën weerhouden op het membraan worden gedurende drie minuten gekleurd met een oplossing van acridine-oranje (0,025 %). De filter wordt gereinigd met een citraatbuffer (pH = 3) en gedroogd gedurende 1 minuut met behulp van perslucht. De filter wordt overgebracht naar de draagtafel van de epifluorescentiemicroscop. De analyse gebeurt automatisch door een beeldanalysestelsel.

**4.3. Uitvoering analyse****4.3.1. De reagentia**

De reagentia en de gebruiksuplossingen moeten overeenstemmen met de voorschriften van de fabrikant van het toestel.

**4.3.2. Opstarten en afstellen van het toestel**

Het toestel wordt afgesteld volgens de instructies van de fabrikant. De goede werking van het apparaat wordt gecontroleerd d.m.v. 4 blanco monsters (gedistilleerd of gedeïoniseerd watergefiltreerd). De 4 resultaten moeten lager zijn dan 10 fluorescerende bacteriën.

**4.3.3. Resultaat**

De metingen worden direct weergegeven in kolonievormende eenheden per ml.

4.4. De verdere voorschriften voor de uitvoering van de bepaling dienen beschreven te worden in de protocollen opgesteld door de interprofessionele organismen.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,

A. BOURGEOIS

**Bijlage 6 : Bepaling van het gehalte somatische cellen - Microscopische methode****1. Onderwerp en toepassingsgebied**

Deze procedure beschrijft de methode voor de bepaling van het aantal cellen in een melkmonster met het oog op de ijking en de controle van de nauwkeurigheid van de fluorescentiemethode (bijlage 7).

**2. Definitie**

Bij deze methode worden bedoeld met somatische cellen die cellen, bij voorbeeld leucocyten en epitheelcellen, waarvan de kernen met methyleenblauw duidelijk kunnen worden gekleurd.

**3. Principe**

0,01 ml melk wordt verdeeld over 1 cm<sup>2</sup> van een objectglaasje. De film wordt gedroogd en gekleurd. De telling gebeurt met behulp van een microscoop. Het aantal somatische cellen wordt geteld over een bepaald oppervlak en vermenigvuldigd met een omrekeningsfactor om het aantal cellen/ml te bepalen.

**4. Reagentia**

De chemicaliën moeten van analysekwaliteit zijn.

**Kleurstofoplossing****Samenstelling**

Methyleenblauw : 0,6 g

Ethanol — 99 % : 54 ml

1,1,1-trichloorethaan of tetrachloorethaan : 40 ml

IJsazijn : 6 ml

**Waarschuwing**

Tetrachloorethaan is giftig. Bij gebruik daarvan moeten bereiding en toepassing worden uitgevoerd in een zuurkast.

**Bereiding**

Meng de ethanol en 1,1,1-trichloorethaan of tetrachloorethaan in een fles en verhit in een waterbad tot 60-70 °C. Voeg het methyleenblauw toe, meng zorgvuldig, koel 12 tot 24 uur in een koelkast tot 4 °C en voeg de ijsazijn toe. Filtreer door een filter met een porieafmeting van 10 tot 12 micron of minder en bewaar de kleuroplossing in een luchtdichte fles. Filtreer voor gebruik opnieuw, als zich deeltjes hebben gevormd of er neerslag is ontstaan.

**5. Apparatuur en glaswerk**

- Microscoop, met een vergroting van 500 tot 1.000 x.
- Micro-injectiespuit, van 0,01 ml met een nauwkeurigheid van ten minste ± 2 %.
- Objectglaasje, met een gemerkt oppervlak van 20 mm x 5 mm voor de vloeistoffilm, of een standaard-glaasje met een mal van 20 mm x 5 mm voor de film.
- Verwarmingsplaat, waterpas opgesteld (30 tot 50 °C), voor het drogen van de objectglaasjes.
- Ventilator (haardroger), voor het drogen van de vloeistofflaag.
- Waterbad, instelbaar bij 30 tot 40 °C om het melkmonster te verwarmen.
- Objectglaasje met micrometer, met een verdeling op 0,01 mm.

**6. Werkwijze****6.1. Melkmonster.**

Het melkmonster moet binnen zes uur na monsterneming worden onderzocht. De temperatuur bij bewaren mag niet boven 6 °C uitkomen. Bevriezing moet worden vermeden.

### 6.2. Voorbehandeling van het monster in het laboratorium.

Verwarm het monster in een waterbad tot 30-40 °C. Meng dan zorgvuldig. Koel af tot de ijktemperatuur van de micro-injectiespuit, bij voorbeeld 20 °C.

### 6.3. Voorbehandeling van de objectglasjes.

Maak de glasjes schoon, bij voorbeeld met ethanol, droog hen met stofvrij papier af, houd hen even in een vlam en koel hen af. Bewaar de plaatjes in een doos om contaminatie met stof te vermijden.

### 6.4. Vervaardiging van de film.

Neem met een micro-injectiespuit 0,01 ml melk uit het op bovenstaande wijze voorbehandelde monster. Maak de buitenkant van de spuit, die in contact is geweest met melk, zorgvuldig schoon. Breng met de spuit het monster op het glaasje, het eerst langs de omtrek van de figuur (20 mm x 5 mm). Vul daarna het oppervlak zo gelijkmatig mogelijk op. Droog de film op een waterpas opgestelde verwarmingsplaat todat hij volkomen droog is.

Soms wordt een betere adhesie bekomen door de melk gedurende verschillende uren bij kamertemperatuur te drogen.

Van elk melkmonster moeten ten minste twee films vervaardigd en onderzocht worden.

### 6.5. Kleuring van de films.

Dompel de glasjes met de film tien minuten lang in de kleurstofoplossing (punt 4). Droog hen, zo nodig met behulp van de ventilator. Dompel de films in kraanwater tot alle overmaat aan kleurstof weggespoeld is. Droog dan opnieuw en bewaar hen stofvrij.

### 6.6. Ijking van het microscopveld.

Bepaal afhankelijk van de gekozen vergroting (500 tot 1.000 x) de doorsnede van het microscopveld met behulp van het objectglaasje met micrometer.

## 7. Telling en berekening

### 7.1. Telling van de cellen.

Gebruik een microscoop. In plaats van cellen worden alleen celkernen geteld. Deze zijn goed te herkennen en voor de telling moet minstens de helft van de celkern in het gezichtsveld van de microscoop zichtbaar zijn. Tel banen of vlakken in het middelste derde deel van de film en vermijd bij het tellen banen of vlakken langs de randen van de film. Ter controle op de zorgvuldigheid van de vervaardiging van de films, en dus van de betrouwbaarheid van de resultaten, moet minstens eenmaal per maand een telling worden uitgevoerd van verschillende delen van de film. De telling mag ook gebeuren door telling via een zodanige systematiek dat alle delen van de film gelijk vertegenwoordigd zijn.

### 7.2. Minimumaantal te tellen cellen.

Daar de telling van somatische cellen met de microscoop ook gebruikt kan worden voor standaardisering van automatische en mechanische telprocedures, mag de variatiecoëfficiënt van tellingen van identieke monsters niet hoger zijn dan die van elektronische instrumenten. De variatiecoëfficiënt voor een monster melk met 400.000 tot 600.000 cellen/ml mag niet groter zijn dan 5 %.

Het aantal somatische cellen dat in elk monster moet worden geteld, dient, in overeenstemming met de karakteristieken van de Poisson-verdeling, ten minste 400 te zijn om deze herhaalbaarheid te bereiken.

Bij de Poisson-verdeling wordt verondersteld dat :

$$M = V = s^2$$

waarin

M = de gemiddelde waarde,

V = de variantie,

s = de standaarddeviatie.

De variatiecoëfficiënt is

$$CV = \frac{s \times 100 \%}{M} \text{ of } CV = \frac{100 \%}{s} \text{ of } CV = \frac{100 \%}{\sqrt{M}}$$

waarin M (gemiddelde) het aantal deeltjes (cellen) aangeeft dat is geteld (d.w.z. 400 als CV = 5 %).

### 7.3. Berekening van de omrekeningsfactor.

Bij het gebruik van 0,01 ml melk wordt de omrekeningsfactor volgens punt 7.3.1. of punt 7.3.2. berekend.

#### 7.3.1. Het tellen van banen over de film.

De lengte van de te tellen banen is 5 mm. De breedte van een baan komt overeen met de diameter van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling.

$$\text{Omrekeningsfactor} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

waarin

d = de diameter in mm van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling.

b = het aantal volledig getelde banen.

#### 7.3.2. Het tellen van vlakken in het middelste derde deel van de film of met een raster.

$$\text{Omrekeningsfactor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12.732}{d^2 \times s}$$

waarin

d = de diameter in mm van het gezichtsveld in de microscoop, bepaald met de micrometerverdeling.

s = het aantal getelde vlakken.

### 7.4. Berekening van het celgetal

Het aantal getelde somatische cellen (punten 7.1 en 7.2) wordt vermenigvuldigd met de omrekeningsfactor (punt 7.3) en dat geeft het aantal cellen per ml melk.

### 7.5. Precisie

De variatiecoëfficiënt (punt 7.2) mag niet meer bedragen dan 5 %.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

## Bijlage 7 : Bepaling van het gehalte aan somatische cellen — Fluoro-opto-elektronische methode

## 1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze procedure beschrijft de referentiemethode die na de juiste ijking (bijlage 6) kan worden gebruikt om somatische cellen in rauwe melk te tellen — met of zonder chemische conservering.

## 2. Definitie

Voor deze methode worden met de term « somatische cellen » bedoeld deeltjes met een minieme fluorescentie-intensiteit als gevolg van kleuring van het DNA in de kern van somatische cellen.

## 3. Beginsel

Een deel van het monster (bij voorbeeld 0,2 ml) wordt grondig gemengd met buffer- en kleurstofoplossing. Een deel van het mengsel wordt overgebracht als een dunne film op een draaiende schijf die dient als een objectvlak voor de microscoop.

Elke cel levert een elektrisch signaal dat versterkt en geregistreerd wordt. Het aantal somatische cellen wordt weergegeven in duizendtallen per ml.

## 4. Reagentia

Tenzij anders vermeld, moeten chemicaliën van analysekwaliteit worden gebruikt. Water moet ofwel gedistilleerd of gedeïoniseerd ofwel van gelijkaardige zuiverheid zijn.

## 4.1. Bufferoplossing

## Samenstelling

Kaliumwaterstoffalaat : 51,0 g

Kaliumhydroxide : 13,75 g

Polyethyleenglycol-mono-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether (bij voorbeeld Triton X-100), 1 volume % : 10 ml

pH 5,7-5,9. Aanvullen tot 10.000 ml met water.

## Bereiding

De afzonderlijke bestanddelen worden gemengd. Niet langer dan zeven dagen luchtdicht bewaren.

## 4.2. Kleurstofoplossing (voorraadoplossing)

## Samenstelling

Ethidiumbromide : 1,0 g

Aanvullen met water tot 1.000 ml.

## Bereiding

Ethidiumbromide wordt in water opgelost. Niet langer dan twee maanden bewaren in een luchtdichte donkere fles.

Wegens de sterk carcinogene eigenschap van ethidiumbromide moet elk rechtstreeks contact met het produkt vermeden worden.

## 4.3. Kleurstofoplossing (gebruikoplossing)

20 ml voorraadoplossing (punt 4.2) wordt gemengd met bufferoplossing (punt 4.1) tot 1.000 ml.

Deze mag niet langer dan zeven dagen worden gebruikt.

## 4.4. Reinigingsoplossing

## Samenstelling

Bufferoplossing (punt 4.1) : 10 ml

Polyethyleenglycol-mono-p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenylether (bij voorbeeld Triton X-100), 1 volume % : 10 ml

Ammonia, 25 volume % : 25 ml

Aanvullen met water tot 10.000 ml.

## Bereiding

De afzonderlijke bestanddelen worden gemengd. Niet langer dan 30 dagen bewaren.

## 5. Apparatuur en glaswerk

## 5.1. Telapparaat, werkend volgens het fluorescentie-optische principe

## Opmerking

Het apparaat moet vóór gebruik worden geïjkt. Het verband tussen het aantal te tellen deeltjes en de drempel waarboven de telling wordt uitgevoerd, wordt op deze manier bepaald. De ijking van het apparaat wordt volgens de aanwijzingen van de fabrikant uitgevoerd met monsters waarvan het celgetal werd bepaald met de microscopische methode (bijlage 6).

5.2. Waterbad, met circulatie, instelbaar op  $40 \pm 1$  °C

5.3. Reageerbuis, met geschikte sluiting, ongeveer 15 ml

## 6. Melkmonster

6.1. Het monster moet bij lage temperatuur in een reageerbuis (punt 5.3) worden bewaard. Het monster mag, als het niet chemisch geconserveerd is, niet binnen de eerste 24 uur na het melken worden geteld, omdat het resultaat dan te laag uitvalt. De temperatuur bij bewaren mag niet hoger zijn dan 6 °C.

## 6.2. Conservering

Chemische conservering moet binnen 24 uur worden uitgevoerd. Conservering moet zo spoedig mogelijk na bemonstering worden uitgevoerd.

6.2.1. Chemische conservering van het monster kan gebeuren door toevoeging van één van de volgende conserveringsmiddelen :

— Orthofoorzuur

De uiteindelijke concentratie orthofoorzuur in het monster mag niet hoger zijn dan 0,6 g/100 ml. Een aldus geconserveerd monster kan nog eens 24 uur bij 6 tot 12 °C worden bewaard.

— Kaliumdichromaet

De uiteindelijke concentratie kaliumdichromaet mag niet hoger zijn dan 0,2 g/100 ml. Aldus geconserveerde monsters kunnen nog eens 72 uur worden bewaard bij 6 tot 12 °C.

— Natriumazide

Het monster kan met natriumazide in een uiteindelijke concentratie van 0,024 g/100 ml worden geconserveerd, mits het monster onmiddellijk na bemonstering tot 6 à 12 °C wordt gekoeld en binnen 48 uur na bemonstering wordt geteld.

— Bronopol

Het monster kan geconserveerd worden met bronopol in een uiteindelijke concentratie van 0,05 g/100 ml, mits het monster onmiddellijk na bemonstering tot 6 à 12 °C wordt gekoeld en binnen 72 uur na bemonstering wordt geteld.

6.2.2. Een monster dat al met orthofoorzuur is geconserveerd, kan voor nog eens 48 uur worden geconserveerd met kaliumdichromaet.

Opmerking

Bij monsters die met kaliumdichromaet zijn geconserveerd, moet rekening worden gehouden met plaatselijke lozingsvoorwaarden.

## 7. Werkwijze

### 7.1. Voorbehandeling van het monster

De te onderzoeken melk moet na het melken ten minste 24 uur bij ongeveer 2 tot 6 °C worden bewaard. Het zonder voorbehandeling tellen van monsters op de dag van het melken wordt afgeraden omdat de resultaten te laag kunnen uitvallen. Als telling van een dergelijk monster nodig is, moet het ten minste gedurende drie uur worden voorbehandeld met kaliumdichromaet (punt 6.2.1.).

### 7.2. Voorbereiding

Het voorbehandelde monster (punt 7.1.) of het onbehandelde monster van ten minste één dag oud, wordt in een waterbad verwarmd tot ongeveer 40 °C. Het monster wordt dan bewaard bij kamertemperatuur totdat de tellingen worden uitgevoerd.

### 7.3. Het tellen van de cellen

De telling moet binnen 15 minuten na het verwarmen (punt 7.2) worden uitgevoerd met het telapparaat (punt 5.1). Het monster moet direct vóór het tellen grondig worden gemengd om een zo gelijkmatig mogelijke verdeling van de somatische cellen te krijgen.

Verdere verdunning en behandeling van het monster vinden in het instrument automatisch plaats.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

## Bijlage 8 : Opsporen van remstoffen en sulfonamiden in melk

### Inleiding

Deze bijlage beschrijft een methode om antibiotica en sulfonamiden op te sporen in rauwe melk.

Op de te onderzoeken monsters wordt een screeningsmethode uitgevoerd. Alle monsters die na de voorgeschreven incubatie bij de screeningsproef aanleiding geven tot een positief of twijfelachtig resultaat, worden onderworpen aan een bevestigingsproef. Deze bevestigingsproef wordt uitgevoerd op het origineel melkmonster na verwarming van het melkstaal bij 80 °C gedurende 10 minuten. Monsters die bij de bevestiging opnieuw een groeiremming vertonen, worden verder onderzocht op de aanwezigheid van sulfonamiden door uitvoering van de test in aanwezigheid van para-aminobenzoëzuur. Monsters die geen sulfonamiden bevatten worden verder onderzocht op de aanwezigheid van penicillinen of andere groeiremmende stoffen.

### A. Screening

#### A.1. Referentiemethode : agardiffusietest.

##### A.1.1. Principe.

Een melkmonster laat men diffunderen door een agarbodem, bestaande uit voedingsstoffen, een pH-indicator en trimethoprim, geënt met sporen van het testorganisme *Bacillus stearothermophilus*, var. *calidolactis* ATCC 10149 of C 953. Na incubatie zal bij normale groei en zuurproductie van het testorganisme de pH-indicator veranderen van purper naar geel. Bij aanwezigheid van remstoffen blijft de kleur van de pH-indicator langer purper dan in de buizen of cups met controlemerk die vrij is van bacteriegroeiremmende stoffen.

Zowel korte proefbuizen als microtiterplaten kunnen gebruikt worden.

##### A.1.2. Media, standaardoplossingen, testorganisme.

Opmerking : — de ingrediënten moeten geschikt zijn voor bacteriologische doeleinden

— het water moet gedestilleerd of gedemineraliseerd zijn of van equivalente zuiverheid en mag geen bacteriegroeiremmende stoffen bevatten.

##### A.1.2.1. Basisagarmedium (\*)

- Samenstelling : Gistextract : 2,5 g
- Trypton : 5,0 g
- Glucose : 1,0 g
- Agar : 15 g
- Gedestilleerd water : 1000 ml

(\*) : Handelsnaam : Plate Count Agar.

## — Bereiding :

Los de bestanddelen op in het water onder verwarming.

Steriliseer bij  $121 \pm 1$  °C gedurende 15 minuten.

pH bij 25 °C na sterilisatie :  $7,0 \pm 0,1$ .

## A.1.2.2. Trimethoprimoplossing.

Trimethoprim : 5 mg

Ethanol 96 % : 10 ml

Gedistilleerd water : tot 1000 ml

Los de trimethoprim op in de ethanol en vul aan met water. De oplossing is maximaal 1 week houdbaar, bewaard in het donker bij 0-5 °C.

## A.1.2.3. Broomcresolpurperoplossing

Broomcresolpurper : 250 mg

Ethanol 96 % : 10 ml

Gedistilleerd water : tot 100 ml

Los de broomcresolpurper op in de ethanol en vul aan met water. De oplossing is maximaal 6 maanden houdbaar, bewaard in het donker bij 0-5 °C.

## A.1.2.4. Medium (\*\*) voor het kweken van het testorganisme.

— Samenstelling : Gistextract : 2,0 g

Vleesextract : 1,0 g

Pepton : 5,0 g

Natriumchloride : 5,0 g

Agar : 15,0 g

Gedistilleerd water : 1000 ml

## — Bereiding

Los de bestanddelen op in het water onder verwarming. Verdeel in flessen of in hoeveelheden van 7 ml in proefbuizen.

Steriliseer bij  $121 \pm 1$  °C gedurende 15 minuten.

pH bij 25 °C na sterilisatie :  $7,4 \pm 0,1$ .

Laat het medium in de proefbuizen in schuine stand opstollen om aldus agar slants te bekomen.

## A.1.2.5. Sporulatiemedium.

— Samenstelling : Vleesextract : 3,0 g

Pepton : 5,0 g

Mangaansulfaat ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) : 31,3 mg

Agar : 15,0 g

gedistilleerd water : 1000 ml

## — Bereiding

Los de bestanddelen op in het water onder verwarming en verdeel in flessen.

Steriliseer bij  $121 \pm 1$  °C gedurende 15 minuten

pH bij 25 °C na sterilisatie :  $7,4 \pm 0,1$ .

Voor gebruik, het medium na opsmelten verdelen in grote petriplaten (A.1.5.2.3.) en laten stollen.

## A.1.2.6. Ringeroplossing (1/4 sterkte).

— Samenstelling : Natriumchloride : 2,25 g

Kaliumchloride : 0,105 g

Calciumchloride  $6 H_2O$  : 0,12 g

Natriumbicarbonaat : 0,05 g

Gedistilleerd water : 1000 ml.

— Bereiding : Na oplossen, steriliseer bij  $121 \pm 1$  °C gedurende 15 minuten. pH =  $7,0 \pm 0,1$

## A.1.2.7. Remstofvrije melk.

Steriele volle UHT-melk, vrij van bacteriegroeiremmende stoffen.

## A.1.2.8. Standaard penicilline-oplossing.

Standaard van 0,004 µg/ml (= 0,0067 I.E./ml) penicilline, gemaakt met remstofvrije melk (A.1.2.7.). Deze standaard is min. 3 maanden houdbaar, indien bewaard bij  $-18 \pm 2$  °C.

## A.1.2.9. Standaard sulfadimidine (= sulfamethazine) oplossing.

Standaard van 0,750 µg/ml sulfadimidine, gemaakt met remstofvrije melk (A.1.2.7.).

Deze standaard is min. 3 maanden houdbaar, indien bewaard bij  $-18 \pm 2$  °C.

## A.1.2.10. Testorganisme.

*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, stam ATCC 10149 of C953.

## A.1.3. Voorbereiding van de test.

## A.1.3.1. Stockcultuur.

Het testorganisme (A.1.2.10) wordt bewaard op een schuin gestolde agarbodem (A.1.2.4). Ent hiervoor een buis met schuin gestolde agarbodem door met behulp van een oognaald het testorganisme op het agaroppervlak uit te strijken. Bebroed gedurende 48 uur bij  $55 \pm 1$  °C. Flambeer na bebroeding de watten stop van de buis en druk ze zachtjes in de buis. Sluit ze vervolgens met een steriele rubberen stop. De aldus bekomen cultuur kan gedurende verschillende maanden bij 5 °C bewaard worden.

(\*\*): Handelsnaam : Nutriënt Agar.



**A.1.3.2. Entmateriaal.**

Breng op aseptische wijze opgesmolten medium voor het kweken van het testorganisme (A.1.2.4.) in steriele petriplaten (A.1.5.2.2.). Laat het medium opstollen. Ent de stockcultuur (A.1.3.1.) op het medium. Bebroed gedurende 24 h bij  $63 \pm 1$  °C.

**A.1.3.3. Sporensuspensie.**

A.1.3.3.1. Neem de gegroeide cultuur (A.1.3.2.) per petriplaat op in 2 ml steriele Ringeroplossing (A.1.2.6.) door het bacteriemateriaal goed met de Ringer te mengen met een steriele swab of een steriele glasspatel. Breng 1 ml van deze bacterieoplossing met een steriele pipet over naar een grote petriplaat met sporulatiemedium (A.1.2.5.). Spreid het inoculum over de gehele oppervlakte van de plaat met een steriele Drigalsky-spatel of een steriele swab. Ent op deze wijze een voldoende aantal petriplaten. Verpak de geënte petriplaten in een plasticzak, en bebroed ze gedurende 3 dagen bij  $63 \pm 1$  °C.

A.1.3.3.2. Breng na bebroeden 5 ml steriele Ringeroplossing (A.1.2.6.) op iedere plaat en was de sporen van de agar af met een steriele glasspatel of steriele swab. Breng de sporensuspensie in een steriel glazen flesje, sluit het flesje en schud grondig. De aldus bekomen sporensuspensie moet een uniforme turbiditeit hebben. Wanneer vlokken of sediment aanwezig zijn, dient ze vervangen te worden door een nieuwe cultuur, vertrekkende van de stockcultuur (A.1.3.1.). Controleer desgewenst de sporensuspensie met behulp van een microscoop op reinheid en sporulatie.

A.1.3.3.3. Bepaal het aantal sporen in de sporenoplossing door uitplating op het basisagarmedium (A.1.2.1.) na incubatie bij  $63 \pm 1$  °C gedurende 18 h.

A.1.3.3.4. Verdun de suspensie met steriele Ringeroplossing (A.1.2.6.) tot een concentratie van ca.  $10^7$  sporen per ml.

A.1.3.3.5. Deze aldus verkregen sporenoplossing is 1 jaar houdbaar, indien bewaard bij  $-18 \pm 2$  °C.

**A.1.4. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten.**

A.1.4.1. Smelt maximaal 24 h voor gebruik het basisagarmedium (A.1.2.1.) op. Koel af tot 63 °C. Voeg per 100 ml op aseptische wijze 2 ml broomcresolpurper (A.1.2.3.) en 2 ml trimethoprimoplossing (A.1.2.2.) toe.

Stel de pH met 1 M NaOH zo nauwkeurig mogelijk in op  $8,00 \pm 0,02$ , gemeten bij 63 °C met een pH-meter met temperatuurscorrectie.

Voeg van de sporenoplossing (A.1.3.3.5.) een zodanige hoeveelheid (testbuizen  $\pm 450$  µl, microtiterplaten  $\pm 1$  ml) toe, dat bij de controlemelk (A.1.2.7.) (vrij van bacteriegroeiremmende stoffen) een incubatietijd van  $\pm 4,5$  h verkregen wordt voor volledige omkleuring.

A.1.4.2. Meng en verdeel het testmedium (A.1.4.1.) in de testbuizen (A.1.5.2.8.) of in de cups van de microtiterplaat (A.1.5.2.9.) in porties van respectievelijk 1 ml en 200 µl. Laat het testmedium stollen. Zorgvuldig afgesloten gevulde testbuizen of microtiterplaten zijn 1 dag houdbaar bij 0-5 °C.

**A.1.5. Apparatuur en glaswerk.**

De gewone laboratoriumuitrusting voor microbiologische analyses en in het bijzonder :

**A.1.5.1. Apparatuur.**

A.1.5.1.1. Broedstof met geforceerde luchtcirculatie, werkend bij  $63 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.2. Broedstof met geforceerde luchtcirculatie, werkend bij  $55 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.3. Waterbad met geforceerde circulatie, werkend bij  $63 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.4. Rekjes voor buizen.

A.1.5.1.5. Micropipetten met instelbaar volume met wegwerptips voor bemonstering van volumes van 100 µl, 200 µl, 300 µl en 450 µl.

**A.1.5.2. Glaswerk en plasticmateriaal.****A.1.5.2.1. Monsternameflesjes.**

A.1.5.2.2. Petriplaten in doorzichtig, ongekleurd glas of voorgesteriliseerd van kunststof, met een inwendige diameter van ongeveer 90 mm en een minimum hoogte van 10 mm. De bodem dient vlak te zijn met een gelijkmatige dikte.

A.1.5.2.3. Petriplaten in doorzichtig, ongekleurd glas of voorgesteriliseerd van kunststof, met een inwendige diameter van ongeveer 140 mm. De bodem dient vlak te zijn met een gelijkmatige dikte.

A.1.5.2.4. Flesjes met een capaciteit van 250 ml.

A.1.5.2.5. Pipetten uit glas of steriel plastic materiaal met een capaciteit van 1 en 10 ml.

A.1.5.2.6. Glazen Drigalsky-spatel.

A.1.5.2.7. Proefbuizen, afmetingen 104 x 14 mm.

A.1.5.2.8. Korte proefbuizen, afmetingen 85 x 14 mm.

A.1.5.2.9. Microtiterplaten met U-vormige cups met vlakke bodem.

Opmerking : Het glaswerk kan op volgende manieren gesteriliseerd worden :

a) in een heteluchtoven bij 170-175 °C gedurende minimaal 1 uur

b) in een autoklaaf bij 121 °C gedurende minimaal 20 minuten.

Pipetten moeten gesteriliseerd worden in een heteluchtoven.

**A.1.6. Werkwijze**

A.1.6.1. De monsters moeten zo spoedig mogelijk na de monstername geanalyseerd worden, bij voorkeur binnen de 24 uur. De monsters moeten bewaard worden tussen 0 en 5 °C. Indien dit niet mogelijk is, moet men de monsters diepvriezen ( $-30$  tot  $-15$  °C).

A.1.6.2. Identificeer elke proefbuis (A.1.4.2.) of elk cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.) voorzien van testmedium.

A.1.6.3. Meng de te onderzoeken monsters. Breng respectievelijk 300 µl of 100 µl monster over in een proefbuis (A.1.4.2.) of cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.) gevuld met testmedium.

A.1.6.4. Breng in duplo respectievelijk 300 µl of 100 µl van de remstofvrije melk (A.1.2.7.) over in een proefbuis (A.1.4.2.) of in een cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.) gevuld met testmedium.

A.1.6.5. Breng in duplo respectievelijk 300 µl of 100 µl van een penicillinestandaard (A.1.2.8.) over in een buis (A.1.4.2.) of in een cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.) gevuld met testmedium.

A.1.6.6. Breng in duplo respectievelijk 300µl of 100µl van een sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.) over in een buis (A.1.4.2.) of in een cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.) gevuld met testmedium.

A.1.6.7. Laat de monsters en standaarden gedurende 1 uur bij kamertemperatuur diffunderen doorheen het testmedium.

A.1.6.8. Giet de bovenop het testmedium staande melk af uit de respectievelijke proefbuizen of cupjes. Vermijd hierbij contaminatie tussen buizen of cups onderling. Sluit de buizen of cups en plaats ze vervolgens direct of na bewaring bij 5 °C (maximaal gedurende 18 uur) in een waterbad bij  $63 \pm 1$  °C en incubeer totdat de kleur van het testmedium voor de remstofvrije melk homogeen geel verkleurd is.

Het tijdstip van uithalen wordt bepaald door vanaf het moment dat de kleur in de proefbuizen of cups met controlemelk (A.1.6.4.) begint te veranderen, de kleur te evalueren om de 10 minuten.

A.1.7. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

De kleur van het testmedium wordt beoordeeld in de proefbuizen of cups ongeveer 5 à 10 min. na verwijdering uit het waterbad.

A.1.7.1. Een purpere kleur van het testmedium wijst op aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.

A.1.7.2. Een purpere kleur van slechts een deel van het testmedium of een onregelmatige verkleuring (geelgroen tot geelpaars) duidt op een mogelijke aanwezigheid van bacteriegroeiremmende stoffen.

A.1.7.3. Een gele verkleuring van het testmedium duidt op het niet aantoonbaar zijn van bacteriegroei-remmende stoffen.

A.1.7.4. Het medium in de proefbuizen/cupjes met controlemelkmonsters (A.1.6.4.) moet geel gekleurd zijn, zoniet zijn de sporen onvoldoende levenskrachtig en moet de proef hernomen worden.

A.1.7.5. Het medium in de proefbuizen/cupjes met penicillinestandaard (A.1.6.5.) moet paars gekleurd zijn; terwijl het medium in de proefbuizen/cupjes met sulfadimidinestandaard (A.1.6.6.) een geel-paarse kleur moet bevatten, zoniet zijn de sporen onvoldoende gevoelig en moet de proef hernomen worden.

A.1.8. Bevestiging van de resultaten.

Bevestig alle monsters die een reactie geven zoals beschreven onder A.1.7.1. en A.1.7.2. met methode B.

A.2. Delvotest SP (Gist-brocades nv).

A.2.1. Principe.

De Delvotest SP, gebaseerd op hetzelfde principe als de agardiffusietest beschreven onder A.1., kan ook als screeningsmethode ingezet worden voor het opsporen van positieve of verdachte melkmonsters voor wat de aanwezigheid van bacteriegroei-remmende stoffen betreft. De Delvotest SP kan uitgevoerd worden met ampullen of microtiterplaten.

A.2.2. Werkwijze.

Vooreerst gelden hier ook de richtlijnen i.v.m. de bewaring van de monsters (A.1.6.1.). Verder dient de test uitgevoerd te worden volgens de bijsluiters meegeleverd met de testkit. Naast de monsters wordt ook in duplo remstofvrije melk (A.1.2.7.), een penicillinestandaard (A.1.2.8.) en een sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.) onderzocht.

A.2.3. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

Na incubatie wordt de kleur van het testmedium van de Delvotest SP beoordeeld en geïnterpreteerd analoog zoals beschreven in A.1.7.

A.2.4. Bevestiging van de resultaten.

Bevestig alle monsters die een reactie geven zoals beschreven onder A.1.7.1. met methode B.

B. Bevestiging

Alle monsters (A.1.8. of A.2.4.) die volgens de screening (A.1. of A.2.) remstoffen bevatten of kunnen bevatten, worden bevestigd volgens methode B.1. of B.2.

Alvorens de bevestiging op de positieve of verdachte monsters uit te voeren, dient men deze melkmonsters vooraf te verhitten gedurende 10 min. in een waterbad van  $80 \pm 1$  °C. Hierbij let men erop dat het waterniveau in het warmwaterbad minimum 1 cm hoger staat dan het niveau van de melk.

Door de verhitting wordt een groei-remming door in de melk mogelijks aanwezige natuurlijke groei-remmende stoffen te niet gedaan. Na de verhitting dient men de monsters direct terug te koelen onder stromend water en verder te bewaren bij 0-5 °C. Bij de monsters die bij de bevestiging een positief resultaat geven, wordt de aanwezigheid van sulfonamiden nagegaan volgens methode B.3. of B.4.. Afhankelijk van het resultaat worden de monsters verder bevestigd met methode B.5..

B.1. Bevestiging (in proefbuizen of microtiterplaten)

B.1.1. Principe.

De onder A.1. beschreven methode wordt herhaald, nu echter met verhitte melk, om de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroei-remmende stoffen al dan niet te bevestigen.

B.1.3. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten.

B.1.3.1. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten voor bevestiging van de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroei-remmende stoffen.

Deze testbuizen of testmicrotiterplaten worden bereid volgens de reeds beschreven methode vermeld onder A.1.4.

B.1.4. Werkwijze.

B.1.4.1. Identificeer elke proefbuis (A.1.4.2.) of elk cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2.).

B.1.4.2. Meng de te onderzoeken monsters (A.1.8.). Breng 300µl voorverhit monster over in een proefbuis met testmedium (A.1.4.2.). Werk met microtiterplaten, dan brengt men 100µl monster in de respectievelijke cups van de microtiterplaat (A.1.4.2.).

B.1.4.3. Voer dezelfde bepaling ook telkens in duplo uit met respectievelijk 300µl (testbuizen) of 100µl (microtiterplaten) remstofvrije melk (A.1.2.7.), penicillinestandaard (A.1.2.8.) en sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.).

B.1.4.4. Laat de monsters en standaarden gedurende 1 uur bij kamertemperatuur diffunderen doorheen het testmedium.

B.1.4.5. Giet de bovenop het testmedium staande melk af. Sluit de buizen of cups en plaats ze vervolgens in een waterbad bij  $63 \pm 1$  °C totdat de kleur van het testmedium voor de remstofvrije melk homogeen geel verkleurd is.

Het tijdstip van uithalen wordt bepaald door vanaf het moment dat de kleur in de proefbuizen of cups met remstofvrijemelk (A.1.2.7.) begint te veranderen, de kleur te evalueren om de 10 minuten.

B.1.5. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

De kleur van het testmedium wordt beoordeeld in de proefbuizen of cups, ongeveer 5 à 10 min na verwijdering uit het waterbad.

B.1.5.1. Een gele verkleuring van het testmedium duidt op het niet aantoonbaar zijn van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen. Het eerder bekomen verdacht of positief resultaat bij de screeningstest (A.) kan toegeschreven worden aan het voorkomen van natuurlijke groeiremmende stoffen in de melk. Deze monsters worden niet verder onderzocht.

B.1.5.2. Bekomt men een paarse kleur voor het testmedium of een onregelmatige verkleuring (geelgroen) van het testmedium dan bevestigt dit de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen in het melkmonster. Deze monsters worden verder onderzocht op de aanwezigheid van sulfonamiden (beschreven onder B.3. of B.4.), en afhankelijk van het resultaat ook gecontroleerd op penicillinen of andere groeiremmende stoffen zoals beschreven onder B.5.

B.1.5.3. Het medium in de proefbuizen/cupjes met controlemelkmonsters (A.1.6.4.) moeten geel gekleurd zijn, zoniet zijn de sporen onvoldoende levenskrachtig en moet de proef hernomen worden.

B.1.5.4. Het medium in de proefbuizen/cupjes met penicillinestandaard (A.1.6.5.) moet paars gekleurd zijn; terwijl het medium in de proefbuizen/cupjes met sulfadimidinestandaard (A.1.6.6.) een geel-paarse kleur moet bevatten, zoniet zijn de sporen onvoldoende gevoelig en moet de proef hernomen worden.

B.2. Bevestiging (Delvotest SP) in ampullen of microtiterplaten

B.2.1. Principe.

De onder A.2. beschreven methode (Delvotest SP) wordt herhaald, nu echter met verhitte melk, om de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen al dan niet te bevestigen.

De testen kunnen uitgevoerd worden zowel door gebruik te maken van ampullen of microtiterplaten.

B.2.2. Werkwijze.

De test wordt volledig uitgevoerd zoals voorgeschreven in de bijsluit, meegeleverd met de testkit.

Naast de te testen monsters (A.1.8.) worden ook in duplo remstofvrije melk (A.1.2.7.), penicillinestandaard (A.1.2.8.) en sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.) uitgetest.

B.2.3. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

Na incubatie wordt de kleur van het testmedium van de Delvotest-SP beoordeeld en geïnterpreteerd analoog zoals beschreven in B.1.5.

Alle monsters waarin de aanwezigheid van melkvreemde bacteriegroeiremmende stoffen bevestigd wordt, worden verder onderzocht op de aanwezigheid van sulfonamiden (beschreven onder B.3. of B.4.), en afhankelijk van het resultaat ook gecontroleerd op penicillinen of andere groeiremmende stoffen zoals beschreven onder B.5..

B.3. Bevestiging van sulfonamiden (in proefbuis of microtiterplaten)

B.3.1. Principe.

De onder A.1. beschreven methode wordt herhaald met de vooraf verhitte melk (10 min., 80 °C) en terzelfdertijd wordt ook de test herhaald in aanwezigheid van para-aminobenzoëzuur om de aanwezigheid van sulfonamiden te bevestigen. Para-aminobenzoëzuur gaat immers de remmende werking van sulfonamiden tegen.

B.3.2. Standaardoplossingen.

B.3.2.1. Para-aminobenzoëzuuroplossing

Samenstelling : para-aminobenzoëzuur : 1,0 g  
gedestilleerd water : 200 ml

Bereiding : Los het para-aminobenzoëzuur op in water onder lichtjes verwarmen. Afkoelen tot kamertemperatuur.

De oplossing is maximaal 1 week houdbaar, bewaard in het donker bij 0-5 °C.

B.3.3. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten.

B.3.3.1. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten als vergelijkingsmateriaal bij de bepaling van de werking van het para-aminobenzoëzuur.

Deze testbuizen of testmicrotiterplaten zijn identiek als deze gebruikt bij de screening en de eerste bevestiging en worden dan ook bereid volgens de reeds beschreven methode vermeld onder A.1.4.

B.3.3.2. Bereiding van de testbuizen of testmicrotiterplaten voor bevestiging van sulfonamiden.

B.3.3.2.1. Smelt maximaal 24 h voor gebruik het basisagarmedium (A.1.2.1.) op. Koel af tot 63 °C. Voeg per 100 ml op aseptische wijze 2 ml broomcresolpurper (A.1.2.3.), 2 ml trimethoprimoplossing (A.1.2.2.) en 2 ml para-aminobenzoëzuur-oplossing (B.3.2.1.) toe.

Stel de pH met 1 M NaOH zo nauwkeurig mogelijk in op  $8,00 \pm 0,02$ , gemeten bij 63 °C met een pH-meter met temperatuurscorrectie.

Voeg van de sporenoplossing (A.1.3.3.5.) een zodanige hoeveelheid toe dat bij de controlemelk (A.1.2.7.) een incubatietijd van  $\pm 4,5$  h verkregen worden voor volledige omkleuring.

B.3.3.2.2. Meng en verdeel het sulfonamidetestmedium in de testbuizen (A.1.5.2.8.) of de cups van de microtiterplaat (A.1.5.2.9.) in porties van respectievelijk 1 ml en 200  $\mu$ l. Laat het sulfonamidetestmedium stollen. Zorgvuldig afgesloten gevulde testbuizen of microtiterplaten zijn 1 dag houdbaar bij 0-5 °C.

B.3.4. Werkwijze.

B.3.4.1. Identificeer elke proefbuis (A.1.4.2. en B.3.3.2.2.) of elk cupje van een microtiterplaat (A.1.4.2. en B.3.3.2.2.).

B.3.4.2. Meng de te onderzoeken monsters (B.1.5.2. of B.2.3.). Breng 300  $\mu$ l voorverhit monster over in een proefbuis met testmedium (A.1.4.2.) en een proefbuis met sulfonamidetestmedium (B.3.3.2.2.). Werk met microtiterplaten, dan brengt men 100  $\mu$ l monster in de respectievelijke cups van de microtiterplaat (A.1.4.2. en B.3.3.2.2.).

B.3.4.3. Voer dezelfde bepaling ook telkens in duplo uit met respectievelijk 300 µl (testbuizen) of 100 µl (microtiterplaten) remstofvrije melk (A.1.2.7.), penicillinestandaard (A.1.2.8.) en sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.).

B.3.4.4. Laat de monsters en standaarden gedurende 1 uur bij kamertemperatuur diffunderen doorheen het testmedium of sulfonamidetestmedium.

B.3.4.5. Giet de bovenop het (sulfonamiden) testmedium staande melk af. Sluit de buizen of cups en plaats ze vervolgens in een waterbad bij  $63 \pm 1$  °C totdat de kleur van het testmedium voor de remstofvrije melk homogeen geel verkleurd is.

Het tijdstip van uithalen wordt bepaald door vanaf het moment dat de kleur in de proefbuizen of cups met remstofvrije melk (A.1.2.7.) begint te veranderen, de kleur te evalueren om de 10 minuten.

B.3.5. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

De kleur van het (sulfonamiden) testmedium wordt beoordeeld in de proefbuizen of cups, ongeveer 5 à 10 min na verwijdering uit het waterbad. Bij de beoordeling wordt voor elk monster de kleur van het sulfonamidetestmedium (+ para-aminobenzoëzuur) vergeleken met de kleur van het testmedium (zonder para-aminobenzoëzuur).

B.3.5.1. Wordt door toevoeging van para-aminobenzoëzuur (sulfonamidetestmedium) een minder paarse of minder geelgroene kleur bekomen in vergelijking met de kleur van het testmedium (zonder para-aminobenzoëzuur) voor hetzelfde monster, dan betekent dit dat het monster sulfonamiden bevat. Al de monsters die geen residuen van sulfonamiden bevatten worden verder onderzocht zoals beschreven onder B.5.

B.3.5.2. Het (sulfonamiden) testmedium in de proefbuizen/cupjes met controlemelkmonsters (A.1.6.4.) moet geel gekleurd zijn, zoniet zijn de sporen onvoldoende levenskrachtig en moet de proef hernomen worden.

B.3.5.3. Het (sulfonamiden) testmedium in de proefbuizen/cupjes met penicillinestandaard (A.1.6.5.) moet paars gekleurd zijn. Het testmedium in de proefbuizen/cupjes met sulfadimidinestandaard (A.1.6.6.) moet een geel-paarse kleur bevatten, terwijl voor dezelfde standaard het kleur van het sulfonamidetestmedium duidelijk homogener geel moet gekleurd zijn, zoniet moet de proef hernomen worden.

#### B.4. Bevestiging van sulfonamiden (Delvotest SP) in ampullen of microtiterplaten

##### B.4.1. Principe.

De onder A.2. beschreven methode (Delvotest SP) wordt nogmaals herhaald met vooraf verhitte melk (10 min/ 80 °C) en terzelfdertijd wordt ook de test herhaald in aanwezigheid van para-aminobenzoëzuur om de aanwezigheid van sulfonamiden te bevestigen.

De testen kunnen uitgevoerd worden zowel door gebruik te maken van ampullen of microtiterplaten.

##### B.4.2. Werkwijze.

De test wordt volledig uitgevoerd zoals voorgeschreven in de bijsluiters, meegeleverd met de testkit.

De monsters (B.1.5.2. of B.2.3.) worden zowel uitgetest in aan- en afwezigheid van para-aminobenzoëzuur. Naast de te testen monsters (A.1.8.) worden ook in duplo remstofvrije melk (A.1.2.7.), penicillinestandaard (A.1.2.8.) en sulfadimidinestandaard (A.1.2.9.) in aan- en afwezigheid van para-aminobenzoëzuur uitgetest.

##### B.4.3. Beoordeling van de monsters, interpretatie van de resultaten.

Na incubatie wordt de kleur van het testmedium van de Delvotest SP beoordeeld en geïnterpreteerd analoog zoals beschreven in B.3.5.. Daarbij wordt voor elk monster het kleur van het testmedium in aanwezigheid van para-aminobenzoëzuur vergeleken met het kleur van het testmedium in afwezigheid van para-aminobenzoëzuur.

Alle monsters waarin geen residuen van sulfonamiden aangetoond werden, worden verder onderzocht zoals beschreven onder B.5..

#### B.5. Bevestiging van penicillinen (in petriplaten)

Alle monsters die een groeiremming vertoonden bij de screening (methode A.1. of A.2.) en de bevestiging (methode B.1. of B.2.), maar waarbij geen sulfaresiduen werden aangetoond (methode B.3. of B.4.) worden verder gecontroleerd op de aanwezigheid van penicillinen of andere groeiremmende stoffen.

##### B.5.1. Definitie.

Het melkmonster bevat penicilline indien bij uitvoering van de hierna beschreven methode een remzone wordt bekomen die bij toevoeging van penicillinase (betalactamase) aan het monster verkleint in diameter (penicilline + ander antibioticum) of helemaal verdwijnt (penicilline). Indien de remzone niet verdwijnt door penicillinase dan bevat het melkmonster een ander remstof; verdwijnt de remzone slechts gedeeltelijk dan bevat het monster naast penicilline ook nog een ander antibioticum.

##### B.5.2. Principe.

Een schijfje filterpapier geïmpregneerd met de te onderzoeken melk wordt op het oppervlak gelegd van een agarbodem, geënt met een cultuur van *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. De normale groei van de micro-organismen veroorzaakt na incubatie een vertroebeling van het agarmilieu. De aanwezigheid in de melk van remstoffen wordt aangetoond door een heldere zone rondom het schijfje. De diameter van de heldere zone is ondermeer afhankelijk van de concentratie van de remstoffen die in de melk aanwezig zijn.

##### B.5.3. Media, standaardoplossingen, testorganisme.

Opmerking: — de ingrediënten moeten geschikt zijn voor bacteriologische doeleinden

— het water moet gedestilleerd of gedemineraliseerd zijn of van equivalente zuiverheid en mag geen bacteriegroeiremmende stoffen bevatten.

##### B.5.3.1. Nutriënt agar.

Zie A.1.2.4.

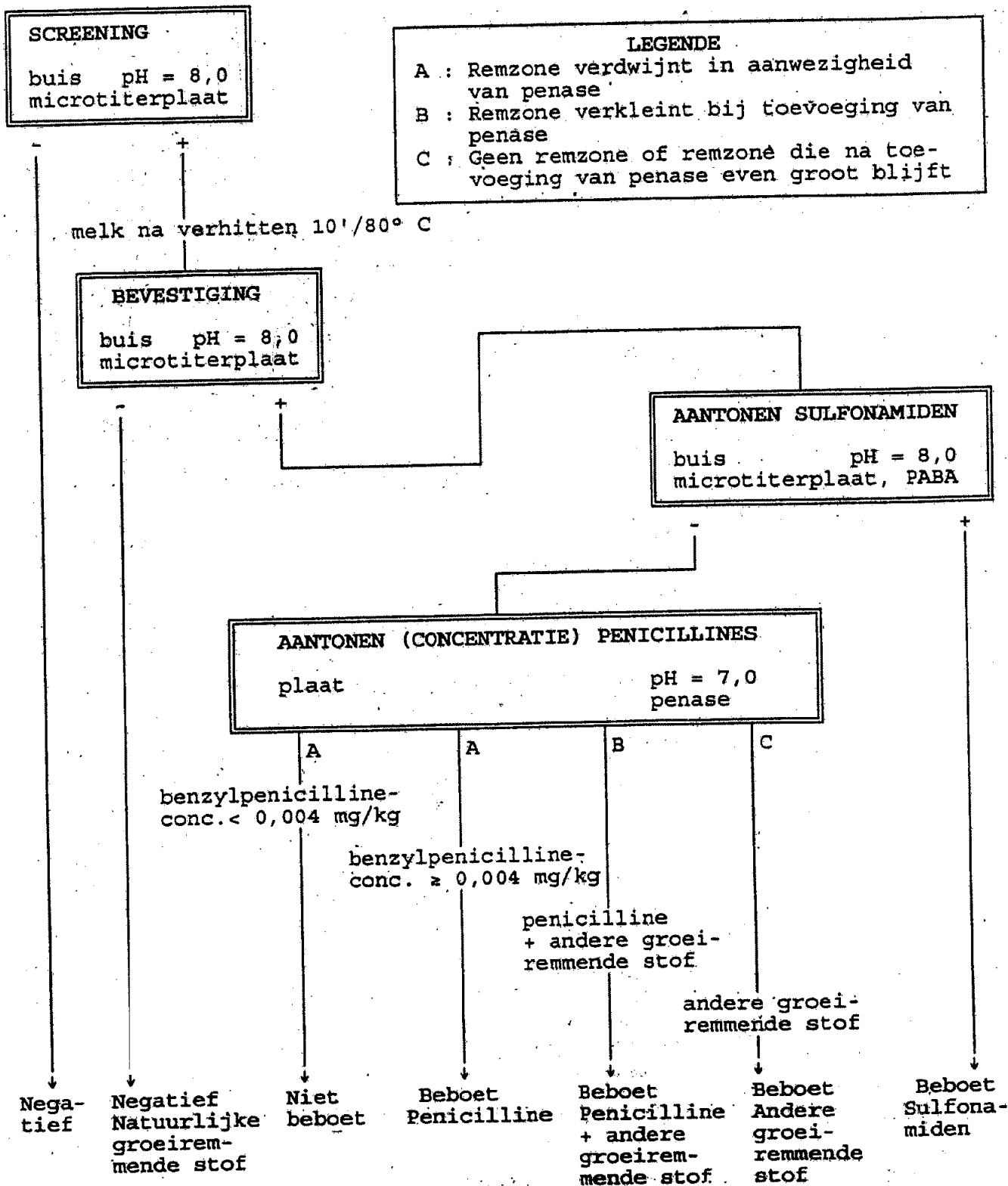
##### B.5.3.2. Testmedium = Plate Count Agar.

Zie A.1.2.1.

- B.5.3.3. Standaard penicilline-oplossing.  
Zie A.1.2.8.
- B.5.3.4. Penicillinase-oplossing.  
Los voldoende penicillinase (betalactamase) op in steriel gedestilleerd water om een concentratie van 40.000 E/ml te verkrijgen. Deze oplossing, verdeeld in kleinere porties, kan bewaard worden bij 5 °C gedurende 4 weken.
- B.5.3.5. Testorganisme.  
Zie A.1.2.10.
- B.5.3.6. Gebruikscultuur (sporensuspensie).  
Zie A.1.3.3.5.
- B.5.4. Apparatuur en glaswerk.
- B.5.4.1. Apparatuur.  
Zie A.1.5.1.
- B.5.4.2. Glaswerk.  
Zie A.1.5.2.
- B.5.4.3. Schijfjes filtreerpapier voor antibiotica onderzoek.  
Schijfjes met een diameter van 12 tot 13 mm \*\*\*.  
Een blancoproef dient uitgevoerd op negen schijfjes van elk lot filtreerpapier. De schijfjes, gedrenkt in steriel gedestilleerd water mogen geen heldere zone vormen op de petriplaten (B.5.5.4.) na incubatie van 3 uren bij een temperatuur tussen 55 en 63 °C.
- B.5.5. Voorbereiding van de proef.
- B.5.5.1. Smelt het testmedium (B.5.3.2.) en koel tot 55 °C.
- B.5.5.2. Breng op aseptische wijze 1 deel van de verse sporensuspensie (B.5.3.6.) bij voldoende delen (5-25) van het testmedium (B.5.3.2.) zodat een geschikte dichtheid van kolonies in het geïnoculeerde medium bekomen wordt. Meng voldoende.
- B.5.5.3. Breng het geïnoculeerde testmedium (B.5.5.2.) over in een petriplaat, voorafgaandelijk verwarmd tot 55 °C, zodat een laag van 0,6 tot 0,8 mm dikte wordt bekomen (dit stemt overeen met 6 ml voor platen met een normale diameter van 90 mm).
- B.5.5.4. Plaats de petriplaten (B.5.5.3.) op een horizontaal, koud oppervlak. Laat de agarbodem stollen. Draai de platen om na stolling.
- B.5.5.5. De aldus bereide petriplaten dienen bij voorkeur de dag zelf gebruikt te worden. Ze kunnen maximum een week bewaard worden wanneer deze onmiddellijk na de bereiding afgekoeld en in een polyethyleenzakje in de koelkast bij 5 °C worden bewaard.
- B.5.6. Uitvoering van de proef.
- B.5.6.1. Voorbereiding van de monsters.  
Er wordt gebruik gemaakt van de verhitte melk (10 min. 80 °C). Na goed mengen wordt 9,75 ml monster overgebracht in een proefbuis. 0,25 ml van de penicillinase-oplossing (B.5.3.4.) wordt toegevoegd, zodat een penicillinaseconcentratie van 1000 IE/ml bekomen wordt (verhouding monster/penicillinase-oplossing = 39/1). Nadien wordt goed gemengd. Dit mengsel wordt 1 h bij 37 °C geïncubeerd.
- B.5.6.2. Detectie van penicilline.
- B.5.6.2.1. Schud het monster zorgvuldig. Houd het schijfje filtreerpapier (B.5.4.3.) met de rand juist tegen het oppervlak van het monster met behulp van een rein en droog pincet tot het schijfje volledig geïmpregneerd is. Verwijder de overmaat melk door het schijfje tegen de wand van de fles te dippen. Leg het schijfje vlak op het vooraf gedroogd oppervlak van de testplaat (B.5.5.4.) en druk zachtjes aan met het pincet.
- B.5.6.2.2. Van elk monster wordt eveneens een schijfje gelegd na penicillinasebehandeling van het monster (B.5.6.1.).
- B.5.6.2.3. De schijfjes moeten minstens 20 mm uit elkaar liggen en minstens 10 mm van de rand van de plaat.
- B.5.6.2.4. Om de gevoeligheid te testen zullen schijfjes gedrenkt worden in de standaardpenicilline-oplossing (B.5.3.3.). Per plaat zal minimum één dergelijk schijfje gelegd worden.
- B.5.6.2.5. Per plaat zal ook een schijfje gelegd worden van het blanco-monster (A.1.2.7.).
- B.5.6.2.6. De petriplaat waarin de schijfjes filtreerpapier werden aangebracht, worden met het deksel onderaan gedurende 2,5 tot 3 uur geïncubeerd bij een temperatuur liggend tussen 55 en 63 °C.
- B.5.6.2.7. Na bebroeding worden de platen nagezien op aanwezigheid van remzones. De remzones worden gemeten. Rond het schijfje met de penicillinestandaard (B.5.3.3.) moet een remzone van ten minste 2 mm aanwezig zijn.
- B.5.6.2.8. De aanwezigheid van een heldere zone van ten minste 2 mm rond het schijfje duidt op de aanwezigheid van remstoffen.
- B.5.7. Interpretatie van de resultaten.
- B.5.7.1. Indien er zich rond het schijfje met penicillinase behandeld monster geen remzone bevindt, maar er is wel een remzone rond het schijfje met het melkmonster, die gelijk aan of groter is dan de remzone rond het schijfje met de penicillinestandaard, dan komt de remstof in het melkmonster overeen met een natrium-benzylpenicillineconcentratie van ten minste 0,004 mg/ml. Met een kleine heldere zone van minder dan 2 mm rond het schijfje van met penicillinase behandelde melk wordt geen rekening gehouden.
- B.5.7.2. Indien de diameter van de remzone rond het schijfje met penicillinase behandeld monster gelijk is aan de diameter van de remzone rond het schijfje met het melkmonster, dan bevat dit monster remstoffen die et geïnactieveerd worden door de penicillinaseconcentraties gebruikt in deze methode.
- B.5.7.3. Indien de diameter van de remzone rond het schijfje met penicillinase behandeld monster kleiner is dan de diameter rond het schijfje met het melkmonster, dan bevat het monster penicilline samen met een andere stof.

\* : Schleicher & Schuell 601/2 of overeenstemmende kwaliteit.

**SCHEMA VAN DE WERKWIJZE VOOR HET AANTONEN VAN MELKVREEMDE BACTERIEGROEIEMMENDE STOFFEN**



Opmerkingen in verband met het schema van het aantonen van melkverreemde bacteriegroeiremmende stoffen.

— Niettegenstaande een zelfde testorganisme (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) wordt toegepast, is de gevoeligheid van de test afhankelijk of men de test uitvoert in buisjes of cups van een microtiterplaat enerzijds of in een petriplaat anderzijds. De gevoeligheid voor diverse antibiotica is namelijk groter bij uitvoering in buisjes of microtiterplaat.

— Bij de bevestiging van penicillines moet men er rekening mee houden dat de antimicrobiële werking van bepaalde semi-synthetische penicillines niet volledig geïnactiveerd wordt door penase met een concentratie van 1000 E/ml.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

#### Bijlage 9 : Bepaling van het vriespunt

##### 1. Definitie

Vriespunt van de melk : de uit meting volgens de beschreven werkwijze verkregen waarde, uitgedrukt in graden Celsius (°C).

##### 2. Principe

Een te onderzoeken hoeveelheid melk wordt onderkoeld tot de, van het instrument afhankelijke, gewenste temperatuur en dan wordt kristallisatie veroorzaakt door mechanische trilling, waardoor de temperatuur snel stijgt tot een niveau dat overeenkomt met het vriespunt van het monster.

Het instrument wordt geijkt door het zodanig in te stellen dat voor twee standaardoplossingen de juiste waarden worden verkregen bij toepassing van dezelfde werkwijze als voor monsters melk. Onder deze voorwaarden geeft het plateau het vriespunt van de melk in graden Celsius.

##### 3. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, en in het bijzonder :

###### 3.1. Thermistorcryoscoop

De thermistorcryoscoop bestaat uit een thermostatisch geregeld koelbad, een thermistorsonde (een weerstandsthermometer met halfgeleider) met bijbehorende schakeling en een galvanometer of « afleesinstrument », een trilroeder en een voorziening om beveziging te veroorzaken, samen met monsterbuisen.

###### 1° Koelbad

Twee typen koelbad kunnen worden gebruikt.

###### a) Dompeltype.

Een goed geïsoleerd bad met een geschikte koelvloeistof, zodanig geroerd dat het temperatuurverschil tussen gelijk welke twee punten in de vloeistof niet meer bedraagt dan 0,2 °C. De vloeistof temperatuur mag niet meer dan ± 0,5 °C afwijken van de door de fabrikant vastgelegde nominale waarde.

Belangrijk is dat de vloeistof in het koelbad op een constant niveau wordt gehouden. Het gehele oppervlak van de monsterbuis onder het volumemerkteken moet door de koelvloeistof bedekt zijn.

###### b) Circulatietype.

Een ononderbroken stroom van een geschikte koelvloeistof wordt rondom de monsterbuis gepompt. De temperatuur van de vloeistof mag niet meer dan ± 0,5 °C afwijken van de door de fabrikant vastgelegde nominale waarde.

Een geschikte koelvloeistof bestaat uit een 33 % (v/v) waterige oplossing van ethaan, 1,2-diol (ethyleenglycol).

###### 2° Thermistor en bijbehorende schakeling

De thermistor dient een glazen sonde te hebben, niet groter dan 1,80 ± 0,2 mm in diameter en met een punt waarvan de diameter niet groter is dan 0,31 mm. De tijdsconstante van de thermistor moet minder dan 2 seconden bedragen en de waarde van  $\beta$  (zie opmerking) moet hoog zijn. De bedrijfsspanning, stroomsterkte en dissipatieconstante moeten zodanig zijn dat bij - 0,512 °C de temperatuur van de thermistor niet meer dan 0,005 °C boven de temperatuur van zijn omgeving stijgt. De maximale tolerantie voor de weerstand moet ± 5 % zijn.

Bij gebruik van de sonde in de cryoscoop moet het uiteinde van de glazen punt in de as van de monsterbuis liggen op een punt 44,6 ± 0,1 mm onder het boveinde van de buis (zie figuur 1). De gebruiker moet kunnen beschikken over een houder om de sonde in deze positie te kunnen plaatsen.

##### Opmerking

Met  $\beta$  wordt de temperatuur-weerstandskarakteristiek van de thermistor vastgelegd volgens de formule :

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2}$$

waarin

T = temperatuur in Kelvin,

R = de weerstand in ohm bij temperatuur T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \text{temperatuurcoëfficiënt.}$$

$\beta$  is een constante die afhankelijk is van het voor de thermistor gebruikte materiaal. In de huidige praktijk wordt een waarde boven 3.000 aanbevolen.

###### 3° Meet- en afleesinstrument

###### a) Meetprincipe.

Het te gebruiken instrument moet werken volgens het principe dat het eerste « plateau » in de vriespuntkromme wordt gezocht. Het plateau is het deel van de kromme waar de temperatuur minstens 20 seconden binnen ± 0,002 °C constant blijft.

###### b) Handbediening.

De weerstand van de thermistor dient met een Wheatstone brug of een gelijkaardig toestel te worden gecompenzeerd, waarbij stabiele weerstanden van de hoogste kwaliteit moeten worden gebruikt met een afwijking van minder dan ± 10 % en een temperatuurcoëfficiënt lager dan  $2 \times 10^{-5}$  °C.

De variabele mag over het hele bereik geen afwijking van de lineariteit te zien geven die groter is dan 0,3 % van haar maximumwaarde.

Er moet een mogelijkheid zijn om de weerstanden bij calibratie in te stellen.

De meetschaal moet een verdeling hebben die niet groter is dan 0,001 °C.

c) Automatische werking.

Het afleesinstrument moet een oplossend vermogen hebben van ten minste 0,001 °C in het gebied van 0 tot -1 °C.

De stabiliteit van het afleesinstrument en de bijbehorende schakeling moet zo zijn dat opeenvolgende aflezingen van dezelfde temperatuur niet meer dan 0,001 °C verschillen.

De lineariteit van de schakeling moet zo zijn dat als het instrument juist wordt bediend binnen het gehele traject van -0,400 tot -0,800 °C geen fout van meer dan 0,001 °C wordt veroorzaakt.

4° Roerstaaf

Voor het roeren van de te onderzoeken hoeveelheid melk wordt een staaf gebruikt van een metaal dat ten opzichte van melk inert is en die een diameter heeft tussen 1 en 1,5 mm.

De amplitude van de roerstaaf moet afgesteld worden; de staaf moet verticaal worden gemonteerd met de onderkant op gelijke hoogte met het uiteinde van de thermistorsonde. Een tolerantie van ongeveer 1,5 mm onder of boven dit punt is toegestaan.

De roerstaaf moet in zijwaartse richting trillen met een door de fabrikant opgegeven amplitude (niet minder dan 1,5 mm) die voldoende is om de temperatuur in de te testen hoeveelheid monster tijdens de bepaling uniform te houden. De roerstaaf mag bij normaal roeren de thermistorsonde of de wand van de buis op geen moment raken.

5° Voorziening om bevroering te veroorzaken

Dit kan elke voorziening zijn waardoor onmiddellijk na het in werking treden ervan de bevroering van het monster begint, zodat de temperatuur van de te onderzoeken hoeveelheid tot het vriespunt stijgt. De roerstaaf kan hiertoe worden benut; men kan de trillingsamplitude gedurende 1 tot 2 seconden verhogen zodat de roerstaaf de wand van de monsterbuis raakt.

6° Monsterbuizen

De monsterbuizen (zie figuur 1) moeten van glas zijn met een lengte van  $50,8 \pm 0,1$  mm, een uitwendige diameter van  $16,0 \pm 0,1$  mm en een inwendige diameter van  $13,5 \pm 0,1$  mm. De wanddikte mag over de hele buis niet meer dan 0,1 mm verschillen.

De buizen moeten op 29,8 mm onder de rand (21 mm boven de onderkant van de buis) een merkteken hebben, overeenkomend met een monstervolume van  $2,5 \pm 0,1$  ml.

7° Elektriciteitsvoorziening

De voedingsspanning moet in het apparaat of extern gestabiliseerd zijn, zodat geen grotere variatie optreedt dan  $\pm 1$  % van de nominale waarde, wanneer de netspanning met  $\pm 6$  % varieert.

3.2. Analytische balans.

3.3. Maatkolven; 1.000 ml inhoud, klasse A.

3.4. Droogstoof, goed geventileerd, waarin een temperatuur van  $130 \pm 1$  °C kan worden gehandhaafd.

Elektrische oven, geventileerd, waarin een temperatuur van  $300 \pm 25$  °C kan worden gehandhaafd.

3.5. Exsiccator.

4. Reagentia

4.1. In borosilicaatglas gedistilleerd water, gekookt en gekoeld tot  $20 \pm 2$  °C in een kolf met een absorptiebuis voor kooldioxide.

4.2. Natriumchloride, analysekwaliteit, fijn gemalen, gedurende vijf uur bij  $300 \pm 25$  °C in een oven gedroogd, of anders gedurende ten minste 24 uur in een stoof bij  $130 \pm 1$  °C gedroogd en tot kamertemperatuur afgekoeld in een exsiccator.

4.3. Bereiding van standaardoplossingen

Weeg in een weegflesje de benodigde hoeveelheid (zie tabel 1) droog natriumchloride (punt 4.2) af. Los het op in gedistilleerd water (punt 4.1), breng dit kwantitatief over in een maatkolf van 1.000 ml en vul tot de merkstreep aan met water van  $20 \pm 2$  °C.

Bewaar deze oplossing bij ongeveer 5 °C niet langer dan twee maanden in goed afgesloten polyethyleen flessen van hoogstens 250 ml inhoud.

Tabel 1. — Vriespunt van natriumchlorideoplossingen bij 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,800

Zwenk en keer vóór gebruik van een standaardoplossing de fles voorzichtig verscheidene malen om om de inhoud grondig te mengen. Een standaardoplossing mag nooit zo heftig worden geschud dat lucht wordt ingeslagen.

Monsters van een standaardoplossing moeten uit de fles worden genomen door de oplossing in een schone droogbeker te gieten, anders gezegd, voor dit doel mogen nooit pipetten worden gebruikt.

Oplossingen uit flessen die voor minder dan een kwart gevuld zijn, mogen niet meer worden gebruikt en evenmin oplossingen die ouder zijn dan twee maanden, als geen fungicide (bij voorbeeld een thiomersaloplossing van 10 g/l) was toegevoegd.



### 5. Ijking van de thermistorcryoscoop

De cryoscoop moet zo worden opgesteld dat de temperatuur van de omgevingslucht niet meer dan 1 °C verschilt van de temperatuur waarbij de ijking werd uitgevoerd. De cryoscoop mag niet worden blootgesteld aan zonlicht of tocht en een kamertemperatuur boven 26-27 °C.

Zorg ervoor dat de cryoscoop werkt in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant en ten minste twaalf uur voordat de ijking is aangezet. Controleer de plaats van de sonde, de trillingsamplitude van de roerstaaf en de temperatuur van de koelvloeistoffen.

Kies twee standaardoplossingen (zie tabel 1) waarvan het vriespunt respectievelijk dicht boven en dicht onder het verwachte vriespunt van het te onderzoeken monster melk ligt. Het verschil in vriespunt tussen de twee oplossingen moet liefst niet kleiner dan - 0,100 °C zijn.

(In bepaalde, tegenwoordig verkrijgbare cryoscopen is de schakeling van de thermistor ontworpen om te worden afgesteld bij een specifieke waarde van het vriespunt binnen het meettraject van het instrument. In deze gevallen maakt het gebruik van een standaardoplossing met dat vriespunt als één van de ijkoplossingen de calibratieprocedure eenvoudiger en dient de fabrikant deze waarde op te geven.)

Pipetteer  $2,5 \pm 0,1$  ml van één standaardoplossing in een schone, droge monsterbuis en stel de cryoscoop in werking.

#### Opmerking

De monsterbuizen die bij ijking worden gebruikt moeten van dezelfde soort glas gemaakt zijn als die welke bij het onderzoek van het melkmonster worden gebruikt en zij moeten ook op dezelfde tijd gewassen en gespoeld zijn met gedemineraliseerd water. De temperatuur van de standaardoplossingen moet gelijk zijn aan die van de monsters melk.

Stel de knoppen voor ijking in volgens aanwijzing van de fabrikant tot de aflezing van de cryoscoop dezelfde waarde geeft als het vriespunt van de standaardoplossing. Herhaal de gang van zaken met de andere standaardoplossing en ga zo afwisselend door totdat opeenvolgende aflezingen voor elke oplossing de juiste waarde voor het vriespunt per oplossing geven zonder verdere bijstelling van de calibratieknoppen. De cryoscoop is dan klaar voor gebruik en zal rechtstreeks het vriespunt van het monster melk aangeven zonder dat enige correctie nodig is.

### 6. Voorbehandeling van het monster

6.1. Bewaar zo nodig de monsters bij een temperatuur tussen 0 en 5 °C.

6.2. Verwijder eventuele zichtbare deeltjes of vast botervet uit het monster, zo nodig door het te filtreren in een schone droge recipiënt en meng het monster voorzichtig. Het eventueel te gebruiken filter moet inert zijn voor melk en moet bij de laboratoriumtemperatuur goed werken.

6.3. De melk kan onderzocht worden bij de temperatuur (tussen 0 en 5 °C), waarbij zij is bewaard, of men kan de melk op de temperatuur van het laboratorium laten komen vlak voor het begin van het onderzoek. Het is echter noodzakelijk dat de standaardoplossingen en de monsters melk bij gebruik dezelfde temperatuur hebben.

6.4. Bepaal de titreerbare zuurtegraad van de melk zo goed mogelijk tegelijkertijd met de vriespuntbepaling. Monsters met een zuurtegraad boven 0,18 g melkzuur per 100 ml kunnen niet worden onderzocht.

6.5. UHT-behandelde melk en gesteriliseerde melk moeten voor onderzoek minstens 20 minuten in een open recipiënt staan.

### 7. Werkwijze

#### 7.1. Controle vooraf

Controleer dat het niveau en de temperatuur van de koelvloeistof in overeenstemming zijn met de aanwijzingen van de fabrikant en dat de thermistorsonde zich in een lege monsterbuis in de juiste stand bevindt. Schakel de cryoscoop in en zorg ervoor dat de koelvloeistof goed wordt geroerd of rondgepompt, al naar gelang van het geval. Controleer, nadat de cryoscoop ten minste twaalf uur aanstaat, de temperatuur van de koelvloeistof en de stand en trillingsamplitude van de roerstaaf.

#### 7.2. Routinecontrole van de ijking

Meet vóór elke testserie het vriespunt van een standaard natriumchlorideoplossing (bij voorbeeld een oplossing met als vriespunt - 0,512 °C) totdat twee opeenvolgende bepalingen geen groter verschil geven dan 0,001 °C. Als het gemiddelde van deze waarden meer dan 0,002 °C verschilt van het vriespunt van de standaardoplossing, ijk de cryoscoop dan opnieuw zoals beschreven in punt 5.

Voer de routinecontrole van de ijking ten minste elk uur uit bij continu gebruik van de cryoscoop. Houd rekening met de aanwijzingen van de fabrikant.

#### 7.3. Bepaling van het vriespunt van de melk

Kéer en draai de fles met het monster voorzichtig verscheidene malen om om de inhoud te mengen. Een monster mag nooit zo heftig worden geschud dat lucht wordt ingeslagen.

Giet  $2,5 \pm 0,1$  ml melk in een schone en droge monsterbuis en verwijder een eventuele overmaat met een pipet. Zorg ervoor dat de sonde en de roerstaaf schoon en droog zijn en veeg deze zo nodig van onder naar boven zorgvuldig droog met zacht, schoon en niet pluizend papier.

Plaats de monsterbuis in de geijkte cryoscoop volgens de aanwijzingen van de fabrikant. De melk zal afgekoeld worden en binnen 0,1 °C van een door de fabrikant opgegeven temperatuur zal het bevroren beginnen.

(Bij sommige automatische instrumenten kan deze temperatuur digitaal worden afgelezen; bij handbediende instrumenten kan de noodzakelijke precisie worden bereikt door te controleren of het bevroren begint wanneer de wijzer of haarlijn van de galvanometer samenvalt met het juiste merkteken.)

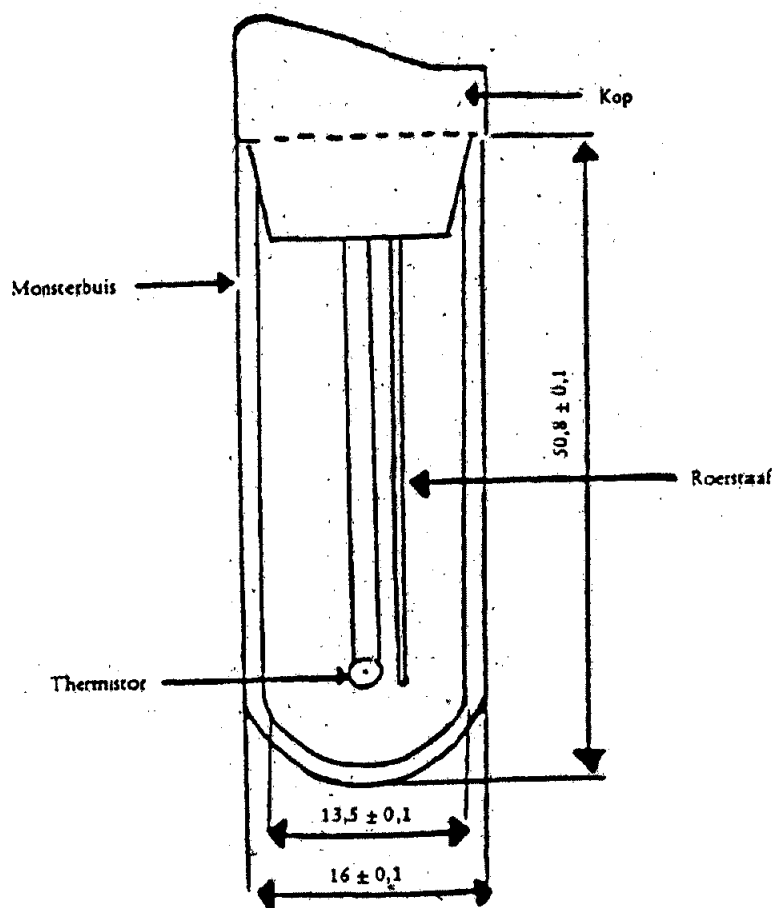
Laat, als om welke reden dan ook het bevroren begint vóór of na het opgegeven temperatuurgebied, de proef vervallen en herhaal de proef met een andere te onderzoeken hoeveelheid melk. Als het monster voor de herhaalde proef ook vóór de opgegeven temperatuur befrist, moet nog een hoeveelheid van het monster verwarmd worden tot 45 °C en vijf minuten op die temperatuur worden gehouden om kristallijn vet te laten smelten.

Koel dan weer tot de onderzoektemperatuur en onderzoek onmiddellijk. De temperatuur van de melk zal na het begin van het bevroren snel stijgen tot een waarde die enige tijd vrijwel constant blijft en zal daarna weer beginnen te dalen. Het vriespunt komt overeen met de hoogste bereikte temperatuur in deze periode en deze waarde dient te worden genoteerd.

#### Opmerking

Van monster tot monster zal er een verschil zijn in de periode met constante temperatuur en in de tijd tussen het begin van het bevroren en het bereiken van de hoogste temperatuur: deze periode en deze tijd zullen voor water en standaard natriumchloride-oplossingen aanzienlijk korter zijn dan voor melk. Het is van essentieel belang dat de hoogste temperatuur wordt vastgesteld.

Detail van de thermistorcryoscoop (stand van monsterbuis ten opzichte van de thermistor en roerstaaf).



Alle afmetingen in mm

Verwijder, wanneer de meting tot voldoening is uitgevoerd, de buis, spoel met water, droog de thermistorsonde en roerstaaf dan van onder naar boven met zacht, schoon en niet pluizend papier en voer een duplobepaling uit met een volgende hoeveelheid van het monster melk.

Als het verschil tussen de geconstateerde vriespunten groter is dan de vastgelegde herhaalbaarheidswaarde (0,004 °C), voer dan een duplobepaling uit met een nieuw proefmonster. Als het verschil tussen die twee bepalingen niet groter is dan 0,004 °C, moeten de betrokken vriespuntwaarden worden genoteerd en worden gebruikt voor de berekening van het eindresultaat.

#### 7.4. Koelen van de sonde

Zet na gebruik van het instrument een lege monsterbuis in de monsterhouder en laat het meetgedeelte zakken om de sonde koel te houden. (Bij bepaalde uitvoeringen van de cryoscoop kan dit wellicht niet; het is in zulke gevallen van belang ervoor te zorgen dat de sonde voldoende gekoeld is vóór het uitvoeren van metingen, bij voorbeeld door verscheidene dummybepalingen uit te voeren tot conforme afleeswaarden worden verkregen.)

### 8. Weergave van de resultaten

#### 8.1. Berekening

Bereken het gemiddelde van de vriespuntwaarden verkregen uit goede duplobepalingen afgerond op de derde decimaal, als uit de routinecontrole van de ijking is gebleken dat deze goed was.

Als de som van twee goede duplowaarden een oneven getal is, moet het gemiddelde worden afgerond op de naastliggende even waarde volgens het voorbeeld hieronder:

Vriespunt (°C)

Duplowaarden		Gemiddelde
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

8.2. Herhaalbaarheid (r) : 0,004 °C  
 Reproduceerbaarheid (R) : 0,006 °C.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

le Minister van Landbouw,  
 A. BOURGEOIS

### Bijlage 10 : Onderzoek naar de zichtbare zuiverheid — Filtratatieproef

#### 1. Principe

Ter vaststelling van de zichtbare zuiverheid wordt een filtratieproef uitgevoerd. Hierbij wordt een bepaald volume melk met een apparaat gefiltreerd door een wattenschijfje.

#### 2. Materiaal

##### 2.1. Apparatuur

Het filtreerapparaat moet goedgekeurd zijn door het Ministerie van Landbouw.

##### 2.2. Wattenschijfjes

- wattenschijfjes die voldoen aan de door het Ministerie van Landbouw vastgestelde kwaliteit.
- standaardwattenschijfjes met ondermeer een bezinksel van 0,25 US.

#### 3. Uitvoering

Ongeveer 40 ml melk wordt ononderbroken met het apparaat door het wattenschijfje gezogen of geperst en wel door een cirkelvormig oppervlak met middellijn van 6,4 mm.

In afwijking op het bovenstaande kan de filtratieproef eveneens uitgevoerd worden op monsters van ongeveer 200 ml of ongeveer 250 ml melk. Het oppervlak waardoor gefiltreerd wordt zal in dit geval een middellijn hebben van respectievelijk 14 en 16 mm.

Na filtratie worden de schijfjes gedroogd. Hierbij dient verbruining door hitte vermeden te worden.

#### 4. Beoordeling

De beoordeling gebeurt op droge schijfjes. De klassifikatie gebeurt door vergelijking met standaardschijfjes.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
 A. BOURGEOIS

## Bijlage 11 : Opsporen van resten van oxyderende ontsmettingsmiddelen

## 1. Principe

Door inwerking van oxidatiemiddelen op kaliumjodide in zuur milieu ontstaat vrij jood, dat na toevoeging van een zetmeeloplossing blauw kleurt.

## 2. Reagentia

De produkten moeten van « pro analyse » kwaliteit zijn. Het water gedemineraliseerd.

## 2.1. Zoutzuur 36 — 38 % (vrij van chloor)

Bewaren in het donker.

## 2.2. Zetmeeloplossing 2 %

De oplossing kan gedurende één week in de koelkast bewaard worden. Bij voorkeur zetmeel volgens Zulkowsky gebruiken.

## 2.3. Kaliumjodide-oplossing 10 %

De oplossing dient de dag van de uitvoering van de proef vers bereid te worden en in het donker bewaard.

## 2.4. Standaardoplossing chloramine T

— Bereiding van oplossing A

Weeg 0,1 g chloramine T p.a. ( $C_2H_4ClNNaO_2 \cdot 3H_2O$ ). Breng in een maatkolf van 50 ml en voeg gedemineraliseerd water toe, tot aan de merkstreep. Meng goed. Deze oplossing, bewaard bij 4 °C, kan ten hoogste gedurende 1 week gebruikt worden.

— Bereiding van oplossing B

Pipetteer 3 ml van de oplossing A en voeg 17 ml melk toe.

Gebruik bij voorkeur rauwe melk van verschillende hoeveelheden, die geen enkele verkleuring vertoont bij de volgens 4. uitgevoerde bepaling. Meng goed. Deze oplossing wordt als standaard gebruikt en is ekwivalent met 20 ppm actief chloor. Deze oplossing kan maximaal 3 dagen gebruikt worden en moet koel en in het donker bewaard worden.

## 3. Uitrusting

## 3.1. Proefbuizen

## 3.2. Pipetten van 1 ml, verdeeld in 0,1 ml.

Het glaswerk dient goed gereinigd en droog te zijn.

## 4. Uitvoering

Zorg ervoor dat bij de onder 4.1. t.e.m. 4.4. genoemde handelingen de wand van de proefbuis boven het vloeistof-oppervlak zo weinig mogelijk bevochtigd wordt, teneinde vals positieve reacties te vermijden.

4.1. Pipetteer 1 ml van de te onderzoeken melk onderaan in een proefbuis. Pipetteer op dezelfde wijze 1 ml van de chloramine T-standaard (oplossing B) in een andere proefbuis.

4.2. Voeg 0,1 ml van de kaliumjodideoplossing en 0,1 ml van de zetmeeloplossing toe aan de proefbuizen. Meng goed.

4.3. Voeg aan iedere proefbuis 1 ml zoutzuur toe zonder dat dit met de wand van de buis in aanraking komt.

4.4. Meng de inhoud van de buizen onmiddellijk na toevoeging van het zoutzuur.

4.5. Beoordeel de kleur na 3 minuten.

Beoordeel de reactie van het monster positief wanneer de kleurintensiteit van het reactiemengsel van het monster gelijk is aan, of sterker is dan die van de standaard.

4.6. Indien bij het routineonderzoek een monster een positieve reactie geeft, wordt de proef op het monster herhaald. Indien de reactie weer als positief wordt beoordeeld, worden resten van een ontsmettingsmiddel aanwezig geacht.

Opmerking: — de tijd van 3 minuten, nodig voor de kleurontwikkeling, dient gerespecteerd te worden

— in routine is het aangewezen om de analyses in kleine series af te werken.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,

A. BOURGEOIS

## Bijlage 12 : Bepaling van het vetgehalte

## 1. Principe

Een ammoniak- en ethanolhoudende oplossing van een te onderzoeken hoeveelheid monster wordt geëxtraheerd met diethylether en petroleumether, de oplosmiddelen worden door distillatie of verdamping verwijderd, en de massa van het geëxtraheerde, in petroleumether oplosbare materiaal wordt bepaald.

(De werkwijze staat bekend als de Röse-Gottlieb-methode).

## 2. Reagentia

Alle reagentia dienen van erkende analysekwaliteit te zijn en mogen geen merkbaar residu achterlaten bij een blancoproef.

Om de kwaliteit van de reagentia te testen, wordt een bepaling uitgevoerd volgens 4.3. Gebruik een gewogen lege fles, beker of metalen schaal, voorbehandeld volgens 4.4, als tarra (om te kunnen corrigeren voor het effect van wijzigingen in de atmosferische omstandigheden op de uitkomst van de weging). Als het residu, gecorrigeerd voor de schijnbare verandering in de massa van de tarra, groter is dan 2,5 mg, bepaal dan het residu van de oplosmiddelen afzonderlijk door verdamping van respectievelijk 100 ml diethylether en 100 ml petroleumether. Gebruik ook in dit geval een tarra. Als het residu groter is dan 2,5 mg, zuiver dan het oplosmiddel door distillatie of vervang het oplosmiddel.

2.1. Ammoniakoplossing, met ongeveer 25 % (m/m) NH<sub>3</sub>. Een meer geconcentreerde ammoniakoplossing mag ook worden gebruikt.

2.2. Ethanol, ten minste 94 % (v/v). Met methanol gedenatureerde ethanol mag gebruikt worden, mits vaststaat dat het resultaat van de bepaling niet wordt beïnvloed.

## 2.3. Congo- of cresol-roodoplossing

Los 1 g congorood of cresolrood op in water en verdun tot 100 ml.

## Opmerking

Hef gebruik van deze oplossing, waardoor de grens tussen oplosmiddel en waterlaag beter zichtbaar is, is facultatief. Andere waterige oplossingen van kleurstoffen mogen worden gebruikt, mits zij het resultaat van de bepaling niet beïnvloeden.

2.4. Diethylether, vrij van peroxide en met niet meer dan 2 mg/kg anti-oxydanten, die voldoet aan de eisen bij de blancoproef.

2.5. Petroleumether, met een kooktraject tussen 30 en 60 °C.

2.6. Gemengd oplosmiddel, kort voor gebruik bereid door gelijke volumina diethylether en petroleumether te mengen.

## 3. Apparatuur en glaswerk

## Waarschuwing

Daar de bepaling wordt uitgevoerd met vluchtige brandbare oplosmiddelen, moet alle te gebruiken elektrische apparatuur voldoen aan de wetgeving met betrekking tot het gebruik van dergelijke oplosmiddelen.

Gebruikelijke laboratoriumapparatuur, en in het bijzonder :

## 3.1. Analytische balans

3.2. Centrifuge, waarin op de vetextractiekolven of -buizen door een toerental van 500 tot 600 omwentelingen per minuut een versnelling kan worden uitgeoefend van 80 tot 90 g aan het ondereind van die kolven of buizen.

## Opmerking

Het gebruik van een centrifuge is facultatief.

3.3. Distillatie- of verdampingsapparatuur, om de oplosmiddelen en de ethanol uit de kolven te kunnen afdistilleren of te kunnen verdampen uit bekers en schalen bij een temperatuur lager dan 100 °C.

3.4. Stoof, elektrisch verwarmd, met geheel geopende ventilatie-openingen, die kunnen worden geregeld op een temperatuur van 102 ± 2 °C in de te gebruiken ruimte. De stoof moet voorzien zijn van een passende thermometer.

3.5. Waterbad, waarin een temperatuur van 35-40 °C kan worden gehandhaafd.

## 3.6. Vetextractiebuizen volgens Mojonnier

## Opmerking

Het is ook mogelijk vetextractiebuizen met sifon- of wasflesinzetten te gebruiken, maar de werkwijze is dan anders en wordt nader omschreven in punt 6.

De extractiebuizen dienen voorzien te zijn van ingeslepen glazen stoppen of kurken van goede kwaliteit of andere stoppen die niet door de te gebruiken reagentia worden aangetast. Kurken moeten na extractie met diethylether gedurende minstens 15 minuten in water van 60 °C of meer worden gelegd, en daarna in water afgekoeld, zodat ze bij gebruik verzadigd zijn.

## 3.7. Rek, voor de vetextractiebuizen.

3.8. Wasfles, geschikt voor gebruik met het gemengde oplosmiddel. Er mag geen plasticfles worden gebruikt.

3.9. Vetrecipiënten, bijvoorbeeld platbodemkolven, of erlenmeyers met een inhoud van 125-150 ml, of metalen schalen. Bij gebruik van metalen schalen heeft roestvrij staal de voorkeur, met vlakke bodem, liefst met een tuit, en een diameter van 80 tot 100 mm en een hoogte van ongeveer 50 mm.

3.10. Kooksteentjes, vetvrij, van een niet-poreus porselein of siliciumcarbide of glasparels (facultatief in het geval van metalen schalen).

3.11. Maatcilinders, met 5 en 25 ml inhoud.

3.12. Pipetten, met maatverdeling, van 10 ml inhoud.

3.13. Tang, van metaal, voor het vasthouden van kolven, bekers of schalen.

#### 4. Werkwijze

##### 4.1. Voorbehandeling van het monster

Breng de temperatuur van het laboratoriummonster gedurende 15 minuten op ongeveer 35-40 °C, zonodig op een waterbad. Meng het monster goed, maar voorzichtig, door de monsterfles herhaaldelijk om te keren zonder dat schuimen of verafscheiding optreedt, en koel snel af tot ongeveer 20 °C.

##### 4.2. Te onderzoeken hoeveelheid

Meng het monster (4.1) door de fles 3 of 4 keer voorzichtig om te keren en weeg onmiddellijk op 1 mg nauwkeurig 10 tot 11 gram van het monster af, via een directe weging of een verschilweging, in één van de extractiebuisen.

De te onderzoeken hoeveelheid moet zo volledig mogelijk in het onderste gedeelte van de extractiebuis worden gebracht.

##### 4.3. Blancobepaling

Voer tegelijk met de bepaling een blancobepaling uit volgens dezelfde werkwijze en met dezelfde reagentia, waarbij de te onderzoeken hoeveelheid monster vervangen wordt door 10 tot 11 ml water.

De schijnbare verandering in de massa van de vetrecipiënt mag na correctie voor de schijnbare massa-verandering van de controlerecipiënt niet groter zijn dan 2,5 mg.

##### 4.4. Voorbehandeling van de vetrecipiënt

Droog een recipiënt en tegelijk een paar kooksteentjes om het zachte koken tijdens de daarna volgende verwijdering van oplosmiddel te bevorderen, gedurende 1 uur in de stoof. Laat de recipiënt afkoelen (niet in de exsiccator, maar wel in een stofvrije omgeving) tot de temperatuur van de weegkamer (glazen recipiënten ten minste 1 uur, metalen schalen ten minste 0,5 uur). Gebruik, om temperatuurveranderingen te vermijden, een tang om de recipiënt op de balans te plaatsen en weeg op 0,1 mg nauwkeurig.

##### 4.5. Bepaling

4.5.1. Voeg 2 ml van de ammoniak-oplossing toe of een equivalent volume van een meer geconcentreerde ammoniak-oplossing en meng grondig met de te onderzoeken hoeveelheid in het onderste gedeelte van de extractiebuis. Voer na toevoeging van de ammoniak de bepaling zonder onderbreking uit.

4.5.2. Voeg 10 ml ethanol toe en meng grondig, maar voorzichtig, door de inhoud van de extractiebuis tussen het onderste en middelste deel van de extractiebuis heen en weer te laten vloeien; zorg ervoor dat de vloeistof niet te dicht bij de hals van de extractiebuis komt. Voeg desgewenst 2 druppels van de congo- of cresol-roodoplossing toe.

4.5.3. Voeg 25 ml diethylether toe, sluit de extractiebuis met een met water verzadigde kurk of een met water bevochtigde stop en schud gedurende 1 minuut de extractiebuis krachtig, maar niet overmatig (zodat geen stabiele emulsie ontstaat), met de extractiebuis horizontaal en met het bolvormige deel omhoog. Laat regelmatig de vloeistof van het middelste deel in het bolvormige deel lopen. Koel de extractiebuis zonodig onder stromend water, verwijder dan zorgvuldig de kurk of stop en spoel deze en de hals van de extractiebuis met een weinig van het gemengde oplosmiddel, waarbij de wasfles wordt gebruikt om de spoelvloeistof in de extractiebuis te laten lopen.

4.5.4. Voeg 25 ml petroleumether toe, sluit de extractiebuis met de opnieuw (door dompelen in water) bevochtigde kurk of stop, en schud de extractiebuis gedurende 30 seconden voorzichtig op de in punt 4.5.3 beschreven manier.

4.5.5. Centrifugeer de gesloten extractiebuis gedurende 1 tot 5 minuten met 500 tot 600 omwentelingen per minuut. Laat, als geen centrifuge beschikbaar is, de gesloten extractiebuis gedurende ten minste 30 minuten in het rek staan tot de bovenste laag helder is en duidelijk afgescheiden van de waterlaag. Koel de extractiebuis zonodig onder stromend water.

4.5.6. Verwijder de kurk of stop zorgvuldig en spoel deze en de binnenzijde van de hals van de extractiebuis met een weinig gemengd oplosmiddel zo, dat de spoelvloeistof in de extractiebuis loopt.

Als het scheidingsvlak tussen de vloeistoffen lager ligt dan de basis van het smalle deel van de extractiebuis, voeg dan voorzichtig water langs de kant van de extractiebuis toe om het scheidingsvlak iets boven dat niveau te brengen, dit om het decanteren van het oplosmiddel te vergemakkelijken.

4.5.7. Houd de extractiebuis aan het onderste, bolvormige deel vast en decanteer zorgvuldig zoveel mogelijk van de bovenste vloeilaag in de voorbehandelde vetrecipiënt (4.4) met daarin enkele kooksteentjes in het geval van kolven (facultatief bij metalen schalen), en vermijd decanteren van enig deel van de waterlaag.

4.5.8. Spoel de buitenzijde van de hals van de extractiebuis met een weinig gemengd oplosmiddel, vang de spoelvloeistof in de vetrecipiënt op en zorg ervoor dat het gemengde oplosmiddel niet over de buitenkant van de extractiebuis loopt.

Desgewenst kan het oplosmiddel of een deel daarvan uit de recipiënt worden verwijderd door distillatie of verdamping zoals in punt 4.5.12 beschreven.

4.5.9. Voeg 5 ml ethanol toe aan de inhoud van de extractiebuis en spoel daarbij de binnenzijde van de hals van de buis af, en meng zoals in punt 4.5.2. beschreven.

4.5.10. Voer een tweede extractie uit door de in de punten 4.5.3. tot en met 4.5.8. beschreven handelingen te herhalen, maar gebruik slechts 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether; gebruik de ether om de binnenzijde van de hals van de extractiebuis af te spoelen. Breng zonodig het scheidingsvlak tot het midden van de vernauwing van de buis om het laatste oplosmiddel zo volledig mogelijk te kunnen decanteren.

4.5.11. Voer een derde extractie uit door nogmaals de in 4.5.3 tot en met 4.5.8 beschreven handelingen te herhalen, maar gebruik slechts 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether; gebruik de ether om de binnenzijde van de hals van de extractiebuis af te spoelen. Breng zonodig het scheidingsvlak tot het midden van de vernauwing van de buis om het laatste oplosmiddel zo volledig mogelijk te kunnen decanteren.

De derde extractie kan bij afgeroomde melk achterwege blijven.

4.5.12. Verwijder de oplosmiddelen (inclusief ethanol) zo volledig mogelijk uit de kolf door distillatie, of uit de beker of schaal door verdamping, en spoel vóór aanvang van de distillatie de binnenkant van de hals van de buis met een weinig gemengd oplosmiddel.

4.5.13. Verhit de vetrecipiënt (plaats, indien het een vetkolf betreft, de recipiënt op zijn zijde om oplosmiddel-damp te laten ontsnappen) 1 uur in de stoof. Haal de vetrecipiënt uit de stoof. Laat afkoelen (niet in een exsiccator, maar wel in een stofvrije omgeving) tot de temperatuur van de weegkamer (glazen recipiënten ten minste 1 uur, metalen schalen ten minste 0,5 uur) en weeg op 0,1 mg nauwkeurig.

Veeg de recipiënt niet vlak voor de weging af. Plaats, met name om temperatuurveranderingen te vermijden, de recipiënt met een tang op de balans.

4.5.14. Herhaal de in punt 4.5.13 beschreven handelingen tot de massa van de vetrecipiënt tussen twee opeenvolgende wegingen ten hoogste 0,5 mg toe- of afneemt. Noteer de laagste waargenomen massa als de massa van vetrecipiënt en geëxtraheerd materiaal.

4.5.15. Voeg 25 ml petroleumether toe aan de vetrecipiënt om na te gaan of het geëxtraheerde materiaal geheel oplosbaar is. Verwarm zachtjes en zwenk het oplosmiddel totdat alle vet is opgelost.

Als het geëxtraheerde materiaal geheel oplosbaar is in petroleumether, stel dan de massa van het vet vast als het verschil tussen de uiteindelijke massa van de vetrecipiënt met geëxtraheerd materiaal (4.5.14) en de oorspronkelijke massa ervan (4.4).

4.5.16. Als het geëxtraheerde materiaal niet geheel oplosbaar is in de petroleumether, of bij twijfel, extraheer dan het vet volledig uit de recipiënt door herhaald wassen met warme petroleumether.

Laat elk spoor van onoplosbaar materiaal bezinken en decanteer de petroleumether zorgvuldig zonder enig onoplosbaar materiaal mee af te gieten. Herhaal deze handeling nog 3 keer, en spoel daarbij met petroleumether de binnenkant van de bovenrand van de recipiënt.

Spoel tenslotte de bovenzijde van de recipiënt aan de buitenkant met gemengd oplosmiddel zonder dat het oplosmiddel over de buitenkant van de recipiënt verspreid wordt. Verwijder de petroleumetherdamp uit de recipiënt door die 1 uur in de stoof te verhitten, laat afkoelen en weeg op de in de punten 4.5.13 en 4.5.14 beschreven wijze.

Stel de massa vet vast als het verschil tussen de in punt 4.5.14 bepaalde massa en de hier bepaalde massa.

## 5. Weergave van resultaten

### 5.1. Berekening en formule

Bereken het vetgehalte als een massapercentage volgens :

$$V = \frac{(m1 - m2) - (m3 - m4)}{m0} \times 100$$

waarin

V = vetgehalte.

m0 = de massa in gram van de onderzochte hoeveelheid monster (4.2).

m1 = de massa in gram van de vetrecipiënt met geëxtraheerd materiaal, zoals in punt 4.5.14 bepaald.

m2 = de massa in gram van de voorbehandelde vetrecipiënt of, in het geval van onopgelost materiaal, van de vetrecipiënt met onoplosbaar residu, zoals in punt 4.5.16 bepaald.

m3 = de massa in gram van de bij de blancobepaling gebruikte vetrecipiënt (4.4) met het eventueel geëxtraheerde materiaal, zoals in punt 4.5.14 bepaald.

m4 = de massa in gram van de voorbehandelde vetrecipiënt (zie 4.4) die bij de blancobepaling (4.3) is gebruikt of, in het geval van onopgelost materiaal, van het vetverzamelvat met onoplosbaar residu, zoals in punt 4.5.16 bepaald.

Rapporteer het resultaat tot op 0,01 % nauwkeurig.

### 5.2. Precisie

#### 5.2.1. Herhaalbaarheid (r) :

— voor volle melk en gedeeltelijk afgeroomde melk : 0,02 g vet per 100 g produkt,

— voor afgeroomde melk : 0,01 g vet per 100 g produkt.

#### 5.2.2. Reproduceerbaarheid (R) :

— voor volle melk : 0,04 g vet per 100 g produkt,

— voor gedeeltelijk afgeroomde melk : 0,03 g vet per 100 g produkt,

— voor afgeroomde melk : 0,025 g vet per 100 g produkt.

## 6. Alternatieve werkwijze met vetextractiebuisen met sifon of wasflesinzetten

### 6.1. Werkwijze

6.1.1. Voorbehandeling van het monster : zie 4.1

#### 6.1.2. Te onderzoeken hoeveelheid

Ga te werk als in punt 4.2 beschreven, maar gebruik de vetextractiebuisen.

De te onderzoeken hoeveelheid moet zo volledig mogelijk in het onderste gedeelte van de extractiebuis worden gebracht.

6.1.3. Blancobepaling : zie 4.3

6.1.4. Voorbehandeling van de vetrecipiënt : zie 4.4

#### 6.1.5. Bepaling

6.1.5.1. Voeg 2 ml van de ammoniak-oplossing toe, of een equivalente hoeveelheid van een meer geconcentreerde ammoniak-oplossing, en meng grondig met de voorbehandelde te onderzoeken hoeveelheid onderin de buis. Voer na de toevoeging van de ammoniak de bepaling zonder onderbrekingen uit.

6.1.5.2. Voeg 10 ml ethanol toe en meng grondig, maar voorzichtig, onderin de buis. Voeg desgewenst 2 druppels congo-rood- of cresolroodoplossing toe.

6.1.5.3. Voeg 25 ml diethylether toe, sluit de buis met een met water verzadigde kurk of met een met water bevochtigde stop, en schud de buis krachtig, maar niet overmatig (om de vorming van stabiele emulsies te vermijden), onder herhaald omkeren gedurende 1 minuut.

Koel de buis zondig onder stromend water, verwijder dan voorzichtig de kurk of stop, en spoel die en de hals van de buis af met een weinig gemengd oplosmiddel met behulp van de wasfles om de spoelvoeistof in de buis te laten lopen.

6.1.5.4. Voeg 25 ml petroleumether toe, sluit de buis af met de opnieuw (door dompelen in water) bevochtigde kurk of stop, en schud de buis gedurende 30 seconden voorzichtig zoals in punt 6.1.5.3 beschreven.

6.1.5.5. Centrifugeer de gesloten buis gedurende 1 tot 5 minuten met 500 tot 600 omwentelingen per minuut. Als geen centrifuge beschikbaar is (zie de opmerking bij 3.2), laat de buis dan gedurende ten minste 30 minuten in het rek staan tot de bovenste laag helder is en duidelijk afgescheiden van de waterlaag. Koel de buis zondig onder stromend water.

6.1.5.6. Verwijder de kurk of stop en spoel die en de hals van de buis zo met een weinig gemengd oplosmiddel af dat de spoelvoeistof in de buis loopt.

6.1.5.7. Plaats een sifon- of een wasflesinzet in de buis en duw de lange binnenbuis van de inzet naar beneden tot de opening ongeveer 3 mm boven het scheidingsvlak tussen de lagen is. De binnenbuis van de inzet moet evenwijdig aan de as van de extractiebuis lopen.

Breng de bovenste laag voorzichtig uit de buis over in de voorbehandelde vetrecipiënt, met daarin enkele kooksteentjes in het geval van een kolf (facultatief bij metalen schalen), en vermijd het overbrengen van enig deel van de waterlaag. Spoel de uitstroomopening van de inzet met een weinig gemengd oplosmiddel, en verzamel de spoelvoeistof in de vetrecipiënt.

6.1.5.8. Maak de inzet los uit de hals van de buis, til de inzet iets op en spoel de onderzijde van de lange binnenbuis met een weinig gemengd oplosmiddel af. Laat de inzet weer in de buis zakken en breng de spoelvoeistof over in de vetrecipiënt.

Spoel de uitstroomopening van de inzet met een weinig gemengd oplosmiddel; en verzamel de spoelvoeistof in de recipiënt. Desgewenst kan het oplosmiddel of een deel ervan uit de recipiënt worden verwijderd door distillatie of verdamping zoals in punt 4.5.12 beschreven.

6.1.5.9. Maak de inzet weer los uit de hals, til de inzet iets op en voeg 5 ml ethanol aan de inhoud van de buis toe, en spoel daarmee de lange binnenbuis van de inzet af; meng zoals in punt 6.1.5.2 beschreven.

6.1.5.10. Voer een tweede extractie uit door de in de punten 6.1.5.3 tot en met 6.1.5.8 beschreven handelingen te herhalen, maar gebruik slechts 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether. Gebruik de ether om de lange binnenbuis van de inzet te spoelen, wanneer na de vorige extractie de inzet van de buis wordt losgemaakt.

6.1.5.11. Voer een derde extractie uit door nogmaals de in 6.1.5.3 tot en met 6.1.5.8 beschreven handelingen uit te voeren met 15 ml diethylether en 15 ml petroleumether, en spoel daarbij de lange binnenbuis van de inzet als in 6.1.5.10 beschreven.

De derde extractie kan bij afgeroomde melk achterwege blijven.

6.1.5.12. Ga verder te werk als in 4.5.12 tot en met 4.5.16.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

### Bijlage 13 : Bepaling van het totale stikstofgehalte in melk

#### 1. Definitie

Het stikstofgehalte van melk : het stikstofgehalte in massaprocenten uitgedrukt, en bepaald volgens de beschreven Kjeldahl-methode.

#### 2. Principe

Een afgewogen hoeveelheid van het monster melk wordt gedeutereerd met geconcentreerd zwavelzuur en kaliumsulfaat, en voorts met koper (II) sulfaat als katalysator om de stikstof in de organische verbindingen om te zetten in ammoniumsulfaat. De ammoniak wordt door toevoeging van een natriumhydroxideoplossing vrijgemaakt en dan gedistilleerd en in een boorzuoroplossing geabsorbeerd. Deze wordt met een zure oplossing getitreerd.

#### 3. Reagentia

3.1. Kaliumsulfaat (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

3.2. Kopersulfaatoplossing.

Los 5,0 gram koper(II)sulfaatpentahydraat (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) op in water en verdun tot 100 ml (bij 20 °C) in een maatkolf.

3.3. Zwavelzuur, ten minste 98,0 % (m/m), (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

3.4. Natriumhydroxide-oplossing, 47 % (m/m), 704 g NaOH/l (20 °C)

#### Opmerking

Er kan een minder geconcentreerde natriumhydroxide-oplossing worden gebruikt, bijvoorbeeld : 40 % (m/m), 572 g/l, 20 °C; of 30 % (m/m), 399 g/l, 20 °C.

#### 3.5. Boorzuoroplossing

Los 40 g boorzuur (H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>) op in 1 liter warm water, laat afkoelen, en bewaar deze oplossing in een borosilicaatglazen fles.



## 3.6. Indicatoroplossing

Los 0,01 g methyloord, 0,02 g broomthymolblauw en 0,06 g broomcresolgroen op in 100 ml ethanol. Bewaar de oplossing in een bruine glazen fles op een koele donkere plaats.

3.7. Gestelde zure titreervloeistof, c (1/2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) of c (HCL) = 0,1 mol/l, gesteld op 0,0001 mol/l nauwkeurig.

3.8. Stikstofvrije saccharose

3.9. Ammoniumzout, zuiver, in de vorm van ammoniumoxalaat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O of ammoniumsulfaat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

3.10. Tryptofaan (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fenacetine (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) of lysine-monohydrochloride (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.HCL) of lysine-dihydrochloride (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.2HCL).

## Opmerking

De zuiverheid van de reagentia in 3.9 en 3.10 moet van betere kwaliteit zijn dan « analysekwaliteit ». Indien beschikbaar, moet een gecertificeerde ammoniumzoutoplossing (3.9) worden gebruikt.

## 4. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting, in het bijzonder :

4.1. Kjeldahlkolven van 500 ml.

4.2. Geschikte kooksteentjes, bijvoorbeeld glasparsels met een diameter van ongeveer 5 mm, Hengar-korrels of puimsteen.

4.3. Buret of automatische pipet, voor het doseren van 1,0 ml.

4.4. Maatcilinders met schaalverdeling, van glas, met een volume van 50, 100 en 250 ml.

4.5. Destructie-apparaat, in schuine stand (ongeveer 45 °C), met elektrische verwarming of gasbranders waarmee de kolven niet boven het vloeistofoppervlak worden verhit en dat voorzien is van een dampafzuig-systeem.

4.6. Distillatie-apparaat, van borosilicaatglas, waaraan een Kjeldahlkolf kan worden bevestigd, bestaande uit een goed werkende spatbol bevestigd aan een goed werkende koeler met een rechte binnenbuis, waarvan de uitstroomopening aan de onderzijde zit; de verbindingsslangen en stop(pen), bij voorkeur van neopreenrubber, dienen goed te sluiten.

4.7. Pipet of automatische pipet, voor het doseren van 0,10 ml.

4.8. Erlenmeyers, van 500 ml en met een maatstreep op 200 ml.

4.9. Buret, van 50 ml, met een maatverdeling van 0,1 ml, en een maximale fout van ± 0,05 ml.

4.10. Vergrootglas, om de buret af te lezen.

4.11. pH-meter

4.12. Automatische buret

## 5. Werkwijze

5.1. Doe in de Kjeldahlkolf kooksteentjes (bijv. 3 glasparsels), 15 g kaliumsulfaat, 1,0 ml kopersulfaatoplossing, ongeveer 5 g melkmonster (tot op 0,001 g nauwkeurig afgewogen) en 25 ml zwavelzuur. Gebruik het zuur om alle kopersulfaatoplossing, kaliumsulfaat of melk van de hals van de kolf naar beneden te spoelen, en meng de inhoud van de kolf zachtjes.

## Opmerking

Gebruik als de melk meer dan 5,0 % (m/m) vet bevat 30 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> voor de destructie in plaats van 25 ml, omdat organisch materiaal bij koken zwavelzuur verbruikt. Dit dient ook bij de blancobepaling te gebeuren.

5.2. Verwarm elke Kjeldahlkolf op het destructie-apparaat, in het begin langzaam zodat al het zwarte schuim in de bol blijft. Laat heftig koken wanneer het aanvankelijke schuimen is opgehouden en ruimschoots witte dampen ontstaan (zure damp zal halverwege de hals van de kolf condenseren) tot er geen zwarte deeltjes over zijn en de vloeistof helder en licht blauwgroen van kleur is. Laat dan tenminste 1,5 uur zachtjes doorkoken. Let op de volgende eisen :

a) De vloeistof moet helder worden binnen 1 uur en de totale destructie moet langer duren dan 2,5 uur. Als meer dan 1 uur nodig is om de vloeistof helder te krijgen, dient de totale destructietijd dienovereenkomstig verlengd te worden.

b) Het toegevoegde kaliumsulfaat bevordert de destructie door het verhogen van het kookpunt van het mengsel. Als het restvolume H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aan het einde van de destructieperiode minder is dan ongeveer 15 ml kan stikstof verloren zijn gegaan door extreme verhitting. Verhit bij verwarming met gas de kolf op een plaat warmte-isolerend materiaal met een ronde opening die zo groot is dat de vrije vlam slechts dat deel van de kolf raakt, dat beneden het vloeistofoppervlak ligt.

c) Als in de hals van de kolf zwarte deeltjes komen die niet in de bol terugspoelen door het zuur dat in het begin van de periode met heftig koken terugstroomt (wat door rondraaien van de kolf kan worden vergemakkelijkt), laat de kolf dan voldoende afkoelen en was voorzichtig met zo min mogelijk water. Zet de destructie op de boven beschreven wijze voort.

5.3. Voeg 300 ml water toe (zie opmerking) aan elke afgekoelde Kjeldahl-kolf en spoel daarmee de hals van de kolf zorgvuldig; meng de inhoud grondig om de kristallen die zijn ontstaan op te lossen. Voeg wat kooksteentjes toe om gelijkmatig te laten koken. Voeg dan aan elke kolf 70 ml natriumhydroxide-oplossing toe (zie opmerking), en doe dit door langzaam gieten langs de hals van de schuingehouden kolf om onder in de bol een laag te vormen; zorg dat de bovenzijde van de hals niet door de hydroxide-oplossing wordt bevochtigd.

## Opmerking

Het is noodzakelijk dat het volume aan water en natriumhydroxide-oplossing in totaal 370 ml bedraagt, omdat dan ongeveer 150 ml distillaat kan worden opgevangen net voordat onregelmatig koken (stoten) gaat optreden (5.4). Als een groter equivalent volume van een minder geconcentreerde natriumhydroxide-oplossing dan 47 % (m/m) is toegevoegd, moet dus het volume water dienovereenkomstig worden verkleind. Als bijvoorbeeld 85 ml 40 % (m/m) of 125 ml 30 % (m/m) natriumhydroxide-oplossing wordt toegevoegd, moet het volume water 285 ml respectievelijk 245 ml bedragen.

5.4. Bevestig elke Kjeldahlkolf onmiddellijk aan een distillatie-apparaat. Zorg ervoor dat het uiteinde van de afvoerbuis van de koeler zich onder het oppervlak bevindt van de 50 ml boorzuoroplossing met 0,20 ml (5-6 druppels) indicatoroplossing en de erlenmeyer. Schud de inhoud van elke Kjeldahlkolf om grondig te mengen en kook in het begin langzaam om overmatig schuimen te voorkomen. Laat als 100 tot 125 ml distillaat is opgevangen elke erlenmeyer zakken tot het uiteinde van de afvoerbuis van de koeler zich ongeveer 40 mm boven het merkteken van 200 ml bevindt. Zet de distillatie voor elke kolf voort totdat onregelmatig koken (stoten) begint en stop dan onmiddellijk met verhitten. Maak elke Kjeldahlkolf los en spoel het uiteinde van de afvoerbuis van elke koeler af met wat water, en vang het spoelwater op in de erlenmeyer. Let op de volgende eisen:

a) De distillatiesnelheid moet zo zijn dat ongeveer 150 ml distillaat is opgevangen wanneer de inhoud onregelmatig begint te koken (stoten); het volume in elke erlenmeyer zal dan ongeveer 200 ml bedragen.

b) De capaciteit van elke koeler dient zodanig te zijn dat de temperatuur van de inhoud van elke erlenmeyer tijdens de distillatie niet boven 25 °C uitkomt.

5.5. Titreer elk distillaat met de gestelde titreervloeistof tot de pH  $4,6 \pm 0,1$  is; gebruik daarbij een pH-meter en desgewenst een automatische buret. Toevoeging van een indicator maakt het gemakkelijker om te controleren of de titrering goed verloopt. Lees elke buret op 0,01 ml nauwkeurig af met behulp van een vergrootglas en vermijd parallaxfouten.

De titrering kan middels een enkele indicator geschieden. Titreren totdat de kleur van het distillaat overeenkomt met dat van een kort te voren toe bereide oplossing op basis van 150 ml water waaraan 50 ml van de boorzuoroplossing van de indicator in een erlenmeyer is toegevoegd.

5.6. Voer een blancobepaling uit volgens de punten 5.1 tot en met 5.5, waarbij 5 ml gedistilleerd water met ongeveer 0,1 g saccharose in onderzoek wordt genomen in plaats van het monster melk.

#### Opmerking

Voor de titrering van het blancodistillaat is slechts een zeer kleine hoeveelheid van de gestelde titreervloeistof nodig.

5.7. Controleer regelmatig de nauwkeurigheid van de werkwijze door twee « recovery »-proeven volgens de werkwijze overeenkomstig de punten 5.1 tot en met 5.5 uit te voeren.

5.7.1. Controleer of er geen verlies optreedt ten gevolge van overmatige verhitting of mechanische lekken bij de distillatie door een hoeveelheid van 0,15 g ammoniumoxalaat of -sulfaat, tot op 0,001 g nauwkeurig afgewogen, en 0,1 g saccharose te onderzoeken.

Het teruggevonden stikstofpercentage moet tussen 99,0 en 100,0 % liggen.

Lagere of hogere resultaten duiden op fouten in de werkwijze en/of een onnauwkeurige waarde voor de concentratie van de titreervloeistof.

5.7.2. Controleer of de destructieprocedure voldoende is om alle eiwitstikstof vrij te maken, door een hoeveelheid van 0,20 g zuiver tryptofaan, 0,35 g fenacetine of 0,20 g lysine-hydrochloride te onderzoeken. Alle stoffen moeten tot op 0,001 g nauwkeurig worden afgewogen. Ten minste 98-99 % van de stikstof moet worden teruggevonden.

## 6. Veiligheidsmaatregelen

Draag bij het werken met geconcentreerd zwavelzuur en natriumhydroxide en bij het hanteren van Kjeldahlkolven altijd een laboratoriumjas, veiligheidsbril en zuurbestendige handschoenen.

Laat tijdens de distillatie de Kjeldahlkolven nooit onbewaakt. Stop, vanwege het mogelijke gevaar, de distillatie onmiddellijk als de kolfinhoud te heftig « opspat ». Plaats, als de stroom langer dan 2-3 minuten uitvalt, de opvangkolf zodanig, dat het uiteinde van de koeler boven de vloeistof hangt.

## 7. Weergave van de resultaten

### 7.1. Stikstofberekening en formule

Bereken het stikstofgehalte (S), uitgedrukt in grammen stikstof per 100 g produkt, volgens:

$$s = \frac{1,40 (V - V_0) c}{m}$$

waarin

s = het stikstofgehalte

V = het volume in milliliter van de bij de bepaling gebruikte gestelde zure titreervloeistof

V<sub>0</sub> = het volume in milliliter van de gestelde zure titreervloeistof bij de blancobepaling

c = de concentratie in mol per liter van de gestelde zure titreervloeistof

m = de massa in gram van de te onderzoeken hoeveelheid.

Rond het resultaat af tot op 0,001 g per 100 g.

### 7.2. Precisie

Herhaalbaarheid (r) : 0,007 g per 100 g

Reproduceerbaarheid (R) : 0,015 g per 100 g.

## 8. Gewijzigde werkwijzen

8.1. Gebruik een destructieblok met destructiebuisen in plaats van het destructie-apparaat en de Kjeldahlkolven. In dit geval dient elke plaats apart te worden gecontroleerd om mogelijke problemen te kunnen constateren (5.7).

8.2. Het gebruik van stoomdistillatie in plaats van directe verwarming van de kolven (5.4). Wanneer in het apparaat geen gedistilleerd water mag worden gebruikt, moet erop worden gelet dat het water geen vluchtige zuren of basische stoffen bevat.

8.3. Een hoeveelheid van 1 g melk (semi-macro Kjeldahl-bepaling) kan worden onderzocht in plaats van 5 g (5.1) mits :

- de hoeveelheden van de reagentie voor destructie (5.1),  $H_2SO_4$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $K_2SO_4$ , in dezelfde verhouding (1/5) worden verminderd.
- de totale destructietijd (5.2), wordt verkort tot 75 minuten.
- de hoeveelheid natriumhydroxide-oplossing (5.3) in dezelfde verhouding (1/5) wordt verminderd.
- een gestelde zure titreervloeistof van een lagere concentratie (0,02 tot 0,03 mol/l) wordt gebruikt.

**Opmerking**

Gebruik van één of meer van deze keuzemogelijkheden is slechts toegestaan als de waarde voor de herhaalbaarheid (7.2) en de resultaten van de beide nauwkeurigheidsprouven (5.7) in overeenstemming zijn met de in deze methode gestelde eisen.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

**Bijlage 14 : Bepaling van vet- en eiwitgehalte door midden infrarood spectrometrie**

**1. Principe**

Het vet en eiwit bevatten elk specifieke chemische bindingen die bij bepaalde golflengten licht absorberen in het middeninfrarood spectrum. De elektromagnetische absorptie gemeten op deze golflengten laat de kwantitatieve bepaling van vet en eiwit in de melk toe. De wederzijdse beïnvloeding van de absorptie door de melkbestanddelen vet, eiwit en lactose wordt gecompenseerd met behulp van intercorrectiefactoren.

**2. Reagentia**

Voor de uitvoering van de midden-infrarood spectrometrie zijn geen reactieven nodig.

**3. Apparatuur**

**3.1. Midden-infrarood spectrofotometer**

Voor de uitvoering van de midden-infrarood spectrometrie kan gebruik gemaakt worden van apparatuur met volgende filters :

- 3,5  $\mu m$  (B-filter) of 5,7  $\mu m$  (A-filter) voor het vet;
  - 6,5  $\mu m$  voor het eiwit;
  - 9,6  $\mu m$  voor het lactose (enkel nodig voor de intercorrectie).
- 3.2. Waterbad met circulatie, instelbaar op 40 °C (precisie  $\pm 2$  °C)**

**4. Werkwijze**

**4.1. Voorbereiding van het monster**

De te analyseren monsters worden voor de analyse in een waterbad opgewarmd tot  $40 \pm 2$  °C en nadien zorgvuldig homogeen gemaakt. Na de voorbehandeling dienen de monsters ontleed te zijn binnen een tijdspanne van 15 minuten.

**4.2. Opstarten van de midden-infrarood spectrofotometer**

Vooraleer met de analyses gestart wordt, worden de leidingen en cuvet gereinigd met een detergent-oplossing. Nadien wordt de nulpuntsinstelling gecontroleerd met gedistilleerd water en eventueel bijgesteld. Vervolgens wordt het toestel geïjkt met het ijkmonster volle melk en met een monster afgeroomde melk.

Bovenstaande handelingen dienen te worden uitgevoerd overeenkomstig de specificaties opgesteld door de constructeur van het toestel.

**4.3. Uitvoering van de analyses**

Na het opstarten van het apparaat kan met de analyses gestart worden. Bij doorlopende analyses wordt het apparaat tenminste om de 50 monsters opnieuw gecontroleerd met het ijkmonster. De interpretatie van de resultaten voor de ijkmonsters dient te gebeuren volgens de meest recente IDF 141 norm.

Indien de resultaten voor de ijkmonster(s) afwijken volgens hogervermelde norm, wordt de oorzaak onmiddellijk opgespoord en moet het probleem opgelost worden vooraleer de analyses hervat worden.

Elke afzonderlijke portie van het ijkmonster wordt slechts één maal gebruikt.

Minimaal om de 400 monsters dient de nulpuntstelling te worden gecontroleerd eventueel gevolgd door een reiniging van de leidingen en cuvet met een detergent-oplossing.

Bovenstaande handelingen dienen te worden uitgevoerd overeenkomstig de specificaties opgesteld door de constructeur van het toestel.

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

e Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

## Bijlage 15 : Bepaling van de volumieke massa

## 1. Definitie

De volumieke massa van melk is de verhouding van de massa van een bepaald volume melk bij 20 °C ten opzichte van de massa van hetzelfde volume water bij 20 °C.

## 2. Principe

De volumieke massa bij 20 °C wordt bepaald met een areometer.

## 3. Apparatuur en glaswerk

Gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder :

## 3.1. Areometer

De dichtheidsareometer is een instrument met een glazen drijflichaam dat aan de onderzijde breed en zwaaft is. Aan de bovenkant van het drijflichaam zit in het verlengde van de as een cilindervormige glazen buis; de bovenkant van de glazen buis is dicht.

Het glazen drijflichaam bevat de verzwarende (lood, kwik, e.d.) om de massa van de areometer in te stellen. De staaf heeft een schaalverdeling van 1,025 tot 1,035 g/ml.

De areometer moet volgens een pyknometrische methode worden gecontroleerd met een pyknometer van ongeveer 100 ml die is voorzien van een precisethermometer.

## 3.2. Cilinders (glas of roestvrij staal)

De minimumafmetingen moeten zijn :

— inwendige diameter ongeveer 35 mm

— inwendige hoogte ongeveer 225 mm.

## 3.3. Waterbad, instelbaar op 20 ± 0,1 °C

## 3.4. Waterbad, instelbaar op 40 ± 2 °C

## 3.5. Thermometer met schaalverdeling van 0,5 °C.

## 4. Werkwijze

4.1. Meng het monster door omkeren om het vet te dispergeren en plaats het in het waterbad (3.4). Wacht tot het monster een temperatuur van 40 °C heeft bereikt en laat het dan nog vijf minuten bij deze temperatuur staan. Meng goed door omkeren om ervoor te zorgen dat het vet homogeen verdeeld is. Koel in het tweede waterbad (3.3) af tot 20 °C.

4.2. Meng het monster goed door voorzichtig omkeren om luchtballen te vermijden. Giet de melk in de cilinder, die schuin wordt gehouden om vorming van schuim of ballen te vermijden. Gebruik zoveel van het melkmonster dat een gedeelte daarvan over de rand van de cilinder zal lopen als de areometer erin wordt geplaatst. Laat de areometer voorzichtig in de melk zakken en laat hem vrij drijven als hij zijn evenwichtspositie heeft bereikt. De cilinder moet verticaal zijn opgesteld. De areometer moet in het midden van de vloeistofkolom zijn geplaatst en mag de rand van de cilinder niet raken.

4.3. Lees de schaalverdeling aan de bovenkant van de meniscus af, wanneer de areometer in evenwicht is gekomen.

4.4. Breng de thermometer onmiddellijk na aflezing van de areometer in het monster en lees de temperatuur af met een nauwkeurigheid van 0,5 °C. De temperatuur mag niet meer dan ± 2 °C verschillen van 20 °C.

## 5. Temperatuurcorrectie

Als de temperatuur van de melk bij de meting van de volumieke massa niet exact 20 °C is, moet het verkregen resultaat worden gecorrigeerd door bij de bepaalde volumieke massa 0,0002 op te tellen voor elke graad Celsius boven 20 °C of 0,0002 af te trekken voor elke graad Celsius onder 20 °C. Deze correctie is alleen geldig als de temperatuur van het melkmonster niet meer dan 5 °C verschilt van 20 °C.

## 6. Weergave van de resultaten

Bereken de volumieke massa van het monster, uitgedrukt in g/ml afgeroomde melk bij 20 °C, volgens :

$$\frac{1000 \text{ vm} - \text{VG} \cdot \text{vm}}{1000 - \frac{\text{VG} \cdot \text{vm}}{0,92}} = \frac{0,92 \text{ vm} (1000 - \text{VG})}{920 - \text{VG} \cdot \text{vm}}$$

waarin

vm = de op de areometer (4.4) in g/l afgelezen volumieke massa van het monster;

VG = het vetgehalte van het monster in g/l;

0,92 = de vetdichtheid.

## 7. Precisie

7.1. Herhaalbaarheid (r) : 0,0003 g/ml

7.2. Reproduceerbaarheid (R) : 0,0015 g/ml

Gezien om te worden gevoegd bij het ministerieel besluit van 14 oktober 1994.

De Minister van Landbouw,  
A. BOURGEOIS

**Annexes à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994 fixant les méthodes d'analyse  
pour la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs**

**Annexe 1 : Dénomination des micro-organismes — Comptage sur plaque à 30 °C**

**1. Définition**

Par « micro-organismes », on entend tous les organismes formant des colonies comptables après une incubation en aérobiose dans les conditions opératoires décrites.

**2. Principe**

Mélanger un volume déterminé d'échantillon de lait au milieu de culture dans les boîtes de Petri et laisser incuber à 30 °C pendant 72 heures. Compter les colonies et calculer le nombre de micro-organismes par millilitre de lait cru ou pasteurisé ou par 0,1 millilitre de lait stérilisé ou UHT préincubé.

**3. Appareillage et verrerie**

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

**3.1. Appareillage**

- Four à air chaud, réglable à 170-175 °C
- Autoclave, réglable à 121 °C
- Etuve, réglable à 30 ± 1 °C
- pH-mètre, avec correction de température, sensible à 0,1 unité de pH près
- Bain d'eau réglable à 45 ± 1 °C
- Loupe de grossissement 2-4x
- Loupe de grossissement 8-10x
- Compteur enregistreur
- Agitateur capable de mélanger 1 ml de l'échantillon de lait ou d'une dilution décimale avec 9 ml de diluant et dont le principe de fonctionnement est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu du tube à essai.

**3.2. Verrerie**

- Tubes à essai avec bouchons appropriés et de capacité adéquate pour contenir, avec un espace suffisant permettant une agitation convenable, 10 ml de la première dilution ou des dilutions décimales suivantes.
- Fioles de 150 à 250 ml de capacité ou tubes de 20 ml de capacité environ pour contenir le milieu de culture.
- Pipettes (bouchées avec du coton) en verre ou en matériau synthétique stérile, non ébréchées, de 1 ml de capacité nominale, avec un orifice d'écoulement de 1,75 à 3 mm de diamètre.
- Boîtes de Petri en verre ou en matériau synthétique stérile transparent incolore, le fond des boîtes ayant un diamètre intérieur d'environ 90-100 mm. La profondeur intérieure doit être d'au moins 10 mm. Le fond ne doit présenter aucune irrégularité susceptible de gêner le comptage des colonies.
- Stérilisation de la verrerie

La verrerie doit être stérilisée par l'une des méthodes suivantes :

- a) au four à air chaud, à une température de 170 à 175 °C pendant 1 heure au moins;
- b) à l'autoclave, à une température de 121 ± 1 °C pendant 20 minutes au moins.

Dans l'autoclave, toute précaution doit être prise pour assurer une pénétration adéquate de la vapeur; si le matériel est stérilisé dans des récipients, ceux-ci ne doivent pas être fermés hermétiquement, les bouchons ou les couvercles des fioles doivent être desserrés.

Faire sécher la verrerie stérilisée à l'autoclave afin d'éliminer la vapeur.

Les pipettes doivent être stérilisées au four à air chaud.

**4. Milieu de culture — Comptage des germes du lait sur plaque de gélose**

**4.1. Composition**

- Extrait de levure : 2,5 g
- Tryptone : 5,0 g
- D(+) Glucose ou dextrose : 1,0 g
- Poudre de lait écrémé : 1,0 g
- Agar-agar : 10 à 15 g suivant les propriétés gélifiantes de l'agar-agar
- Eau : 1.000 ml

La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices, ce qui sera vérifié à l'aide de tests comparatifs réalisés en utilisant une poudre de lait écrémé reconnue exempte.

**Préparation**

Mettre en suspension en dissolvant, dans l'ordre, l'extrait de levure, la tryptone, le glucose et, enfin, la poudre de lait écrémé, dans l'eau. Le chauffage de la suspension facilite l'opération. Ajouter ensuite l'agar-agar et porter à ébullition en agitant fréquemment jusqu'à dissolution complète de l'agar-agar ou chauffer à la vapeur pendant 30 minutes environ.

Filtrer sur papier filtre, si nécessaire.

Vérifier le pH à l'aide d'un pH-mètre; si nécessaire, ajuster le pH en utilisant une solution (au moins 0,1 mol/l) d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique de sorte qu'il soit, après stérilisation, de 6,9 ± 0,1 à 25 °C.

**4.2. Répartition, stérilisation et conservation du milieu de culture**

Répartir le milieu par quantités de 100 à 150 ml dans les fioles ou de 12 à 15 ml dans les tubes. Boucher les fioles et les tubes.

Stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes.

Vérifier le pH du milieu.

Si le milieu de culture n'est pas utilisé immédiatement, le conserver à l'abri de la lumière entre 1 et 5 °C pendant un mois au maximum après sa préparation.

**4.3. Milieu de culture complet déshydraté vendu dans le commerce**

Le milieu de culture peut être préparé avec un milieu de culture complet déshydraté vendu dans le commerce. Suivre les indications du fabricant, mais ajouter la poudre de lait écrémé avant la dissolution si elle n'entre pas dans la composition du produit.

Ajuster le pH à  $6,9 \pm 0,1$  à 25 °C (selon le mode décrit en 4.1) puis répartir, stériliser et stocker le milieu selon les indications données en 5.2.

**5. Diluants****5.1. Solution peptone/sel**

Composition

Peptone : 1,0 g

Chlorure de sodium (NaCl) : 8,5 g

Eau : 1.000 ml.

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Vérifier le pH avec un pH-mètre; si nécessaire, ajuster le pH en utilisant une solution (au moins 0,1 mol/l) d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique, de sorte que, après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à 25 °C.

**5.2. Répartition, stérilisation et conservation du diluant**

Répartir le diluant dans les tubes à essai en quantité telle que, après stérilisation, chaque tube contienne  $9,0 \pm 0,2$  ml de diluant. Boucher les tubes.

Stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes.

Vérifier le pH du diluant.

Si le diluant n'est pas utilisé immédiatement, le conserver à l'abri de la lumière entre 1 et 5 °C pendant un mois au maximum après sa préparation.

**5.3. Diluants complets déshydratés du commerce**

Les poudres comprimés déshydratés vendus dans le commerce peuvent servir à la préparation du diluant. Suivre les instructions du fabricant. Ajuster le pH selon le mode décrit en 5.1 et répartir, stériliser et stocker les diluants selon les indications données en 5.2.

**6. Mode opératoire****6.1. Fusion du milieu**

Avant de procéder à l'examen microbiologique, faire fondre rapidement la quantité de milieu nécessaire et refroidir le milieu à  $45 \pm 1$  °C au bain d'eau.

**6.2. Préparation de l'échantillon de lait**

Mélanger convenablement l'échantillon afin d'obtenir une répartition des micro-organismes aussi homogène que possible, en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Éviter la formation de mousse ou laisser la mousse se disperser. Le délai entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

**6.3. Préparation de la première dilution ( $10^{-1}$ )**

Transférer à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de l'échantillon de lait (6.2) dans 9 ml de diluant (5.1) en évitant tout contact entre la pipette et le diluant. La température du diluant doit être sensiblement la même que celle de l'échantillon de lait. Mélanger soigneusement cette première dilution à l'aide de l'agitateur pendant 5 à 10 secondes.

On obtient ainsi une première dilution  $10^{-1}$ .

**6.4. Préparation des dilutions décimales suivantes**

Transférer, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la première dilution (6.3) dans 9 ml de diluant (5.1) en suivant les indications données en 6.3.

On obtient ainsi une dilution  $10^{-2}$ .

Répéter ces opérations pour obtenir les dilutions décimales suivantes jusqu'à obtention du nombre adéquat de micro-organismes (7.1).

**6.5. Inoculation des boîtes de Petri**

Transférer, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de l'échantillon et/ou de la dilution décimale appropriée dans une boîte. L'analyse doit porter sur l'examen d'au moins deux dilutions. Pour chaque dilution (7.1), préparer une boîte sélectionnée comme il convient.

**6.6. Coulage du milieu**

Verser environ 15 à 18 ml de milieu (6.1) dans chaque boîte ensemencée.

Mélanger immédiatement par rotation de la boîte de Petri, afin d'obtenir une répartition régulière des colonies après incubation.

Le délai entre la fin de la préparation de l'échantillon et le mélange, selon le type de lait, de la prise d'essai ou de la dilution avec le milieu ne doit pas dépasser 15 minutes.

Laisser reposer sur une surface horizontale froide et propre jusqu'à solidification du milieu.

**6.7. Incubation des boîtes de Petri**

Placer les boîtes dans l'étuve. Incuber les boîtes retournées. Ne pas en empiler plus de six. Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher, ni être en contact avec les parois et la partie supérieure de l'étuve.

Incuber à  $30 \pm 1$  °C pendant  $72 \pm 2$  heures.

**6.8. Comptage des colonies**

Effectuer le comptage des colonies dans les boîtes de Petri ne contenant pas plus de 300 colonies.

Examiner les boîtes en lumière atténuée. Une loupe et/ou un compteur enregistreur peuvent être utilisés pour faciliter le comptage. Eviter de confondre des particules de matières précipitées avec des colonies de la taille d'une pointe d'épingle. En cas de doute, procéder à un examen minutieux en utilisant si nécessaire une loupe de grossissement supérieur, afin de distinguer les colonies des matières étrangères.

Les colonies envahissantes sont considérées comme des colonies uniques. Si les colonies envahissantes recouvrent moins d'un quart de la boîte, compter les colonies sur la partie non touchée de la boîte et calculer le nombre correspondant pour la boîte entière. Si les colonies envahissantes recouvrent plus d'un quart de la boîte, éliminer la boîte.

**7. Calcul et expression des résultats**

7.1. Utiliser les résultats des boîtes contenant entre 10 et 300 colonies (voir 7.3 et 7.4).

7.2. Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre de lait cru ou pasteurisé à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

où

$\sum C$  : est la somme totale des colonies comptées selon 7.1

$(n_1 + 0,1 n_2) d$  : est égal au volume de l'échantillon ensemencé où :

$n_1$  : est le nombre de boîtes comptées dans la première dilution,

$n_2$  : est le nombre de boîtes comptées dans la deuxième dilution,

$d$  : est le facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Le nombre est arrondi à deux chiffres significatifs. Quand le chiffre à arrondir est 5, arrondir de manière que le chiffre placé immédiatement à gauche soit pair.

Exemple (lait pasteurisé) :

Dilution  $10^{-2}$  : 278 et 290 colonies

Dilution  $10^{-3}$  : 33 et 28 colonies

$$\text{Nombre/ml} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}}$$

$$= \frac{629}{0,022}$$

$$= 28.590$$

$$= 29.000$$

$$= 2,9 \times 10^4$$

7.3. Si tous les dénombrements sont inférieurs à 10, indiquer que le nombre de micro-organismes par millilitre est « inférieur à  $10 \times d$  », «  $d$  » étant l'inverse du facteur de dilution le plus faible.

7.4. Lorsque tous les dénombrements sont supérieurs à 300 et que le comptage est possible, procéder à une estimation et la multiplier par l'inverse du facteur de dilution. Exprimer le résultat avec l'indication « nombre estimé de micro-organismes par millilitre ».

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

**Annexe 2 : Dénombrement des micro-organismes  
Comptage des colonies aérobie à 30 °C — Méthode plate-loop**

**1. Principe**

Un échantillon de lait est prélevé au moyen d'une anse de dimension appropriée et rejeté dans une boîte de Pétri avec de la solution Ringer stérile, diluée au quart. Après addition du milieu de culture et incubation à 30 °C ± 1 °C, on dénombre les colonies.

**2. Milieu de culture et diluants****2.1. Composants de base**

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai et doit être contrôlée périodiquement, en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

Des solutions d'hydroxide de sodium et d'acide chlorhydrique (environ 0,1 ml/l) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants et du milieu de culture.

Si les diluants ou le milieu de culture ne sont pas utilisés immédiatement, le conserver à l'obscurité entre 0 et 5 °C, pendant 1 mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

**2.2. Milieu de culture**

Tryptone : 5,0 g

Extrait de levure : 2,5 g

Glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O) : 1,0 g

Poudre de lait écrémé : 1,0 g

Agar, suivant les propriétés gélifiantes : 12 — 18 g

Eau : 1000 ml

pH, après stérilisation à 25 °C : 6,9 ± 0,1

La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices.

Dissoudre les composants de base ou le milieu complet dans l'eau chauffée et porter à l'ébullition en agitant fréquemment jusqu'à dissolution complète. Dans tous les cas, il est indispensable d'ajouter de la poudre de lait écrémé, même si le milieu complet déshydraté est acheté prêt à l'emploi et même si le fabricant considère cette adjonction comme superflue.

Si nécessaire, ajuster le pH à 7,0 ou 7,1 de façon à obtenir le pH requis après stérilisation.

Répartir le milieu de culture par quantités de 12 à 15 ml dans des tubes à essais ou par quantités de 100 à 150 ml dans des flacons.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

**2.3. Diluants****2.3.1. Solution peptone-sel**

Peptone : 1,0 g

Chlorure de sodium (NaCl) : 8,5 g

Eau : 1000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

**2.3.2. Solution de Ringer — diluée au quart**

Chlorure de sodium (NaCl) : 2,25 g

Chlorure de potassium (KCl) : 0,105 g

Chlorure de calcium anhydre (CaCl<sub>2</sub>) : 0,06 g

Hydrogène-carbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) : 0,05 g

Eau : 1000 ml

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

**2.3.3. Solution de peptone**

Peptone : 1,0 g

Eau : 1000 ml

Dissoudre le peptone dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

**2.3.4. Répartition et stérilisation des diluants**

Répartir le diluant dans des flacons ou des tubes à essai de façon qu'après stérilisation, chaque flacon contienne 90 ml de diluant et que chaque tube à essai contienne 9,0 ml de diluant.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C durant 15 min.

**3. Appareillage et verrerie****3.1. Appareil d'ensemencement**

L'appareil est décrit dans la figure 1. On utilise un fil en platine rhodié ou en platine-iridié de 0,4 mm de diamètre formant une anse, permettant de prélever

0,001 ml de lait (B & S mesure standard n° 28).

La boucle doit être ronde et fixée au bout d'un fil de 70 mm. Ce dernier doit avoir la forme suivante : l'anse est courbée, selon un angle de 30 °, à une distance de 3 à 4 mm de son extrémité.



L'autre extrémité du fil est courbée à plusieurs endroits. Cette partie courbée est attachée dans un support constitué par une aiguille à injection hypodermique Luer-Lok (mesure standard 13) recoupée à une longueur de 24 — 26 mm à partir de la base. La partie saillante du fil doit avoir une longueur de 12 à 14 mm.

Remarque : utiliser de préférence les anses disponibles dans le commerce. Le diamètre intérieur doit se situer entre 1,25 et 1,50 mm.

L'aiguille hypodermique Luer-Lok avec l'anse est fixée sur une seringue Cornwall. La seringue est reliée au moyen d'un tuyau en caoutchouc, à un erlenmeyer contenant la solution de Ringer stérile diluée au quart. Le diamètre interne du tuyau est de 3,0 mm.

### 3.2. Appareillage et verrerie généralement utilisés dans un laboratoire de microbiologie

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont adéquates. La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

#### 3.2.1. Appareillage

- Autoclave, réglable à  $121 \pm 1$  °C
- Four à chaleur sèche, capable de maintenir une température de 170 à 175 °C pendant 1 h.
- Etuve, capable de maintenir une température uniforme de  $30 \pm 1$  °C.
- pH-mètre avec compensation de température, précis à  $\pm 0,1$  unité pH.
- balance, précis à  $\pm 0,01$  g.
- Bain d'eau, réglable à  $45 \pm 1$  °C.
- Compteur avec lumière tamisée et loupe.
- Agitateur, capable de mélanger 1 ml de l'échantillon avec 9 ml de diluant et dont le principe est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essais (agitateur Vortex).

#### 3.2.2. Verrerie

- Flacons de capacité suffisante pour contenir les 90 ml de diluant utilisés.
- Tubes à essais de 15 à 20 ml.
- Flacons de 150 à 250 ml ou tubes à essais de 15 à 20 ml, pour contenir le milieu de culture.
- Pipettes de 1 ml graduées à 0,1 ml et pipettes de 10 ml graduées à 1 ml. Les pipettes doivent être bouchées avec du coton. L'orifice d'écoulement est de 2 à 3 mm.
- Boîtes de Pétri, en verre transparent incolore ou en plastique avec un diamètre intérieur de 85 à 100 mm. Le fond ne doit présenter aucune irrégularité susceptible d'interférer avec le comptage des colonies.

### 4. Mode opératoire

4.1. Stériliser les boîtes de Pétri dans un four à air chaud à 170 °C pendant au moins 1 heure ou, si un four à air chaud n'est pas disponible, dans un autoclave durant 20 min. à  $121 \pm 1$  °C.

4.2. Stériliser tous les éléments de l'appareil d'ensemencement par immersion pendant 10 min. dans l'eau bouillante. Remonter l'ensemble aseptiquement (voir figure 1).

Laisser refroidir l'instrument.

Aspirer rapidement la solution diluée dans la seringue. Avant de commencer l'examen bactériologique, plonger l'anse dans une solution d'hypochlorite fraîchement préparée (50 mg/l de chlore actif).

L'anse sera rincée quelques fois avec la solution diluée. Ensuite, déposer 1 ml de cette solution dans une boîte de Pétri. Cette boîte sera désignée comme « essai à blanc de l'appareil d'ensemencement ».

#### 4.3. Fusion du milieu

Avant de procéder à l'examen bactériologique, faire fondre rapidement la quantité de milieu requise dans de l'eau bouillante ou sous un courant de vapeur, dans un récipient partiellement fermé. Refroidir le milieu fondu au bain d'eau à 45 °C.

#### 4.4. Préparation de l'échantillon

Agiter vigoureusement l'échantillon en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien le laisser se disperser. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

#### 4.5. Prise d'essai à l'anse

Plonger soigneusement l'anse 3 fois de suite verticalement dans l'échantillon jusqu'à la soudure (càd. 3 à 4 mm). Les mouvements d'immersion et de retrait doivent être aussi uniformes que possible et se passer sur une distance de 30 mm. Chaque mouvement vertical doit durer 1 s. environ.

La réalisation uniforme de ces immersions et retraits peut être facilitée par l'utilisation d'un métronome. La vitesse de retrait a une influence sur le volume de lait prélevé (un mouvement trop lent aura pour conséquence un volume plus petit que 0,001 ml; tandis que un mouvement trop rapide engendrera un volume plus grand que 0,001 ml).

#### 4.6. Ensemencement des boîtes à Pétri

Soulever le couvercle d'une boîte à Pétri stérile, introduire l'anse dans la boîte et chasser le contenu de l'anse à l'aide 1 ml de solution de Ringer.

#### 4.7. Répartition du milieu de culture dans les boîtes de Pétri

Déposer une quantité suffisante (10 à 12 ml) de milieu fondu à une température de 45 °C, dans chaque boîte ensemencée de façon à obtenir une couche de 3 à 4 mm d'épaisseur.

Mélanger immédiatement par rotation de la boîte de Pétri afin d'obtenir une répartition régulière des colonies après incubation.

Laisser reposer les boîtes sur une surface horizontale et propre jusqu'à solidification du milieu.

#### 4.8. Incubation

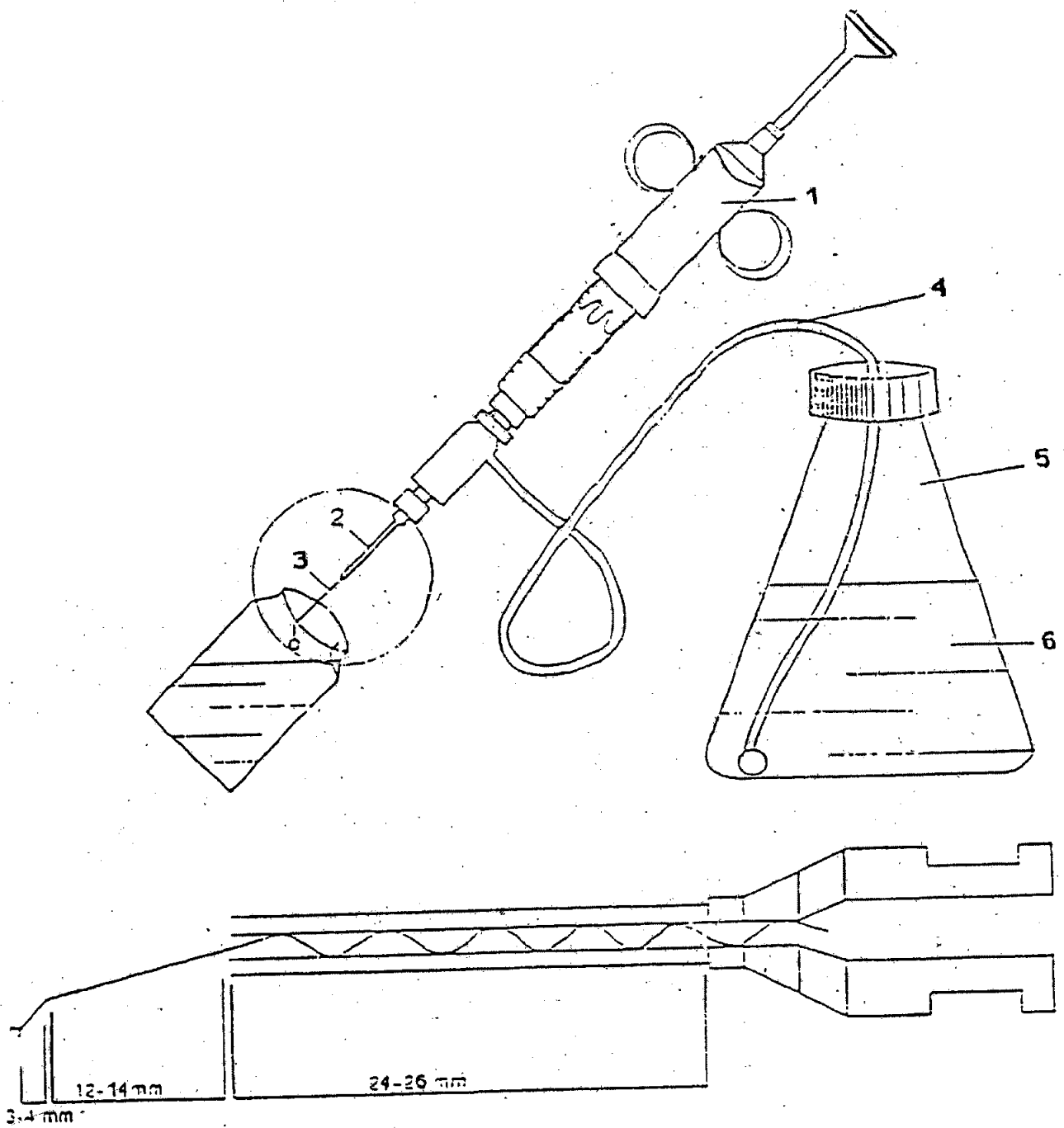
Retourner les boîtes et les placer dans l'étuve. En empiler 6 aux plus. Les piles de boîtes ne doivent pas se toucher, ni être en contact avec les parois ou la partie supérieure de l'étuve.

Incuber à 30 °C pendant  $72 \pm 2$  h.

#### 4.9. Comptage des colonies

Compter les colonies sur les boîtes. Examiner les boîtes à la lumière tamisée. Pour faciliter le comptage une loupe et/ou un compteur peuvent être utilisés.

Les colonies envahissantes doivent être considérées comme colonies uniques. Si moins d'un quart de la boîte est recouvert par des colonies envahissantes, compter les colonies sur la partie non affectée de la boîte et calculer le nombre correspondant pour la boîte entière. Si plus d'un quart de la boîte est recouvert par des colonies envahissantes, éliminer la boîte.



1. seringue Cornwall
2. aiguille hypodermique Luer-Lok
3. anse
4. tube en caoutchouc, diamètre interne 0,3 cm
5. récipient à dilution
6. liquide de dilution

Figure      Matériel d'ensemencement

## 5. Expression du résultat

Calculer le nombre de micro-organismes par ml en multipliant par 1000 le nombre de colonies.

Remarque : il faut prévoir un nombre suffisant d'essais à blanc pour contrôler la stérilité du milieu de culture, du liquide de dilution, des pipettes, des boîtes de Pétri, etc .....

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

Annexe 3 : Dénombrement des micro-organismes  
Comptage des colonies à 30 °C — Méthode roll-tube.

## 1. Définition

Par micro-organismes, on entend : les organismes qui forment des colonies comptables après incubation à 30 °C dans les conditions spécifiées.

## 2. Principe

Un échantillon de lait est mélangé dans un tube à essai avec le diluant. Après addition du milieu de culture le tube à essai est fermé. Le milieu de culture est réparti sur la paroi du tube sous la forme d'un film par rotation horizontale et refroidissement simultané du tube. Après incubation pendant 72 h à 30 °C, le nombre de colonies est compté visuellement, ou à l'aide d'un compteur.

## 3. Appareillage et verrerie

## 3.1. Appareillage

- Four à chaleur sèche, capable de maintenir une température de 170 à 175 °C pendant 1 h.
- Autoclave, réglable à  $121 \pm 1$  °C.
- Etuve, capable de maintenir une température uniforme de  $30 \pm 1$  °C.
- Appareil de pipetage automatique avec possibilité de nettoyage entre les échantillons.
- Appareil à anse avec plusieurs anses à alliage chrome nickel. Toutes les anses doivent transférer les mêmes quantités de lait. Un rinçage intermédiaire doit également être possible. Les anses doivent être montées avec un angle de 10 ° par rapport à l'axe afin de permettre un bon mélange de l'échantillon, de la solution de dilution, et du liquide de rinçage (hypochlorite).
- Dispenseur automatique de milieu de culture formé d'un container à double paroi à circulation d'eau chaude pour maintenir la température du milieu à 47 °C.
- Appareil rotatif pour tubes à essais couplé à un système de refroidissement à l'eau courante.
- pH-mètre avec compensation de température, précis à  $\pm 0,1$  unité pH.
- Compteur de colonies fonctionnant selon le principe de diffraction de la lumière.

## 3.2. Verrerie

Tubes à essais stériles avec bouchons appropriés en silicone. La stérilisation s'effectue au four ou à l'autoclave.

## 4. Diluant et milieu de culture

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement. Tous les composants de base doivent être de qualité analytique.

Des solutions d'hydroxide de sodium et d'acide chlorhydrique (environ 0,1 ml/l) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants et du milieu de culture.

Si les diluants ou le milieu de culture ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver à l'obscurité entre 0 et 5 °C, pendant 1 mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

## 4.1. Diluants

## 4.1.1. Solution peptone-sel

Peptone : 1,0 g  
Chlorure de sodium (NaCl) : 8,5 g  
Eau : 1000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25 °C.

## 4.1.2. Solution de Ringer — diluée au quart

Chlorure de sodium (NaCl) : 2,25 g  
Chlorure de potassium (KCl) : 0,105 g  
Chlorure de calcium anhydre (CaCl<sub>2</sub>) : 0,06 g  
Hydrogène-carbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) : 0,05 g  
Eau : 1000 ml

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,0 à 25 °C.

## 4.1.3. Répartition et stérilisation des diluants

Répartir le diluant dans les tubes à essai de façon qu'après stérilisation, chaque tube à essai contienne environ 1,3 ml de diluant.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C durant 15 min.

**4.2. Milieu de culture****4.2.1. Composition**

Plate Count Agar : 28,5 g

Agar : 10-15 g suivant les propriétés gélifiantes

Poudre de lait écrémé : 1,0 g

Eau : 1000 ml

La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices.

**4.2.2. Préparation**

Utiliser de préférence les préparations complètes déshydratées, vendues en commerce (\*).

Mélanger le milieu complet ou les composants de bases avec l'eau (suivre les prescriptions du fabricant). Il est indispensable d'ajouter la poudre de lait et le surplus d'agar.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,9 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C durant 15 minutes.

Transférer le milieu de culture dans le container à double paroi du dispensateur.

**5. Mode opératoire**

5.1. Mélanger convenablement l'échantillon afin d'obtenir une répartition des micro-organismes aussi homogène que possible, en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Eviter la formation de mousse ou laisser la mousse se disperser. Le délai entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes.

5.2. Prélever à l'aide de l'appareil de pipetage, 1 ml de l'échantillon et l'ajouter à un tube à essai.

5.3. Prélever à l'aide d'une anse environ 1 µl de lait et l'ajouter à un tube à essai contenant le diluant. Les tubes à essai seront préalablement chauffés à 40 °C.

5.4. L'anse doit tourner autour de son axe lors de son immersion dans l'échantillon afin d'obtenir un bon mélange de l'échantillon.

5.5. Déposer 3 ml de milieu de culture à 47 °C dans chaque tube à essai grâce au dispensateur.

La température du mélange, — liquide de dilution et milieu de culture — sera d'environ 45 °C.

5.6. Fermer chaque tube à essai avec un bouchon stérile en silicone.

5.7. Placer le tube horizontalement dans l'appareil rotatif et laisser figer le milieu de culture sur la paroi des tubes. La gélose aura une épaisseur d'1,5 mm.

Pour accélérer le processus, on refroidit les tubes à l'eau courante.

5.8. Incuber à 30 °C pendant  $72 \pm 2$  h.

5.9. Lire le nombre de colonies de manière visuelle ou électronique.

**6. Calcul et expression des résultats**

Calculer le nombre de micro-organismes par ml en multipliant par 1000 le nombre de colonies.

Remarque : il faut prévoir un nombre suffisant d'essais à blanc pour contrôler la stérilité du milieu de culture, du liquide de dilution, des pipettes, des boîtes de Pétri, etc ...

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,

**A. BOURGEOIS**

**Annexe 4 : Dénombrement des micro-organismes  
Comptage des colonies aérobies à 30 °C — Méthode petrifilm**

**1. Définition**

Par « micro-organismes » il faut entendre les organismes formant des colonies comptables lors d'une incubation en aérobiose dans les conditions spécifiées ci-après.

**2. Principe**

Les pétrifilms sont constitués de 2 films plastiques : le film inférieur sert de support au milieu de culture, le film supérieur contient un indicateur au tétrazolium.

L'échantillon (ou la dilution) est déposée sur le milieu de culture. Après incubation à la température adéquate les colonies formées sont dénombrées.

**3. Appareillage et verrerie****3.1. Appareillage**

— Pétrifilm SM + diffuseur plastique.

— Four à air chaud, réglable à 170-175 °C.

— Autoclave, réglable à  $121 \pm 1$  °C.

— Etuve réglable à une température uniforme de  $30 \pm 1$  °C.

— Agitateur fonctionnant suivant le principe de rotation excentrique.

— pH-mètre, avec correcteur de température, sensible à 0,1 unité de pH près.

**3.2. Verrerie**

— Tubes à essai avec bouchons appropriés et de capacité suffisante pour contenir 10 ml de la première dilution ou des dilutions décimales suivantes.

— Pipettes (cotonnées) en verre ou en matériau synthétique stérile, non ébréchées, de 1 ml de capacité nominale, présentant un orifice d'écoulement de 1,75 à 3 mm de diamètre.

— Stérilisation de la verrerie.

Stériliser la verrerie pendant au moins 20 min à  $121 \pm 1$  °C à l'autoclave ou pendant 1 h au four à une température de 170 à 175 °C.

(\*) Plate Count Agar et poudre de lait écrémé sont vendus comme milieu de culture composé sous le nom « Plate Count Skim Milk Agar ».

#### 4. Liquide de dilution

Tous les composants de celui-ci seront de qualité « pour analyse ».

##### 4.1. Solution de peptone-sel

###### Composition

Peptone : 1,0 g

Chlorure de sodium (NaCl) : 8,5 g

Eau : 1000 ml

###### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Vérifier le pH avec un pH-mètre et ajuster au besoin le pH, en utilisant une solution d'HCl (0,1 M) ou NaOH (0,1 M) de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

##### 4.2. Solution de Ringer diluée au quart

###### Composition

NaCl : 2,25 g

KCl : 0,105 g

CaCl<sub>2</sub> : 0,06 g

NaHCO<sub>3</sub> : 0,05 g

Eau : 1000 ml

Dissoudre les sels dans l'eau.

Vérifier le pH avec un pH-mètre et ajuster de manière qu'après stérilisation le pH soit de 7,0 à 25 °C.

L'ajustement de pH se fait avec 1 solution de HCl (0,1 M) ou de NaOH (0,1 M).

##### 4.3. Répartition, stérilisation et conservation du diluant.

Répartir le diluant dans des tubes à essai en quantités telles qu'après stérilisation chaque tube contienne 9,0 ml de diluant.

Boucher les tubes.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Vérifier le pH du diluant.

Si le diluant n'est pas utilisé immédiatement, le conserver à l'abri de la lumière entre 0 et 5 °C pendant un mois au maximum après sa préparation.

Remarque : la solution diluée peut aussi être préparée au moyen de tablettes en vente dans le commerce.

#### 5. Mode opératoire

##### 5.1. Préparation de l'échantillon et des dilutions

5.1.1. Agiter vigoureusement l'échantillon en retournant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien le laisser se disperser. L'intervalle de temps entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

5.1.2. Prélever à la pipette 1 ml ou 10 ml de l'échantillon et ajouter à 9 ml resp. 90 ml de diluant approprié.

5.1.3. Agiter cette dilution 25 fois sur 30 cm en 10 secondes. On obtient alors la dilution 10<sup>-1</sup>.

5.1.4. Introduire 1 ml ou 10 ml de la dilution 10<sup>-1</sup> dans un nouveau tube contenant 9 ml, resp. un nouveau flacon contenant 90 ml de diluant. Mélanger avec soin avec l'agitateur ou dans le cas des flacons manuellement comme indiqué en 5.1.3. Ainsi on obtient la dilution 10<sup>-2</sup>.

5.1.5. Introduire 1 ml ou 10 ml de la dilution 10<sup>-2</sup> dans un nouveau tube contenant 9 ml, resp. un nouveau flacon contenant 90 ml de diluant. Mélanger avec soin avec l'agitateur ou dans le cas des flacons manuellement comme indiqué en 5.1.3. Ainsi on obtient la dilution 10<sup>-3</sup>.

5.1.6. Si nécessaire, répéter ces opérations pour obtenir les dilutions suivantes.

##### 5.2. Inoculation des pétrifilms

Placer le pétrifilm sur une surface plane.

Soulever le film supérieur et déposer 1 ml de l'échantillon (ou de la dilution) au centre de la dépression du film inférieur.

Recouvrir délicatement avec le film supérieur.

Placer le diffuseur plastique, sur le film et répartir l'échantillon en exerçant une légère pression sur le diffuseur.

Laisser le diffuseur environ 1 minute sur le pétrifilm pour laisser le gel se solidifier.

##### 5.3. Incubation des pétrifilms

Incuber le pétrifilm à l'horizontale avec la partie claire face vers le haut durant 72 ± 3 h à 30 ± 1 °C.

Ne pas empiler plus de 20 unités.

##### 5.4. Comptage des colonies

Compter les colonies rouges sur le pétrifilm.

#### 6. Calcul et expression des résultats

6.1. Utiliser les résultats sur les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies.

6.2. Calculer le nombre de micro-organismes N par millilitre de lait, comme indiquée ci-après.

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

où

$\sum c$  : le nombre total des colonies sur les boîtes utilisées

$n_1$  : le nombre de boîtes utilisées pour la première dilution

$n_2$  : le nombre de boîtes utilisées pour la deuxième dilution

$d$  : la dilution à partir de laquelle les premiers comptages ont été obtenus.

6.3. Arrondir le nombre de micro-organismes calculé selon 6.2. à 2 chiffres significatifs.

Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^n$ , n étant la puissance de 10 appropriée

6.4. Si tous les dénombrements sont inférieurs à 10, indiquer que le nombre de micro-organismes par millilitre est « inférieur à  $10 \times d$  », d étant l'inverse de la dilution la plus faible.

6.5. Si tous les dénombrements sont supérieurs à 300, calculer le nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies proche de 300 et le multiplier par l'inverse du facteur de dilution. Exprimer ce résultat en tant que « nombre estimé de micro-organismes par millilitre ».

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

Annexe 5 : Dénombrement des micro-organismes  
Comptage du nombre de colonies aérobies — Microscopie par épifluorescence

1. Définition

Le nombre de micro-organismes est déterminé par ces méthodes, en convertissant les impulsions fluorescentes provenant des bactéries fluorescentes (Bactoscan) ou en comptant directement les bactéries ou amas bactériens fluorescents (Cobra). Les résultats sont ensuite transformés en unités formant colonies/ml (UFC) pour le Bactoscan; le Cobra donne quant à lui directement les mesures en UFC/ml.

2. Principe

Coloration des bactéries avec de l'acridine orange et comptage des bactéries fluorescentes au moyen d'un microscope à épifluorescence.

3. Le Bactoscan

3.1. Appareillage — Mode opératoire

Pour le Bactoscan (Foss Electric, Hillerod, Danemark), l'échantillon de lait est traité avec une solution lysante afin de détruire les micelles de caséine et les cellules somatiques. Les bactéries sont séparées des autres constituants du lait par une centrifugation et une filtration. Les protéines restantes sont hydrolysées par réaction enzymatique. Les bactéries sont colorées avec l'acridine orange. Un volume défini du mélange est prélevé et déposé en un fin film sur un disque tournant qui sert de surface de lecture pour le microscope à épifluorescence. Les bactéries fluorescentes sont détectées comme des impulsions lumineuses (impulsions Bactoscan). Le nombre d'impulsions lumineuses est exprimé en milliers par ml et est transformé grâce à une courbe de calibration en unités formant colonies par ml.

3.2. Conduite de l'analyse

3.2.1. Les réactifs

Les réactifs nécessaires pour la réalisation des solutions mères et de travail sont disponibles auprès du fabricant de l'appareil. Leur préparation doit être conforme aux prescriptions de celui-ci.

3.2.2. Prétraitement de l'échantillon

L'échantillon est réchauffé à  $40 \pm 2$  °C dans un bain-marie. L'échantillon est immédiatement mélangé par un minimum de 10 retournements (180°). La formation de mousse doit être évitée.

3.2.3. Mise en route de l'appareil

L'appareil est réglé avant emploi à l'aide d'un standard Bz disponible chez le fabricant de l'appareil. La relation entre le nombre de bactéries à compter et le seuil au-dessus duquel le comptage est exécuté, est déterminée de cette manière. La mise au point de l'appareil est exécutée selon les instructions du fabricant. 4 échantillons 'blancs' (eau distillée ou désionisée filtrée) sont ensuite mesurés à l'aide de l'appareil. Chaque résultat doit être inférieur à 20 et la moyenne des résultats doit être inférieure à 10 impulsions lumineuses (impulsions Bactoscan).

3.2.4. Comptage du nombre de bactéries

Le comptage est effectué dans les 15 minutes après le prétraitement de l'échantillon conformément aux instructions du fabricant. La dilution et le traitement de l'échantillon sont effectués automatiquement dans l'appareil.

On effectue un 'blanc' au moins après chaque série de 50 échantillons de lait. La lecture doit être inférieure à 20 impulsions Bactoscan.

3.2.5. Résultat

Le nombre d'impulsions prises en compte par l'appareil est converti en un nombre de colonies déterminées sur base d'une comparaison avec la méthode de référence.

3.3. La conduite et la gestion des appareils doivent être décrites dans le protocole établi par les organismes interprofessionnels.

4. Le cobra

4.1. Appareillage

Le « Cobra » (Biocom, les Ulis — France) est un appareil modulaire de dénombrement de la flore aérobie du lait. Il est constitué de 3 modules :

— le module de distribution et de préparation des échantillons. Ce module est constitué d'un appareil automatisé de prélèvement à l'aide d'une seringue. Il est composé d'un bloc compact interchangeable en polypropylène creusé de 24 puits (4 rangées de 6 puits). Le distributeur XY procède de manière séquentielle pour alimenter les 24 puits.

— le module de filtration et de coloration.

Cette unité est constituée d'un automate programmable intégrant plusieurs pompes.

Un tiroir supporte le filtre d'analyse monté dans un cadre rigide et le bloc de polypropylène avec ses 24 puits contenant les échantillons préparés.

— le module d'analyse et de traitement des données.

Ce module comprend un microscope à épifluorescence avec une caméra et un écran vidéo, une platine motorisée et un analyseur d'images avec micro-ordinateur.

Une pompe à vide est adjointe au microscope et permet un aplatissage du filtre sur la platine afin d'assurer une surface de lecture parfaitement plane.

#### 4.2. Mode opératoire

Le système de distribution automatique répartit le lait cru à analyser froid, convenablement mélangé et le mélange triton-trypsine dans les blocs en polypropylène chauffés au préalable à 50 °C servant de support à l'eau stérile.

L'ensemble réagit pendant 10 minutes afin de détruire les cellules somatiques, les micelles de caséine et rendre plus fluide le passage des globules gras à travers la membrane.

Le bloc est transmis dans l'unité de filtration où les 24 échantillons sont traités en parallèle.

Les mélanges lait-eau-solution lysante sont filtrés sous pression sur une membrane en polycarbonate rincée ensuite avec du tampon citrate à pH 3. Les bactéries récupérées sur la membrane sont colorées avec une solution d'acridine orange (0,025 %) pendant 3 minutes. Le filtre est rincé avec du tampon citrate à pH 3 et séché pendant 1 minute par de l'air sous pression. Le badge est déposé et fixé sur le poste de lecture et d'analyse. L'ordinateur gère automatiquement la lecture des 24 échantillons grâce à un programme informatisé.

#### 4.3. Conduite de l'analyse

##### 4.3.1. Les réactifs

Les réactifs et les solutions de travail doivent être conformes aux spécifications du fabricant de l'appareil.

##### 4.3.2. Mise en route et vérification de l'appareil

La mise au point de l'appareil est effectuée selon les instructions du fabricant. Ensuite, on vérifie le bon fonctionnement de l'appareil à l'aide de 4 échantillons 'blancs' (eau distillée ou désionisée filtrée). Les 4 lectures doivent être inférieures à 10 bactéries fluorescentes.

##### 4.3.3. Résultat

Les mesures sont exprimées directement en UFC/ml.

4.4. La conduite et la gestion des appareils doivent être décrites dans le protocole établi par les organismes interprofessionnels.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,

A. BOURGEOIS

### Annexe 6 : Dénombrement des cellules somatiques — Méthode microscopique

#### 1. Objet et domaine d'application

La présente norme décrit le procédé de dénombrement du nombre « véritable » de cellules dans un échantillon de lait pour étalonner et vérifier la précision du procédé fluoro-opto-électronique (voir annexe 7).

#### 2. Définition

Dans le présent procédé, on entend par cellules somatiques les cellules, par exemple leucocytes et cellules épithéliales, dont le noyau peut être coloré distinctement au bleu de méthylène.

#### 3. Principe

Étalement de 0,01 ml de lait sur une surface de 1 cm<sup>2</sup> d'une lame porte-objet. Le film de lait est séché et coloré. Le comptage s'effectue à l'aide d'un microscope. Le nombre de cellules somatiques dénombrées pour une surface déterminée est multiplié par un facteur de multiplication afin d'obtenir le nombre de cellules par ml.

#### 4. Réactifs

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

##### Solution colorante

##### Composition

Bleu de méthylène : 0,6 g

Ethanol — 99 % : 54 ml

1,1,1-trichloro-éthane ou tétrachloro-éthane : 40 ml

Acide acétique glacial : 6 ml

##### Attention

Le tétrachloro-éthane étant toxique, les manipulations doivent être réalisées sous une hotte aspirante.

##### Préparation

Mélanger l'éthanol et le 1,1,1-trichloro-éthane ou tétrachloro-éthane dans un flacon et chauffer dans un bain d'eau à 80-70 °C. Ajouter le bleu de méthylène, mélanger soigneusement, refroidir au réfrigérateur à 4 °C pendant 12 à 24 heures puis ajouter l'acide acétique glacial. Filtrer sur filtre d'une porosité de 10 à 12 microns au maximum et conserver la solution colorante dans un flacon étanche. En cas de formation de particules de sédiments, filtrer à nouveau avant usage.

#### 5. Appareillage et verrerie

- microscope permettant un grossissement de x 500 à x 1.000.
- Microseringue permettant de répartir des quantités de 0,01 ml avec une précision de 2 % ou meilleure.
- Lame porte-objet pour l'étalonnage du film comportant un rectangle gravé de 20 mm x 5 mm ou lame standard et gabarit de 20 mm x 5 mm.
- Plaque chauffante horizontale (30-50 °C) pour sécher les lames.
- Ventilateur (type sèche-cheveux) pour sécher le film.
- Bain d'eau, réglable à 30-40 °C pour chauffer l'échantillon de lait.
- Micromètre objectif gradué au 1/100 de mm.

#### 6. Mode opératoire

##### 6.1. Échantillon de lait

L'échantillon de lait doit être analysé dans les six heures qui suivent le prélèvement. Pendant le stockage, la température de l'échantillon ne doit pas dépasser 6 °C. La congélation doit être évitée.

##### 6.2. Préparation de l'échantillon dans le laboratoire

Chauffer l'échantillon dans un bain d'eau à 30-40 °C, puis mélanger soigneusement. Refroidir à la température à laquelle la microseringue a été étalonnée, par exemple 20 °C.

**6.3. Prétraitement des lames**

Nettoyer les lames à l'éthanol par exemple, essuyer à l'aide d'un papier ne laissant pas de particules, flamber et laisser refroidir. Conserver dans une boîte à l'abri des poussières.

**6.4. Préparation du film**

A l'aide de la microseringue prélever 0,01 ml de l'échantillon de lait préparé comme indiqué ci-dessus. Nettoyer soigneusement la partie externe de la seringue entrée en contact avec le lait. Déposer le contenu de la seringue sur la lame après avoir pris soin de délimiter les contours du rectangle (20 mm x 5 mm). Répartir ensuite le prélèvement aussi régulièrement que possible sur cette surface. Laisser sécher le film sur une plaque chauffante horizontale jusqu'à ce qu'il soit complètement sec.

Une meilleure adhésion est parfois réalisée en laissant sécher le lait pendant quelques heures à la température de la pièce.

Préparer et examiner au moins deux films pour chaque échantillon.

**6.5. Coloration des films**

Immerger dans une solution colorante (4) pendant 10 minutes. Sécher et, si nécessaire, compléter le séchage à l'aide du ventilateur. Plonger les films dans de l'eau jusqu'à élimination complète du surplus de colorant. Sécher à nouveau et conserver à l'abri des poussières.

**6.6. Etalonnage du champ microscopique**

A partir du grossissement choisi ( $\times 500$  —  $\times 1.000$ ), mesurer à l'aide du micromètre objectif le diamètre du champ microscopique.

**7. Comptage et calcul****7.1. Dénombrement des cellules**

Utiliser le microscope. Au lieu de dénombrer les cellules, dénombrer uniquement les noyaux de cellules, clairement reconnaissables et dont au moins la moitié est visible dans le champ microscopique. Compter les bandes ou les champs situés dans le tiers central du film en évitant de compter les bandes ou les champs sélectionnés exclusivement dans les zones périphériques du film. Le soin apporté à la préparation des films et, par conséquent, la fiabilité des résultats doivent être vérifiés au moins une fois par mois en comptant différentes parties du film. Il est également possible de procéder au dénombrement en comptant les champs microscopiques répartis de telle façon que toutes les parties du film seront représentées de manière équivalente.

**7.2. Détermination du nombre minimal de cellules à compter**

Etant donné que le dénombrement microscopique des cellules somatiques peut également être utilisé pour l'étalonnage des techniques de comptage mécaniques et automatiques, le coefficient de variation des comptages sur des échantillons identiques ne doit pas être plus élevé que celui obtenu avec les appareils électroniques. Le coefficient de variation pour un échantillon de lait contenant de 400.000 à 600.000 cellules par ml ne doit pas dépasser 5 %.

D'après la loi de distribution de Poisson, afin d'obtenir cette répétabilité, le nombre de cellules somatiques à dénombrer dans chaque échantillon ne doit pas être inférieur à 400.

Selon la loi de distribution de Poisson,

$$M = V = s^2,$$

où

M est la valeur moyenne arithmétique,

V est la variance,

s est l'écart-type.

Le coefficient de variation est :

$$CV = \frac{s \times 100\%}{M} \text{ ou } CV = \frac{100\%}{s} \text{ ou } CV = \frac{100\%}{\sqrt{M}}$$

M (moyenne) représente le nombre de particules (cellules) qui ont été dénombrées (par exemple, 400 pour CV = 5 %).

**7.3. Calcul du facteur de multiplication**

En utilisant 0,01 ml de lait, le facteur de multiplication se calcule conformément aux points 7.3.1 ou 7.3.2.

**7.3.1. Comptage des bandes dans le film.**

La longueur des bandes à dénombrer est de 5 mm, soit la largeur du film. La largeur de la bande correspond par contre au diamètre du champ microscopique déterminé par le micromètre objectif.

$$\text{Facteur de multiplication} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

où

d est le diamètre en millimètres du champ microscopique, déterminé par le micromètre objectif.

b est le nombre de bandes entièrement comptées.

**7.3.2. Comptage des champs microscopiques dans le tiers central du film ou à l'aide d'une grille.**

$$\text{Facteur de multiplication} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\pi \times d^2 \times s} = \frac{12.732}{d^2 \times s}$$

où

d représente le diamètre en millimètres du champ microscopique déterminé par le micromètre objectif.

s représente le nombre de champs comptés.

**7.4. Calcul de la teneur en cellules**

Le nombre de cellules somatiques dénombrées (7.1 et 7.2) est multiplié par le facteur de multiplication (7.3), afin d'obtenir le nombre de cellules par ml de lait.

**7.5. Précision**

Le coefficient de variation de répétabilité (voir 7.2) ne doit pas excéder 5 %.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS



## Annexe 7 : Dénombrement des cellules somatiques — Méthode fluor-opto-électronique

## 1. Objet et domaine d'application

La présente norme décrit le procédé officiel qui, après un étalonnage adéquat (voir annexe 6), peut être utilisé pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait cru — avec ou sans addition de conservateurs chimiques.

## 2. Définition

Pour ce procédé, les cellules somatiques sont des particules qui ont une intensité de fluorescence minimale due à la coloration de l'ADN cellulaire.

## 3. Principe

Un volume de l'échantillon (par exemple 0,2 ml) est mélangé convenablement avec la solution tampon et la solution fluorescente. Une partie de ce mélange est ensuite transférée sous la forme d'un mince film dans un disque rotatif faisant fonction de porte-objet.

Chaque cellule produit une impulsion électrique qui est amplifiée et enregistrée. Le nombre de cellules somatiques est imprimé en milliers par ml.

## 4. Réactifs

Sauf indication contraire, n'utiliser que des produits chimiques de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déionisée, ou de l'eau d'une pureté équivalente.

## 4.1. Solution tampon

## Composition

Hydrogénophthalate de potassium : 51,0 g

Hydroxyde de potassium : 13,75 g

Polyéthylèneglycol-mono-p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyle)-phényl-éther (par exemple Triton X-100), à 1 % en volume : 10,0 ml

pH 5,7 — 5,9. Compléter à 10.000 ml avec de l'eau distillée.

## Préparation

Mélanger les différents composants. La conservation sous fermeture hermétique ne doit pas dépasser 7 jours.

## 4.2. Solution fluorescente (solution mère)

## Composition

Bromure d'éthidium : 1,0 g

Compléter à 1.000 ml avec de l'eau.

## Préparation

Dissoudre le bromure d'éthidium dans l'eau. La conservation dans un flacon hermétique à l'abri de la lumière ne doit pas dépasser 2 mois.

Vu les caractéristiques fortement cancérigènes du bromure d'éthidium il faut éviter tout contact direct avec le produit.

## 4.3. Solution fluorescente (solution pour l'analyse)

Mélanger 20 ml de la solution mère (4.2) à la solution tampon (4.1) de manière à obtenir 1.000 ml. La solution pour l'analyse ne doit pas être utilisée au-delà de 7 jours.

## 4.4. Solution de lavage

## Composition

Solution tampon (4.1) : 10,0 ml

Polyéthylèneglycol-mono-p-(1,1,3,3-tétraméthylbutyle)-phényl-éther (par exemple Triton X-100), à 1 % en volume : 10,0 ml

Ammoniac, à 25 % en volume : 25,0 ml

Compléter à 10.000 ml avec de l'eau.

## Préparation

Mélanger les différents composants. Ne pas conserver au-delà de 30 jours.

## 5. Appareillage et verrerie

## 5.1. Compteur fonctionnant selon le principe de la fluorescence optique

## Note

Avant l'emploi, étalonner l'instrument. La relation entre le volume des particules à dénombrer et le seuil limite à partir duquel les dénombrements sont appliqués est déterminée de la sorte. L'étalonnage de l'appareil s'effectue suivant les instructions du fabricant en utilisant des échantillons dont la teneur en cellules a été déterminée par la méthode microscopique (A).

5.2. Bain d'eau, à circulation, réglable à  $40 \pm 1$  °C.

5.3. Tube à essai, avec fermeture appropriée, d'environ 15 ml.

## 6. Échantillon de lait

6.1. L'échantillon doit être stocké à basse température dans un tube à essai (5.3). Si l'échantillon ne contient pas de conservateur chimique, le dénombrement ne doit pas s'effectuer dans les 24 heures qui suivent la traite, étant donné que la teneur en germes serait trop faible. La température de conservation ne doit pas dépasser 6 °C.

## 6.2. Addition de conservateurs

La conservation chimique doit être réalisée dans les 24 heures. L'addition de conservateurs doit s'effectuer dès que possible après le prélèvement de l'échantillon.

6.2.1. La conservation chimique de l'échantillon est réalisée par l'addition de l'un des conservateurs suivants :

— acide orthoborique

La concentration finale de l'acide orthoborique dans l'échantillon ne doit pas dépasser 0,8 g/100 ml. L'échantillon conservé de la sorte peut être stocké pendant 24 heures supplémentaires à 6-12 °C.

— dichromate de potassium

La concentration finale de dichromate de potassium ne doit pas dépasser 0,2 g/100 ml. L'échantillon conservé de la sorte peut être stocké durant 72 heures supplémentaires à 6-12 °C.

— azide de sodium

L'échantillon peut être conservé avec de l'azide de sodium à une concentration finale de 0,024 g/100 ml, à condition qu'il soit refroidi à une température de 6-12 °C immédiatement après le prélèvement et compté dans les 48 heures qui suivent le prélèvement.

— bronopol

L'échantillon peut être conservé avec du bronopol à une concentration finale de 0,05 g/100 ml, à condition d'être refroidi à 6-12 °C immédiatement après le prélèvement et compté dans les 72 heures qui suivent le prélèvement.

6.2.2. Un échantillon déjà conservé à l'aide d'acide orthoborique peut être conservé 48 heures de plus par adjonction de dichromate de potassium.

Nota

Pour les échantillons conservés à l'aide de dichromate de potassium, les normes locales relatives au rejet des effluents doivent être respectées.

## 7. Mode opératoire

### 7.1. Prétraitement de l'échantillon

Le lait à analyser doit être conservé après la traite pendant au moins 24 heures à 2-6 °C environ. Le comptage des échantillons le jour de la traite n'est pas conseillé sans prétraitement, car les résultats risquent d'être trop faibles. S'il faut malgré tout procéder au comptage, l'échantillon doit alors être prétraité pendant trois heures au moins à l'aide de dichromate de potassium (voir 6.2.1).

### 7.2. Préparation

Chauffer l'échantillon prétraité (7.1) ou l'échantillon non traité ayant au moins un jour dans un bain d'eau à 40 °C environ. Conserver ensuite l'échantillon à température ambiante jusqu'au moment du comptage.

### 7.3. Comptage des cellules

Procéder au comptage à l'aide du compteur (5.1) dans les quinze minutes qui suivent la fin du chauffage (voir 7.2). Immédiatement avant le comptage, mélanger convenablement les échantillons afin d'obtenir une répartition des cellules somatiques aussi homogène que possible.

La dilution et la préparation ultérieures de l'échantillon doivent s'effectuer automatiquement dans le compteur.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

## Annexe 8 : Détection des substances inhibitrices et des sulfamides dans le lait

### Introduction

Cette annexe décrit une méthode de mise en évidence des antibiotiques et des sulfamides dans le lait cru.

On effectue une méthode de sélection sur les échantillons à examiner. Tous les échantillons qui après l'incubation prescrite par la méthode de sélection donnent lieu à un résultat positif ou douteux sont soumis à une épreuve de confirmation. Cette méthode de confirmation est exécutée sur l'échantillon de lait originel que l'on porte à 80 °C pendant 10 minutes.

Les échantillons qui, lors de l'épreuve de confirmation, montrent à nouveau une inhibition de la croissance, sont soumis à un nouvel examen visant la détermination de sulfamides en effectuant l'épreuve en présence d'acide para amino benzoïque. Les laits qui ne contiennent pas de sulfamides sont à nouveau examinés pour déterminer soit la pénicilline soit d'autres substances inhibitrices.

### A. Epreuve de sélection

#### A.1. Méthode de référence : test de diffusion en gélose.

##### A.1.1. Principe.

On fait diffuser un échantillon de lait ensemencé de spores d'un micro-organisme test *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 ou C 953 dans un milieu gélosé contenant des substances nutritives, un indicateur de pH, et de la triméthoprimine. La croissance normale et la production d'acide d'un micro-organisme test a fait virer après incubation l'indicateur de pH du pourpre au jaune. La présence d'inhibiteurs se traduit par un maintien plus long de la coloration pourpre de l'indicateur de pH que dans les tubes ou cupules contenant l'échantillon témoin exempt de substances inhibitrices. On peut utiliser aussi bien des petits tubes à essais que des plaques de microtitration.

##### A.1.2. Milieux, solutions standards, micro-organisme test.

#### Remarque :

— les composants de base des milieux doivent convenir pour des analyses bactériologiques;  
— l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée ou de pureté équivalente et ne pas contenir de substances inhibitrices.

##### A.1.2.1. Gélose nutritive (\*).

— Composition : Extrait de levure : 2,5 g  
Tryptone : 5,0 g  
Glucose : 1,0 g  
Agar : 15 g  
Eau distillée : 1000 ml

#### — Préparation :

Dissoudre les composants dans de l'eau en chauffant. Stériliser à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes; pH à 25 °C après stérilisation.

(\*) : Nom commercial : Plate Count Agar.

## A.1.2.2. Solution de trimétoprime.

Trimétoprime : 5 mg

Ethanol 96 % : 10 ml

Eau distillée : jusque 1000 ml

Dissoudre la trimétoprime dans l'éthanol et compléter avec de l'eau. Cette solution se conserve au maximum 1 semaine à l'obscurité et à une température de 0-5 °C.

## A.1.2.3. Solution de pourpre de bromocrésol.

Pourpre de bromocrésol : 250 mg

Ethanol 96 % : 10 ml

Eau distillée : jusque 100 ml

Dissoudre le pourpre de bromocrésol dans l'éthanol et compléter avec l'eau. Conserver cette solution au maximum pendant 6 mois à l'obscurité à une température de 0 à 5 °C.

## A.1.2.4. Milieu de culture du microorganisme test (\*\*)

— Composition : Extrait de levure : 2,0 g

Extrait de viande : 1,0 g

Peptone : 5,0 g

Chlorure de sodium : 5,0 g

Agar : 15,0 g

Eau distillée : 1000 ml

## — Préparation

Dissoudre en chauffant les composants dans l'eau.

Répartir des quantités de 7 ml dans des tubes à essai.

Stériliser à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes.Le pH à 25 °C après stérilisation doit être  $7,4 \pm 0,1$ .

Laisser le milieu se solidifier dans les tubes en position inclinée.

## A.1.2.5. Milieu de sporulation.

— Composition : Extrait de viande : 3,0 g

Peptone : 5,0 g

Sulfate de manganèse ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) : 31,3 mg

Agar : 15,0 g

Eau distillée : 1000 ml

## — Préparation

Dissoudre en chauffant les ingrédients dans de l'eau et répartir dans des fioles.

Stériliser à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes.Le pH après stérilisation à 25 °C est de  $7,4 \pm 0,1$ .

Fondre le milieu lors de l'emploi, le répartir dans de grandes boîtes de pétri (A.1.5.2.3.) et le laisser solidifier.

## A.1.2.6. Solution de Ringer (diluée au 1/4)

— Composition : Chlorure de sodium : 2,25 g

Chlorure de potassium : 0,105 g

Chlorure de calcium.6 H<sub>2</sub>O : 0,12 g

Bicarbonate de sodium : 0,05 g

Eau distillée : 1000 ml

— Préparation : Dissoudre les ingrédients dans l'eau. Stériliser à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de  $7,0 \pm 0,1$ .

## A.1.2.7. Lait exempt de substances inhibitrices.

Lait UHT stérile exempt de substances inhibitrices.

## A.1.2.8. Solution étalon de pénicilline.

Étalon à 0,004 µg/ml (= 0,0087 U.I./ml) de pénicilline, effectué à partir de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.). Cet étalon placé à  $-18 \pm 2$  °C se conserve au moins 3 mois.

## A.1.2.9. Solution standard de sulfadimidine (= sulfaméthazine).

Étalon à 0,750 µg/ml de sulfadimidine réalisé à partir de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.). Cet étalon placé à  $-18 \pm 2$  °C se conserve au moins 3 mois.

## A.1.2.10. Microorganisme test.

*Bacillus stéarothermophilus* var. *calidolactis*, souche ATCC 10149 ou C953.

## A.1.3. Préparation du test.

## A.1.3.1. Culture de réserve.

Le microorganisme test (A.1.2.10.) est conservé sur une gélose nutritive inclinée et figée (A.1.2.4.). Ensemencer à l'aide d'une anse imprégnée du microorganisme test en effectuant des stries sur la surface de la gélose inclinée. Incuber 48h à  $55 \pm 1$  °C. Après incubation, passer à la flamme et enfoncer légèrement la bourse d'ouate dans le tube. Fermer hermétiquement le tube à l'aide d'un bouchon stérile en caoutchouc. La culture mère ainsi obtenue peut être conservée plusieurs mois au réfrigérateur à 5 °C.

## A.1.3.2. Matériel d'ensemencement.

Transvaser aseptiquement la gélose nutritive fondue pour la culture du micro-organisme test (A.1.2.4.) dans des boîtes de Petri stériles (A.1.5.2.2.). Laisser le milieu se solidifier. Ensemencer la culture de réserve sur ce milieu. Incuber 24h à  $63 \pm 1$  °C.

(\*\*) Nom commercial : Nutrient Agar.

## A.1.3.3. Suspension de spores.

A.1.3.3.1. Reprendre la culture (A.1.3.2.) développée sur la boîte de Petri dans 2 ml de solution de Ringer stérile à l'aide d'un écouvillon stérile ou d'une spatule en verre stérile. Transférer à l'aide d'une pipette stérile 1 ml de cette solution bactérienne sur les grandes boîtes de Petri contenant le milieu de sporulation (A.1.2.5.). Etendre l'inoculum sur la surface de la boîte à l'aide d'un écouvillon stérile ou d'une spatule stérile de Drigalsky. Ensemencer ainsi un nombre suffisant de boîtes de Petri. Emballer les boîtes de Petri ensemencées dans un sac de plastique et incuber 3 jours à  $63 \pm 1$  °C.

A.1.3.3.2. Transférer 5 ml de solution de Ringer stérile (A.1.2.6.) sur chaque boîte et laver les spores de la gélose à l'aide d'une spatule stérile ou d'un écouvillon stérile. Transvaser la suspension de spores dans un flacon en verre stérile. Fermer le flacon et l'agiter vigoureusement. La suspension de spores ainsi obtenue doit avoir une turbidimétrie uniforme. Si on observe un floconnage de sédiments, il faut remplacer cette culture par une nouvelle culture préparée à partir de la culture de réserve (A.1.3.1.). Contrôler la suspension de spores à l'aide d'un microscope quant à la pureté et à la sporulation.

A.1.3.3.3. Déterminer le nombre de spores sur le milieu de base après incubation à  $63 \pm 1$  °C pendant 1 h.

A.1.3.3.4. Diluer la suspension à l'aide d'une solution de Ringer stérile (A.1.2.6.) jusqu'à une concentration de environ  $10^7$  spores par ml.

A.1.3.3.5. Une telle solution de spores se conserve 1 an à une température de  $-18$  °C  $\pm$  2 °C.

## A.1.4. Préparation des tubes test ou des microplaques test.

A.1.4.1. Fondre le milieu de base (A.1.2.1.) au maximum 24h avant l'emploi. Le refroidir à 63 °C. Ajouter de manière aseptique par 100 ml de milieu de base, 2 ml de pourpre de bromocrésol (A.1.2.3.) et 2 ml de solution de triméthoprime (A.1.2.2.). Ajuster le pH du milieu à 63 °C à  $8,00 \pm 0,02$  par addition de NaOH 1 M à l'aide d'un pHmètre avec correction de température. Ajouter une quantité telle (soit dans les tubes tests  $\pm$  450  $\mu$ l et sur les microplaques  $\pm$  1 ml) de la solution de spores (A.1.3.3.5.) que le lait de contrôle (A.1.2.7.) (exempt de substances inhibitrices) change complètement de couleur après  $\pm$  4,5h d'incubation.

A.1.4.2. Mélanger et répartir le milieu d'épreuve (A.1.4.1.) dans les tubes test (A.1.5.2.8.) ou dans les cupules de la microplaque (A.1.5.2.8.) en fractions de respectivement 1 ml et 200  $\mu$ l. Laisser le milieu d'épreuve se solidifier. Soigneusement fermés, les tubes d'essais ou les microplaques peuvent se conserver 1 jour à une température de 0-5 °C.

## A.1.5. Appareillage et verrerie.

Matériel courant de laboratoire, notamment :

## A.1.5.1. Appareillage.

A.1.5.1.1. Etuve à circulation d'air forcée réglée à une température de  $63 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.2. Etuve à circulation d'air forcée réglée à  $55 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.3. Bain marie à circulation forcée réglée à  $63 \pm 1$  °C.

A.1.5.1.4. Support pour tubes.

A.1.5.1.5. Micropipettes à volume réglable avec les tips correspondants pour le prélèvement de volumes de 100, 200, 300 et 450  $\mu$ l.

## A.1.5.2. Verrerie et matériel plastique.

## A.1.5.2.1. Flacons à échantillons.

A.1.5.2.2. Boîtes de Petri en verre transparent, incolore ou boîtes préstérilisées en matière plastique, avec un diamètre intérieur de environ 90 mm et une hauteur minimale de 10 mm. Le milieu doit être plat et avoir une épaisseur suffisante.

A.1.5.2.3. Boîtes de Petri en verre transparent, incolore ou préstérilisées en matière plastique, avec un diamètre intérieur d'environ 140 mm. Le milieu doit être plat et avoir une épaisseur suffisante.

## A.1.5.2.4. Flacons d'une capacité de 250 ml.

A.1.5.2.5. Pipettes en verre ou en matériel plastique stérile d'une capacité de 1 et 10 ml.

## A.1.5.2.6. Spatules en verre de Drigalsky.

A.1.5.2.7. Tubes à essais de dimensions 140 x 14 mm.

A.1.5.2.8. Tubes à essais courts de dimensions 85 x 14 mm.

## A.1.5.2.8. Microplaques avec cupules à fond plat.

Remarque : La verrerie peut être stérilisé de la manière suivante :

a) dans un four à air chaud à une température de 170 à 175 °C pendant 1 heure au moins;

b) à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 20 min au moins.

Les pipettes doivent être stérilisées au four à air chaud.

## A.1.6. Mode opératoire.

A.1.6.1. Les échantillons doivent être analysés le plus tôt possible, de préférence dans les 24 heures qui suivent le prélèvement; entretemps, les échantillons doivent être conservés à une température de 0 à 5 °C. Si ce n'est pas possible, conserver les échantillons au congélateur (-30 °C ou -15 °C).

A.1.6.2. Identifier chaque tube (A.1.4.2.) ou cupule (A.1.4.2.) de chaque microplaque contenant le milieu test.

A.1.6.3. Mélanger les échantillons à analyser. Transférer respectivement 300  $\mu$ l ou 100  $\mu$ l de l'échantillon dans un tube à essais (A.1.4.2.) ou dans une cupule de microplaque (A.1.4.2.) contenant le milieu test.

A.1.6.4. Transférer en double respectivement 300  $\mu$ l ou 100  $\mu$ l de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.) dans un tube à essais (A.1.4.2.) ou dans une cupule de microplaque (A.1.4.2.) contenant le milieu test.

A.1.6.5. Transférer en double respectivement 300  $\mu$ l ou 100  $\mu$ l de l'étalon pénicilline (A.1.2.8.) dans un tube à essais (A.1.4.2.) ou dans une cupule de microplaque (A.1.4.2.) remplie de milieu test.

A.1.6.6. Transférer en double respectivement 300  $\mu$ l ou 100  $\mu$ l de l'étalon sulfadimidine (A.1.2.9.) dans un tube à essais (A.1.4.2.) ou dans une cupule de microplaque (A.1.4.2.) remplie de milieu test.

A.1.6.7. Laisser les échantillons et les standards diffuser pendant 1 heure à la température ambiante dans le milieu test.

A.1.6.8. Eliminer le surnageant de lait du milieu test contenu dans les tubes à essais ou les cupules. Eviter ainsi les contaminations entre les tubes ou les cupules. Fermer les tubes ou les cupules et les placer directement ou après conservation à 5 °C (18 heures au maximum) dans un bain-marie à  $63 \pm 1$  °C et incuber jusqu'à ce que le milieu test du lait exempt de substances inhibitrices soit de coloration jaune homogène. Le moment de retrait de l'incubation est déterminé, à partir du moment où la couleur dans les tubes ou cupules d'échantillon de lait de contrôle (A.1.6.4.) commence à changer; on évalue la coloration toutes les 10 minutes.

**A.1.7. Examen des échantillons, interprétation des résultats.**

La coloration du milieu test est évaluée sur les tubes à essais ou les cupules 5 à 10 minutes après retrait du bain-marie.

A.1.7.1. Une coloration pourpre du milieu test montre la présence de substances inhibitrices.

A.1.7.2. Une coloration pourpre dans seulement une partie du milieu test ou une décoloration incomplète (vert jaune, jaune violet) indique la présence possible de substances inhibitrices.

A.1.7.3. Une coloration jaune du milieu test signifie que des substances inhibitrices ne sont pas décelées.

A.1.7.4. Le milieu dans les tubes à essais ou cupules avec le lait exempt de substances inhibitrices doit être coloré en jaune. Si ce n'est pas le cas, la vitalité des spores est insuffisante et l'essai doit être recommencé.

A.1.7.5. Le milieu dans les tubes à essais ou cupules contenant l'étalon de pénicilline (A.1.6.5.) doit être coloré en violet; tandis que le milieu dans les tubes à essais ou cupules contenant l'étalon de sulfadimidine (A.1.6.6.) doit être jaune-violet. Si ce n'est pas le cas, les spores sont insuffisamment sensibles et l'essai doit être recommencé.

**A.1.8. Confirmation des résultats.**

L'épreuve de confirmation des échantillons qui donnent une réaction telle que décrite au points A.1.7.1. et A.1.7.2. est réalisée à l'aide de la méthode B.

**A.2. Delvotest SP (Gist Brocades SA).**

**A.2.1. Principe.**

Le Delvotest SP, basé sur le même principe que le test de diffusion en gélose décrit au point A.1, peut également être utilisé comme méthode de sélection pour la détermination des échantillons de lait positifs ou douteux en ce qui concerne les substances inhibitrices.

Le Delvotest SP peut être utilisé en ampoules ou en microplaques.

**A.2.2. Mode opératoire.**

Tout d'abord, respecter ici aussi les directives relatives à la conservation des échantillons (A.1.6.1.). Procéder ensuite à l'exécution du test selon le volet livré avec le kit. En plus des échantillons à analyser, il est aussi procédé à l'examen en double d'un échantillon de lait exempt d'antibiotique (A.1.2.7.), un étalon de pénicilline (A.1.2.8.) et d'un étalon de sulfadimidine (A.1.2.9.).

**A.2.3. Examen des échantillons, interprétation des résultats.**

L'interprétation de la couleur du milieu test est effectuée après incubation de la même manière que décrite en A.1.7.

**A.2.4. Confirmation des résultats.**

Confirmer tous les échantillons ayant une réaction telle que décrite au point A.1.7.1. et A.1.7.2. avec la méthode B.

**B. Confirmation**

Tout échantillon (A.1.8 ou A.2.4) qui, à l'épreuve de sélection (A.1 ou A.2) contient ou est susceptible de contenir des substances inhibitrices doit être confirmé par la méthode B.1 ou B.2.

Les échantillons doivent au préalable être chauffés à 80 °C pendant 10 minutes au bain-marie avant confirmation. Le niveau d'eau du bain-marie doit être au moins 1 cm au-dessus du niveau du lait. Par chauffage, les éventuelles substances inhibitrices naturelles contenues dans le lait sont détruites. Après le chauffage, les échantillons sont directement refroidis sous courant d'eau froide et conservés ultérieurement à 0-5 °C. Les échantillons où la confirmation est positive sont soumis à la détection des sulfamides selon la méthode B.3 ou B.4. Indépendamment du résultat, les échantillons sont confirmés par la méthode B.5.

**B.1. Confirmation (en tubes à essais ou en microplaques)**

**B.1.1. principe.**

La méthode décrite au point A.1 est répétée sur les échantillons de lait chauffés afin d'éviter de confirmer des échantillons contenant des inhibiteurs naturels.

**B.1.3. Préparation des tubes tests ou des microplaques tests.**

B.1.3.1. Préparation de tubes tests ou des microplaques tests pour la confirmation de la présence de substances inhibitrices non naturelles. Ces tubes ou ces microplaques tests sont préparés selon la méthode décrite au point A.1.4. pour la confirmation de la présence de substances inhibitrices dans le lait.

**B.1.4. Mode opératoire.**

B.1.4.1. Identifier chaque tube à essais (A.1.4.2.) ou chaque cupule de la microplaque (A.1.4.2.).

B.1.4.2. Mélanger les échantillons (A.1.8.): Transférer 300 µl de l'échantillon de lait chauffé sur la gélose test du tube à essais (A.1.4.2.). Pour les microplaques, 100 µl de lait sont prélevés et déposés dans les cupules (A.1.4.2.).

B.1.4.3. Effectuer également une analyse en double de respectivement 300 µl (tubes à essais) ou 100 µl (microplaque) de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.), d'étalon pénicilline (A.1.2.8.) et de sulfadimidine (A.1.2.9.).

B.1.4.4. Laisser les échantillons et les étalons diffuser pendant 1 heure à température ambiante sur le milieu gélosé.

B.1.4.5. Eliminer le surnageant de lait sur la gélose. Fermer les tubes ou les cupules de la plaque et les placer dans un bain-marie à  $63 \pm 1$  °C jusqu'à ce que le milieu test contenant le lait exempt de substances inhibitrices soit complètement coloré en jaune. Le moment de retrait du bain-marie est déterminé de la manière suivante: quand la coloration dans les tubes ou dans les cupules des échantillons de lait exempts d'antibiotiques commence à changer, évaluer cette coloration toutes les minutes.

**B.1.5. Examen des échantillons, interprétation des résultats.**

La couleur du milieu test est examinée sur les tubes à essais ou les cupules environ 5 à 10 minutes après sortie du bain-marie.

**B.1.5.1.** Une couleur jaune du milieu test montre l'absence à un niveau décelable de substances inhibitrices non naturelles dans le lait analysé. Un résultat douteux ou positif de ce même échantillon à l'épreuve de sélection (A.) signifie que des inhibiteurs naturels sont présents dans le lait. L'analyse de ces échantillons n'est pas poursuivie.

**B.1.5.2.** Une couleur pourpre ou irrégulière (vert jaune) du milieu test confirme la présence de substances inhibitrices non naturelles dans l'échantillon de lait. Ces échantillons seront réexaminés quant à la présence de sulfamides (voir B.3 et B.4), et indépendamment du résultat, ils seront contrôlés quant à la présence de pénicilline ou d'autres substances inhibitrices tel que décrit au point B.5.

**B.1.5.3.** Le milieu des tubes à essais ou cupules contenant le lait exempt de substances inhibitrices (A.1.5.4.) doit être coloré en jaune; si ce n'est pas le cas, la vitalité des spores est insuffisante et l'essai doit être reconduit.

**B.1.5.4.** Le milieu des tubes à essais ou cupules contenant l'étalon sulfadimidine doit avoir une coloration jaune violet; si ce n'est pas le cas, la sensibilité des spores est insuffisante et l'essai doit être recommencé.

**B.2. Confirmation (Delvotest SP) en ampoules ou en microplaques****B.2.1. Principe.**

La méthode décrite en A.2 (Delvotest SP) est répétée, mais cette fois avec du lait chauffé, pour confirmer la présence de substances inhibitrices non naturelles dans le lait. Le test peut être effectué dans des ampoules ou dans des microplaques.

**B.2.2. Mode opératoire.**

Le test est entièrement effectué selon les instructions fournies avec le kit. Les laits exempts de substances inhibitrices (A.1.2.7.), les étalons pénicilline (A.1.2.8.) et les étalons sulfadimidine (A.1.2.9.) sont analysés en double avec les échantillons à analyser (A.1.8.).

**B.2.3. Examen des échantillons, interprétation des résultats.**

La couleur du milieu test du Delvotest SP après incubation est jugée et interprétée de manière analogue à celle décrite au point B.1.5.

Tout échantillon où la présence de substances inhibitrices non naturelles est confirmée est réexaminé pour détecter la présence de sulfamides (comme décrit en B.3 et B.4) et indépendamment du résultat, contrôlé quant à la présence de pénicilline ou d'autres substances inhibitrices comme décrit en B.5.

**B.3. Confirmation de la présence des sulfamides (en tubes à essais ou en microplaques)****B.3.1. Principe.**

La méthode décrite en A.1 est répétée avec le lait préalablement chauffé (10 min., 80 °C) et en présence d'acide para amino benzoïque pour confirmer la présence de sulfamides. L'acide para amino benzoïque s'oppose à l'action inhibitrice des sulfamides.

**B.3.2. Solution étalon.****B.3.2.1. Solution d'acide para amino benzoïque.**

Composition : acide para amino benzoïque : 1,0 g  
eau distillée : 200 ml

Préparation : Dissoudre l'acide para amino benzoïque dans l'eau en chauffant légèrement. Refroidir à la température ambiante. Cette solution se conserve au maximum 1 semaine à l'obscurité et à une température de 0-5 °C.

**B.3.3. Préparation des tubes à essais et des microplaques.**

**B.3.3.1.** Les tubes à essais et les microplaques sont préparés comme matériel de référence pour déterminer l'activité de l'acide para-aminobenzoïque. Ces tubes ou ces microplaques sont identiques à ceux utilisés lors de l'épreuve de sélection et de première confirmation et ils sont préparés selon la méthode décrite en A.1.4.

**B.3.3.2. Préparation des tubes tests ou des microplaques test pour la confirmation des sulfamides.**

**B.3.3.2.1.** Fondre au maximum 24h avant emploi le milieu gélosé de base (A.1.2.1.). Le refroidir à 63 °C. Ajouter, de manière aseptique, par 100 ml, 2 ml de pourpre de bromocrésol (A.1.2.3.), 2 ml de solution de triméthoprime (A.1.2.2.) et 2 ml de solution d'acide para amino benzoïque (B.3.2.1.). Ajuster le pH du milieu à 63 °C avec du NaOH 1M à 8,00 ± 0,02 en utilisant un pHmètre avec correction de température.

Ajouter la solution de spores (A.1.3.3.5.) en quantité suffisante pour que le lait exempt de substances inhibitrices change complètement de coloration en ± 4,5h.

**B.3.3.2.2.** Mélanger et répartir le milieu test de détection des sulfamides dans des tubes tests (A.1.5.2.8.) ou dans les cupules de la plaque de microtitration (A.1.5.2.9.), en portions de respectivement 1 ml ou 200 µl. Laisser le milieu test se solidifier. Les tubes tests ou les microplaques peuvent se conserver fermés 1 jour à 0-5 °C.

**B.3.4. Mode opératoire.**

**B.3.4.1.** Identifier chaque tube à essais (A.1.4.2. et B.3.3.2.2.) ou chaque cupule de microplaque (A.1.4.2. et B.3.3.2.2.).

**B.3.4.2.** Mélanger les échantillons à analyser (B.1.5.2. et B.2.3.). Transférer 300 µl de l'échantillon chauffé, dans un tube à essais contenant le milieu test (A.1.4.2.) et dans un tube à essais contenant le milieu test pour les sulfamides (B.3.3.2.2.). Pour le travail en microplaques, 100 µl de l'échantillon de lait sont transférés respectivement dans les cupules de la microplaque (A.1.4.2. et B.3.3.2.2.).

**B.3.4.3.** Réaliser également la détermination en double sur respectivement 300 µl (tubes à essais) ou 100 µl (microplaques) d'un échantillon de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.), sur les mêmes quantités de l'étalon pénicilline (A.1.2.8.) et de l'étalon sulfadimidine (A.1.2.9.).

**B.3.4.4.** Laisser les échantillons et les étalons diffuser pendant 1h à la température ambiante dans le milieu témoin et dans le milieu prévu pour la détection des sulfamides.

**B.3.4.5.** Eliminer le surnageant du milieu test (sulfamides). Fermer les tubes ou les cupules et les placer dans un bain d'eau à  $63 \pm 1$  °C jusqu'à ce que la coloration du milieu test du lait exempt de substances inhibitrices soit jauné et homogène.

Le moment du retrait du bain-marie est déterminé de la manière suivante. Quand la coloration dans les tubes ou dans les cupules des échantillons de lait exempts d'antibiotiques, commence à changer, évaluer cette coloration toutes les 10 minutes.

**B.3.5.** Examen des échantillons, interprétation des résultats.

La coloration du milieu test pour sulfamides est examinée environ 5 à 10 minutes après le retrait des tubes à essais ou des cupules du bain-marie. La coloration du milieu test pour les sulfamides (+ acide para aminobenzoïque) est comparée à celle du milieu test (sans acide para-aminobenzoïque).

**B.3.5.1.** Si l'ajout d'acide paraaminobenzoïque (milieu test pour les sulfamides) produit une coloration moins violette ou moins jaune vert que celle observée dans le milieu test sans acide paraaminobenzoïque avec le même échantillon, cela signifie que cet échantillon contient des sulfamides. Tous les échantillons ne contenant pas de résidus de sulfamides sont traités comme en B.5.

**B.3.5.2.** Le milieu test (pour sulfamides) dans les tubes ou cupules doit avoir une coloration jaune avec le lait de contrôle exempt de substances inhibitrices (A.1.6.4); si ce n'est pas le cas, les spores ont une vitalité insuffisante et l'essai doit être recommencé.

**B.3.5.3.** Le milieu test (pour sulfamides) dans les tubes ou cupules avec l'étalon pénicilline (A.1.6.5.) doit être de coloration violette. Le milieu test ajouté à l'étalon sulfadimidine (A.1.6.6.) doit être de coloration jaune violette, tandis que la coloration de l'étalon sur le milieu test pour sulfamides doit être jaune homogène; si ce n'est pas le cas, l'essai doit être recommencé.

**B.4.** Confirmation des sulfamides (Delvotest SP) en ampoules ou en microplaques

**B.4.1.** Principe.

La méthode décrite au point A.2 (Delvotest SP) est répétée avec le lait chauffé au préalable (10 minutes/80 °C) et en présence d'acide para amino benzoïque pour confirmer la présence de sulfamides.

Les tests peuvent être réalisés en ampoules ou en microplaques.

**B.4.2.** Mode opératoire.

Le test est réalisé entièrement selon le mode opératoire livré avec le kit de détection.

Les échantillons (B.1.5.2. ou B.2.3) sont testés en présence et en absence d'acide para amino benzoïque. Les échantillons de lait exempt de substances inhibitrices (A.1.2.7.), l'étalon de pénicilline (A.1.2.8) et l'étalon de sulfadimidine (A.1.2.9) sont analysés en double avec et sans acide para amino benzoïque en même temps que les échantillons de lait (A.1.8).

**B.4.3.** Examen des échantillons, interprétation des résultats.

Après incubation, la coloration du milieu test du Delvotest SP est examinée et interprétée tel que décrit en B.3.5. La coloration du milieu test de chaque échantillon en présence d'acide para amino benzoïque est comparée à celle du même milieu en absence d'acide para amino benzoïque.

L'analyse de tous les échantillons où la présence de sulfamides n'est pas décelée est poursuivie comme décrit en B.5.

**B.5.** Confirmation des pénicillines (en boîtes de Pétri)

Tous les échantillons montrant une croissance des bactéries ralentie à l'épreuve de sélection (méthode A.1 ou A.2) ou de confirmation (méthode B.1 ou B.2) mais où aucun résidu de sulfamides n'est mis en évidence (méthode B.3 ou B.4) sont contrôlés quant à la présence de pénicillines ou d'autres substances inhibitrices.

**B.5.1.** Définition.

Un échantillon de lait contient de la pénicilline lorsque l'application de la méthode décrite dans ce point donne une zone d'inhibition qui se réduit (pénicilline + autre antibiotique) ou disparaît (pénicilline) après ajout de pénicillinase (bétalactamase) à l'échantillon. Si la zone d'inhibition ne disparaît pas après ajout de pénicillinase, l'échantillon de lait contient une autre substance inhibitrice; la zone d'inhibition ne disparaît qu'en partie lorsque l'échantillon contient de la pénicilline et un autre antibiotique.

**B.5.2.** Principe.

Un disque de papier absorbant imprégné de lait à analyser est placé sur la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec une souche de *Bacillus stearothermophilus* variété calidolactis. La croissance normale des microorganismes rend le milieu gélosé trouble après incubation. La présence d'une zone claire autour du disque révèle la présence dans le lait de substances inhibitrices de la croissance. Le diamètre de la zone claire dépend, entre autres, de la concentration et du type des substances inhibitrices présentes dans le lait.

**B.5.3.** Milieux, solutions étalons, microorganisme test.

Remarque : — les ingrédients des milieux doivent convenir pour les analyses bactériologiques

— l'eau utilisée doit être de l'eau distillée sur verre ou de l'eau déminéralisée de pureté au moins équivalente, exempte de substances pouvant inhiber la croissance des microorganismes.

**B.5.3.1.** Gélose nutritive.

(voir A.1.2.4.)

**B.5.3.2.** Milieu d'essai. — Plate count agar.

(voir A.1.2.1.)

**B.5.3.3.** Solution étalon de pénicilline.

(voir A.1.2.8.)

**B.5.3.4.** Solution de pénicillinase.

Dissoudre une quantité suffisante de pénicillinase (bétalactamase) dans de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 40000 UI/ml. Cette solution, de préférence répartie en petites portions, peut être conservée à 5 °C pendant 4 semaines.

**B.5.3.5. Organisme test.**

(voir A.1.2.10.)

**B.5.3.6. Culture test (suspension de spores).**

(voir A.1.3.3.5.)

**B.5.4. Appareillage et verrerie.****B.5.4.1. Appareillage.**

(voir A.1.5.1.)

**B.5.4.2. Verrerie.**

(voir A.1.5.2.)

**B.5.4.3. Disques de papier filtre spécifiques à la détection d'antibiotiques.**Disques d'un diamètre de 12 à 13 mm<sup>2</sup>.

Un test témoin doit être effectué sur neuf disques de chaque lot de papier filtre. Les disques imbibés d'eau distillée stérile ne peuvent pas présenter de zone claire sur la plaque de Pétri (B.5.5.4.) après incubation de 3 heures à une température entre 55 et 63 °C.

**B.5.5. Mode opératoire.****B.5.5.1. Faire fondre le milieu d'essai (B.5.3.2.) et le refroidir à 55 °C.**

**B.5.5.2. Ajouter, de manière aseptique, une partie de suspension de spores fraîches (B.5.3.6.) à une quantité suffisante de milieu gélosé (5-25) pour obtenir la densité appropriée de colonies dans le milieu d'essai (B.5.3.2.) ensemencé et mélanger soigneusement.**

**B.5.5.3. Transvaser dans une boîte de Pétri stérile et préalablement chauffée à 55 °C, le milieu d'essai ensemencé (B.5.5.2.) de façon à former une couche uniforme de 0,6 à 0,8 mm d'épaisseur (soit 6 ml pour des boîtes de diamètre normal de 90 mm).**

**B.5.5.4. Placer les boîtes de Pétri sur une surface horizontale froide. Laisser solidifier le milieu gélosé. Sécher les boîtes. Retourner les boîtes solidifiées.**

**B.5.5.5. Les boîtes de Pétri ainsi préparées doivent être utilisées de préférence le jour même, mais elle peuvent être conservées 1 semaine au maximum à condition d'être placées à 5 °C dans un sachet en polyéthylène scellé, immédiatement après leur préparation.**

**B.5.6. Réalisation de l'essai.****B.5.6.1. Préparation des échantillons.**

On utilise les échantillons de lait chauffé (10 min, 80 °C). Après mélange, transvaser 9,75 ml de lait dans un flacon stéril et ajouter 0,25 ml de solution de pénicillinase (B.5.3.4.) de telle manière que la concentration en pénicillinase soit de 1000 UI/ml (Rapport échantillon/solution de pénicillinase = 39/1). Bien mélanger et incuber à 37 °C, pendant 1h1/2.

**B.5.6.2. Détection de la pénicilline.**

**B.5.6.2.1. Mélanger soigneusement l'échantillon. Plonger un disque de papier (B.5.4.3.) avec le bord au ras de la surface du lait jusqu'à ce qu'il soit bien imprégné, à l'aide d'une pince propre et sèche. Éliminer le surplus de lait en pressant le disque de papier contre la paroi du flacon. Placer le disque à plat sur la surface de la boîte de Pétri (B.5.5.4.) et appuyer légèrement à l'aide de la pince.**

**B.5.6.2.2. Un disque imprégné de la solution de lait après traitement à la pénicillinase est réalisé pour chaque échantillon (B.5.6.1.).**

**B.5.6.2.3. Les disques doivent se situer à 20 mm au moins les uns des autres et à 10 mm au moins du bord.**

**B.5.6.2.4. Afin de déterminer la sensibilité du test, on place des disques dans la solution étalon de pénicilline (B.5.3.3.). On utilisera au minimum un de ces disques étalons par boîte.**

**B.5.6.2.5. Par boîte de Pétri, on constitue aussi un blanc avec un disque exempt de substances inhibitrices.**

**B.5.6.2.6. La boîte de Pétri où les disques de papier ont été disposés est placée pendant 2,5 à 3 h le couvercle en bas à une température d'incubation de 55 à 63 °C.**

**B.5.6.2.7. Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées quant à la présence de zones d'inhibition. Mesurer ces zones claires. Il doit y avoir des zones claires d'au moins 2 mm autour des disques contenant la solution étalon de pénicilline.**

**B.5.6.2.8. La présence de zones claires d'au moins 2 mm autour des disques contenant l'échantillon de lait révèle la présence de substances inhibitrices.**

**B.5.7. Interprétation des résultats.**

**B.5.7.1. Si aucune zone claire n'apparaît autour du disque contenant la solution témoin de pénicillinase, mais qu'une zone claire d'un diamètre égal ou supérieur à celui de la zone développée, apparaît autour du disque contenant la solution étalon de pénicilline, cela signifie que le taux d'antibiotiques exprimé en benzylpénicillinate de soude est au moins de 0,004 mg/ml. Si la petite zone claire autour du disque de l'échantillon de lait traité à la pénicilline a moins de 2 mm de diamètre, on n'en tient pas compte.**

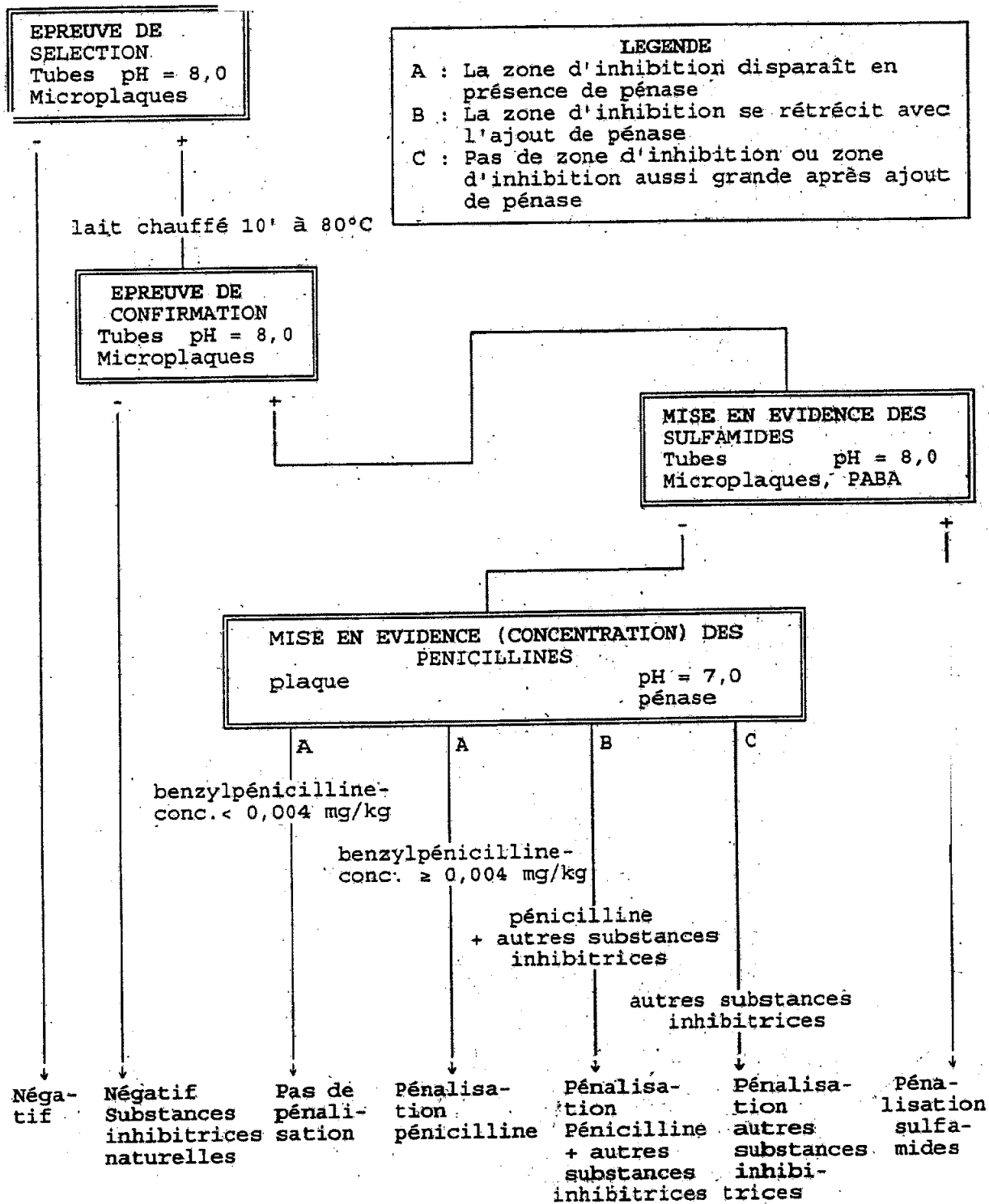
**B.5.7.2. Si le diamètre moyen de la zone d'inhibition autour du disque traité à la pénicillinase est égal au diamètre moyen de la zone claire autour du disque contenant l'échantillon de lait, ce lait contient des substances inhibitrices qui ne sont pas inactivées aux concentrations de pénicillinase utilisées dans la présente méthode.**

**B.5.7.3. Si le diamètre moyen de la zone claire autour du disque contenant la pénicillinase est inférieur au diamètre moyen du disque de l'échantillon de lait, cet échantillon de lait contient à la fois de la pénicilline et une autre substance inhibitrice.**

(\*) : Schleicher & Schuell 601/2 ou une qualité correspondante.



**SCHEMA DU MODE OPERATOIRE POUR LA MISE EN EVIDENCE  
DES SUBSTANCES INHIBITRICES NON NATURELLES DANS LE LAIT**



Remarques concernant le schéma de mise en évidence des substances inhibitrices non naturelles dans le lait.

— Malgré l'utilisation d'un même microorganisme test (*Bacillus stéarothermophilus* var. *calidolactis*), la sensibilité du test dépend de la méthode d'exécution en tubes ou en cupules de microplaques d'une part ou en boîtes de Pétri d'autre part. La sensibilité pour divers antibiotiques est notablement plus grande si on effectue l'essai en tubes ou en microplaques.

— Lors de l'épreuve de confirmation des pénicillines, on doit tenir compte du fait que l'activité antimicrobienne de certaines pénicillines produites partiellement par synthèse n'est pas complètement anéantie par la pénase à une concentration de 1000 U.I./ml.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

### Annexe 9 : Détermination du point de congélation

#### 1. Définition

Point de congélation du lait : valeur mesurée selon la méthode décrite dans la présente norme et exprimée en degrés Celsius (°C).

#### 2. Principe

Refroidissement d'une prise d'essai jusqu'à la température appropriée, en fonction de l'appareil, et amorce de la cristallisation par vibration mécanique entraînant une augmentation rapide de la température jusqu'à un palier correspondant au point de congélation de la prise d'essai.

L'instrument est étalonné de manière à obtenir des lectures correctes pour deux solutions étalons en utilisant le même mode opératoire que pour les échantillons de lait. Dans ces conditions, le palier donne le point de congélation du lait en degrés Celsius.

#### 3. Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

##### 3.1. Cryoscope

Le cryoscope se compose d'un bain de réfrigération contrôlé par thermostat, d'une sonde à thermistance (thermomètre à résistance semi-conductrice) avec circuit associé, d'un galvanomètre, ou « lecteur », d'un agitateur à échantillons, d'un système pour amorcer la congélation et de tubes à échantillon.

##### 1° Bain de réfrigération

Deux types de bain de réfrigération peuvent être utilisés.

##### a) Type à immersion.

Ce type consiste en un bain parfaitement isolé contenant un liquide de refroidissement approprié agité de manière que la différence de température entre deux points quelconques du liquide ne dépasse pas 0,2 °C. La température du liquide ne doit pas varier de plus de ± 0,5 °C de la valeur nominale établie par le fabricant.

Il est important que le liquide dans le bain soit maintenu à un niveau constant. Toute la surface du tube à échantillon au-dessous du trait repère de volume doit être recouverte par le liquide de refroidissement.

##### b) Type à circulation.

Un courant continu de liquide de refroidissement approprié circule autour du tube à échantillon. La température du liquide ne doit pas varier de plus de ± 0,5 °C de la valeur nominale déclarée par le fabricant.

Une solution aqueuse de 1,2 éthanediol (éthylèneglycol) à 33 % (v/v) constitue un liquide de refroidissement approprié.

##### 2° Thermistance et circuit connexe

La thermistance doit être du type sonde en verre (diamètre maximal 1,60 ± 0,2 mm et diamètre conducteur maximal de 0,31 mm). La constante de temps de la thermistance doit être inférieure à 2 secondes et la valeur de  $\beta$  (voir note) doit être élevée. La tension de service, le courant et la constante de dissipation doivent être tels que la température de la thermistance ne s'élève pas de plus de 0,0005 °C autour de - 0,512 °C. La tolérance maximale de la résistance doit être de ± 5 %.

Quand la sonde est en position de service dans le cryoscope, l'extrémité de la partie en verre doit se trouver dans l'axe du tube à échantillon et à 44,8 ± 0,1 mm au-dessous du sommet du tube (voir figure 1). Un centreur doit être fourni pour permettre à l'utilisateur de placer la sonde dans cette position.

##### Note

$\beta$  définit les caractéristiques thermiques de la thermistance selon la formule :

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2}$$

où

T représente la température en degrés Kelvin,

R représente la résistance en ohms à la température T,

$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R}$  représente le coefficient de température.

$\beta$  est une constante qui dépend du matériau utilisé pour la fabrication de la thermistance. En pratique courante, une valeur supérieure à 3.000 est couramment recommandée.

##### 3° Appareil de mesure et de lecture

##### a) Principe de mesure.

L'instrument utilisé doit opérer selon le principe de recherche du premier « palier » dans la courbe du point de congélation. Le palier correspond à la partie de la courbe dans laquelle la température reste constante à ± 0,002 °C près pendant 20 secondes au minimum.

## b) Opération manuelle.

La résistance de la thermistance doit être équilibrée au moyen d'un pont de Wheatstone ou d'un appareil similaire, en utilisant des résistances stables de qualité supérieure dont la tolérance maximale est de  $\pm 10\%$  et dont le coefficient de température ne dépasse pas  $2 \times 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}$ .

La résistance de référence doit avoir une linéarité dans sa gamme d'utilisation meilleure que  $0,3\%$  de sa valeur maximale.

Il doit être possible d'ajuster les résistances pour un étalonnage.

L'écart entre les graduations du cadran de mesure ne doit pas être supérieur à  $0,001 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

## c) Opération automatique.

L'appareil de lecture doit permettre de distinguer au moins  $0,001 \text{ } ^\circ\text{C}$  dans la gamme de  $0$  à  $-1 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

La stabilité de l'appareil de lecture et de son circuit associé doit être telle que l'écart ne soit pas supérieur à  $0,001 \text{ } ^\circ\text{C}$  entre deux lectures successives d'une même température.

La linéarité du circuit doit être telle qu'aucune erreur supérieure à  $\pm 0,001 \text{ } ^\circ\text{C}$  ne s'introduise en un point quelconque dans la gamme  $-0,400$  à  $-0,600 \text{ } ^\circ\text{C}$  quand l'appareil est utilisé correctement.

## 4° Agitateur

Pour agiter la prise d'essai, utiliser une tige en métal, inerte vis-à-vis du lait, ayant un diamètre compris entre  $1$  et  $1,5 \text{ mm}$ .

L'agitateur doit être réglé en amplitude et installé verticalement, son extrémité inférieure étant au même niveau que la pointe de la sonde à thermistance. Une tolérance d'environ  $1,5 \text{ mm}$  au-dessus ou au-dessous de cette position est admise.

L'agitateur doit vibrer latéralement avec une amplitude suffisante indiquée par le fabricant (au moins  $\pm 1,5 \text{ mm}$ ) pour assurer une température uniforme à la prise d'essai pendant la détermination. Au cours de son fonctionnement, l'agitateur ne doit, à aucun moment, toucher la sonde à thermistance ou la paroi du tube.

## 5° Dispositif permettant d'amorcer la congélation

Ce dispositif peut être n'importe quel appareil qui, en fonctionnant, amorce instantanément la congélation de la prise d'essai, de telle sorte que la température de cette prise d'essai s'élève au voisinage du point de congélation. L'agitateur peut être utilisé à cet effet; une des méthodes consiste à augmenter l'amplitude de vibration pendant  $1$  à  $2$  secondes, de façon que l'agitateur touche la paroi du tube à échantillon.

## 6° Tubes à échantillon

Les tubes à échantillon (voir figure 1) doivent être en verre de  $50,8 \pm 0,1 \text{ mm}$  de longueur,  $16,0 \pm 0,1 \text{ mm}$  de diamètre extérieur et  $13,5 \pm 0,1 \text{ mm}$  de diamètre intérieur. L'épaisseur du verre ne doit pas varier de plus de  $0,1 \text{ mm}$  sur l'ensemble de la paroi.

Les tubes doivent avoir un trait repère situé  $29,8 \text{ mm}$  au-dessous du bord ( $21 \text{ mm}$  au-dessus de la base du tube) pour indiquer un volume d'échantillon de  $2,5 \pm 0,1 \text{ ml}$ .

## 7° Alimentation électrique

La tension d'alimentation doit être stabilisée, soit à l'intérieur ou à l'extérieur de l'appareil, de sorte que les fluctuations éventuelles ne dépassent pas  $\pm 1\%$  de la valeur nominale quand l'alimentation principale varie de  $\pm 6\%$ .

## 3.2. Balance analytique.

3.3. Fioles jaugées à un trait de  $1.000 \text{ ml}$  de capacité, classe A.

3.4. Etuve, bien ventilée, réglable à  $130 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

-ou four électrique, ventilé, réglable à  $300 \pm 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

3.5. Dessiccateur.

## 4. Réactifs

4.1. Eau distillée dans un appareil en verre borosilicaté, bouillie et refroidie à  $20 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$  dans une fiole pourvue d'un tube absorbant l'anhydride carbonique.

4.2. Chlorure de sodium, de qualité analytique, finement broyé, séché pendant cinq heures à  $300 \pm 25 \text{ } ^\circ\text{C}$  dans le four électrique ou séché dans l'étuve à  $130 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$  pendant au moins 24 heures et refroidi à la température ambiante dans un dessiccateur efficace.

## 4.3. Solutions étalons

Peser la quantité appropriée (voir tableau 1) de chlorure de sodium séché (4.2) dans un vase à peser. Dissoudre dans l'eau (4.1), transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de  $1.000 \text{ ml}$  et compléter au trait repère avec l'eau à  $20 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Conserver cette solution pendant 2 mois au maximum à  $5 \text{ } ^\circ\text{C}$  environ dans des flacons en polyéthylène bien bouchés d'une capacité maximale de  $250 \text{ ml}$ .

Tableau 1 — Point de congélation de solutions de chlorure de sodium à  $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ 

g NaCl/l	$^\circ\text{C}$
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Avant d'utiliser une solution étalon, la mélanger soigneusement par agitation et retournements successifs du flacon. Ne pas agiter violemment la solution étalon, afin d'éviter l'incorporation d'air.

Les prises d'essai d'une solution étalon doivent être effectuées par écoulement dans un gobelet sec et propre. Ne pas utiliser de pipettes.

Ne pas utiliser de solutions contenues dans des flacons aux trois-quarts vides et ne pas utiliser de solutions ayant plus de deux mois si elles ne contiennent pas un fongicide (solution de thiomersal à 10 g/l par exemple).

#### 5. Etalonnage du cryoscope à thermistance

Le cryoscope doit être réglé, de telle sorte que la température ambiante ne s'écarte pas de plus de 1 °C de la température d'étalonnage. Le cryoscope ne peut pas être exposé à la lumière du soleil, aux courants d'air ou à une température ambiante dépassant 26-27 °C.

S'assurer que le cryoscope est en état de fonctionnement conformément aux indications du fabricant et qu'il a été mis en service 12 h au moins avant de procéder à l'étalonnage. Vérifier la position de la sonde, l'amplitude des vibrations de l'agitateur et la température des fluides cryogéniques.

Choisir deux solutions étalons (voir tableau 1) qui encadrent de près la valeur supposée du point de congélation supposé du lait à analyser. La différence entre les points de congélation des deux solutions devrait, de préférence, ne pas dépasser - 0,100 °C.

(Avec certains types de cryoscopes actuellement disponibles, le circuit associé à la thermistance est conçu de manière à se stabiliser sur une valeur spécifique du point de congélation dans la gamme des mesures de l'appareil. Dans ce cas, la sélection, parmi les solutions étalons, d'une solution étalon ayant ce point de congélation facilite l'étalonnage; le fabricant doit indiquer cette valeur).

Introduire à l'aide d'une pipette  $2,5 \pm 0,1$  ml d'une solution étalon dans un tube à échantillon propre et sec, puis procéder à la mesure à l'aide du cryoscope.

#### Note

Les tubes à échantillon utilisés pour l'étalonnage doivent être fabriqués et traités comme ceux utilisés pour les échantillons de lait (même type de verre, lavés et rincés avec de l'eau déminéralisée). Les températures des solutions étalons doivent être identiques à celles des échantillons de lait.

Procéder aux contrôles d'étalonnage, en respectant les indications du fabricant, jusqu'à ce que la lecture du cryoscope soit identique au point de congélation de la solution étalon. Répéter cette opération avec l'autre solution étalon et continuer en alternant de la sorte jusqu'à ce que les lectures successives donnent, pour chaque solution, la valeur correcte de leur point de congélation sans réglage supplémentaire. Le cryoscope est alors prêt à l'emploi et indique directement, sans correction, le point de congélation de l'échantillon de lait.

#### 6. Préparation de l'échantillon à analyser

6.1. Si nécessaire, conserver les échantillons à une température entre 0 et 5 °C.

6.2. Eliminer de l'échantillon tout corps étranger visible ou toute matière grasse solide par filtrage, si nécessaire, dans un récipient sec et propre et mélanger doucement l'échantillon. Si un filtre est utilisé, il doit être inerte vis-à-vis du lait et efficace à la température du laboratoire.

6.3. Le lait peut être analysé à sa température de conservation (entre 0 et 5 °C) ou peut être amené à la température du laboratoire immédiatement avant de commencer l'analyse. Lors de leur utilisation, les solutions étalons et les échantillons de lait doivent cependant être à la même température.

6.4. Déterminer l'acidité titrable du lait, autant que possible, en même temps que la détermination du point de congélation. Les échantillons dont l'acidité dépasse 0,18 g d'acide lactique pour 100 ml de lait ne peuvent pas être analysés.

6.5. Le lait UHT et le lait stérilisé doivent reposer au moins 20 minutes dans un récipient ouvert avant d'être analysés.

#### 7. Mode opératoire

##### 7.1. Vérifications préliminaires

S'assurer que le niveau et la température du liquide de refroidissement sont conformes aux indications du fabricant et que la sonde à thermistance se trouve dans un tube à essai vide, à l'emplacement exact de l'échantillon. Mettre le cryoscope en service et s'assurer que le liquide de refroidissement est convenablement agité ou circule correctement selon le cas. Si le cryoscope a fonctionné pendant 12 h au moins, vérifier la température du liquide de refroidissement de même que la position de l'agitateur et l'amplitude de ses vibrations.

##### 7.2. Vérification de routine de l'étalonnage

Avant chaque série d'essais, mesurer le point de congélation d'une solution étalon de chlorure de sodium (par exemple, une solution ayant un point de congélation de -0,512 °C) jusqu'à ce que les valeurs obtenues à l'issue de deux déterminations consécutives ne diffèrent pas de plus de 0,001 °C. Si la moyenne de ces valeurs diffère de plus de 0,002 °C du point de congélation de la solution étalon, étalonner à nouveau le cryoscope comme décrit au point 5.

Si le cryoscope est utilisé en continu, effectuer la vérification de routine de l'étalonnage au moins une fois par heure, en respectant les indications du fabricant.

##### 7.3. Détermination du point de congélation du lait

Mélanger le récipient contenant l'échantillon de lait par agitations modérées et retournements successifs. Eviter d'agiter violemment l'échantillon afin d'éviter toute incorporation d'air.

Introduire à l'aide d'une pipette  $2,5 \pm 0,1$  ml de lait dans un tube à échantillon sec et propre. S'assurer que la sonde et l'agitateur sont propres et secs, les essuyer si nécessaire de bas en haut avec un tissu doux, propre et ne peluchant pas.

Placer le tube à échantillon dans le cryoscope étalonné en suivant les indications du fabricant. Le lait est refroidi et la congélation amorcée, à  $\pm 0,1$  °C près de la température indiquée par le fabricant.

(Sur certains appareils automatiques, cette température peut être relevée sur le lecteur digital; sur les appareils manuels, la précision nécessaire est obtenue en s'assurant que la congélation débute lorsque l'aiguille ou le fil du galvanomètre coïncide avec le repère approprié).

Si, pour une raison quelconque, la congélation débute avant ou après la plage de température indiquée, arrêter l'analyse et la recommencer avec une autre prise d'essai de lait. Si cette deuxième prise d'essai congèle aussi avant la température indiquée, chauffer une fraction aliquote du lait à examiner à 45 °C et la maintenir à cette température pendant cinq minutes pour permettre la fusion de la matière grasse cristalline.

Refroidir ensuite à la température d'essai et procéder immédiatement à une nouvelle analyse. La température du lait après le début de la congélation augmente rapidement jusqu'à une valeur qui reste pratiquement constante pendant un certain temps avant de redescendre. Le point de congélation correspond à la température la plus élevée atteinte durant cette période, valeur qu'il convient de relever.

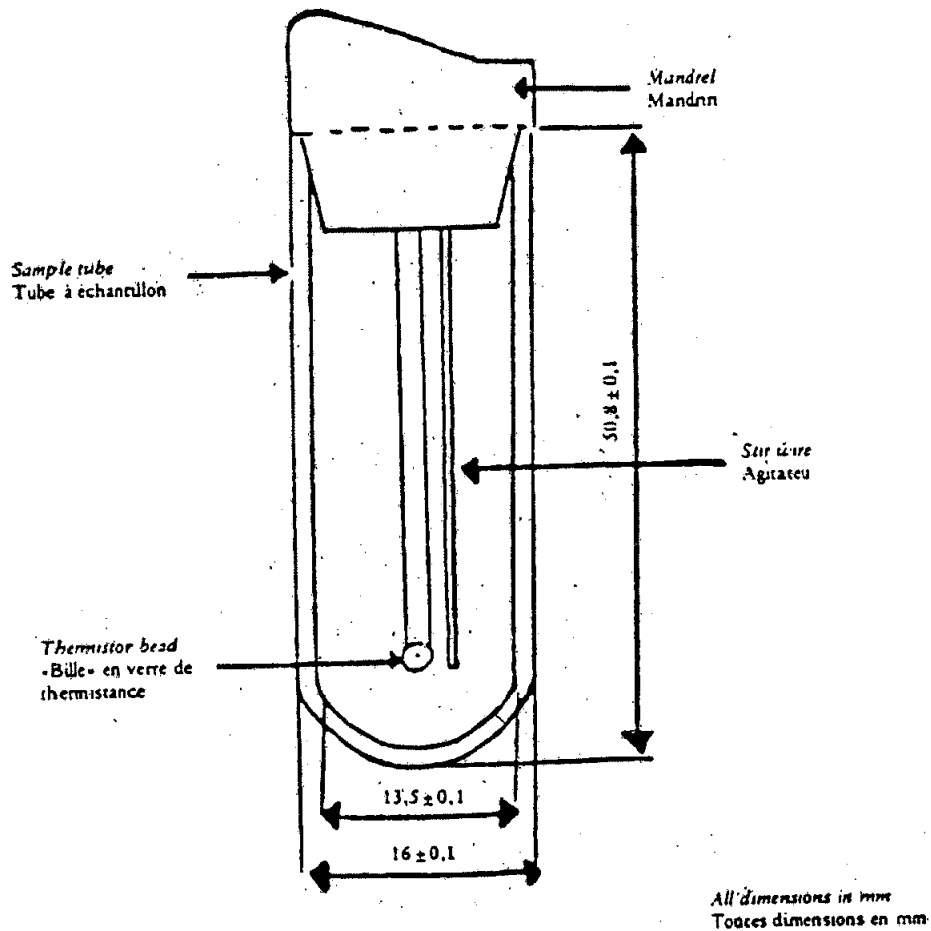
## Note

Le temps pendant lequel la température reste constante et l'intervalle de temps entre le début de la congélation et l'obtention de la température la plus élevée diffèrent d'un échantillon à l'autre et sont considérablement plus courts pour l'eau et les solutions étalons de chlorure de sodium que pour le lait. Il est essentiel de relever la température la plus élevée.

Lorsque la mesure est effectuée de façon satisfaisante, enlever le tube, le rincer à l'eau puis essuyer de bas en haut la sonde à thermistance et l'agitateur avec un tissu doux, propre et ne peluchant pas et procéder à une seconde détermination sur une autre prise d'essai.

Si la différence entre les points de congélation obtenus est supérieure à la valeur de la répétabilité (0,004 °C), effectuer une seconde détermination sur une autre prise d'essai. Si les valeurs des deux déterminations concordent à 0,004 °C près, elles devraient être retenues et utilisées pour le calcul du résultat final.

Détail du cryoscope à thermistance (position du tube à essai par rapport à la bille de la thermistance et à l'agitateur).



**7.4. Refroidissement de la sonde**

Après utilisation de l'appareil, placer un tube à échantillon vide à l'emplacement de l'échantillon et abaisser le mandrin de façon à garder la sonde au froid.

(Avec certains types de cryoscope, cela n'est pas possible; s'assurer dans ce cas que la sonde est bien refroidie avant d'effectuer les mesures en procédant par exemple à plusieurs déterminations factices jusqu'à obtention de lectures identiques).

**8. Expression des résultats****8.1. Calcul**

Si l'étalonnage est confirmé après vérification de l'étalonnage en routine, prendre comme résultat la moyenne des deux valeurs acceptables obtenues pour le point de congélation arrondi à la troisième décimale.

Si la somme des deux valeurs acceptables de déterminations effectuées en double est un nombre impair, la moyenne doit être arrondie à la valeur paire la plus proche comme le montre l'exemple suivant :

Point de congélation ( °C )

Valeurs des déterminations en double	Moyenne
- 0,544      - 0,545	- 0,544
- 0,545      - 0,546	- 0,546

**8.2. Répétabilité (r) : 0,004 °C.**

**Reproductibilité (R) : 0,006 °C.**

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

**Annexe 10 : Examen de la propreté visible****1. Principe**

La détermination de la propreté visible est réalisée par une épreuve de filtration. Celle-ci consiste à filtrer, à l'aide d'un appareil de filtration, un volume défini de lait à travers un petit disque d'ouate.

**2. Equipement****2.1. Appareillage**

L'appareil de filtration doit être approuvé par le Ministère de l'Agriculture.

**2.2. Disques d'ouate**

- disques d'ouate correspondant à la qualité déterminée par le Ministère de l'Agriculture.
- disques d'ouate standards parmi lesquels un disque dont le dépôt est de 0,25 US.

**3. Exécution**

Environ 40 ml de lait sont aspirés ou refoulés sans interruption avec l'appareillage, à travers un disque d'ouate, de surface circulaire, dont le diamètre est de 6,4 mm.

En dérogation à ce qui a été écrit auparavant, le test de filtration peut aussi être effectué sur des échantillons d'environ 200 ml à 250 ml de lait.

La surface filtrante doit avoir, dans ce cas, un diamètre de respectivement 14 ou 18 mm.

Après utilisation, les disques sont séchés. Il est impératif d'éviter le brunissement par la chaleur.

**4. Interprétation**

L'interprétation a lieu sur les disques secs. La classification se fait par comparaison aux disques standards.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

## Annexe 11 : Recherche de la présence de traces de désinfectants (oxydants)

## 1. Principe

Par l'action d'oxydants sur l'iodure de potassium en milieu acide, l'iode est libéré et coloré en bleu par une solution d'amidon.

## 2. Produits chimiques

Les produits chimiques doivent être de qualité « pour analyse ». L'eau utilisée est de l'eau déminéralisée.

## 2.1. Acide chlorhydrique 36 — 38 % (exempt de chlore)

A conserver à l'obscurité

## 2.2. Solution d'amidon 2 %

La solution peut être conservée au frigo pendant une semaine. Utiliser de préférence un amidon selon Zulkowsky.

## 2.3. Solution d'iodure de potassium 10 %

La solution doit être préparée le jour de l'exécution de l'épreuve et elle doit être conservée à l'obscurité.

## 2.4. Solution de chloramine T

— préparation de la solution A

Peser 0,1 gr de chloramine T p.a. ( $C_7H_7ClN_2O_2 \cdot 3H_2O$ ).

Transférer dans un ballon jaugé de 50 ml et porter au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée. Bien mélanger. Cette solution conservée à 4°C, peut être utilisée pendant une semaine maximum.

— préparation de la solution B

Pipetter 3 ml de la solution A et ajouter 17 ml de lait. Utiliser de préférence du lait cru de différentes fermes, qui ne subit aucun changement de coloration (voir paragraphe 4 : exécution).

Bien mélanger. Cette solution constitue la solution standard et est équivalente à 20 ppm de chlore actif.

Cette solution peut au maximum être utilisée pendant 3 jours et doit être conservée au frais et à l'obscurité.

## 3. Equipement

## 3.1. Des tubes à essais

## 3.2. Des pipettes de 1 ml, graduées au 0,1 ml.

Les tubes à essais et pipettes doivent être secs et bien nettoyés.

## 4. Exécution

Veiller à ce que lors de l'exécution des points 4.1. à 4.4., la paroi du tube à essais se trouvant au-dessus de la surface du liquide ne soit pas mouillée, afin d'éviter des réactions faussement positives.

4.1. Pipetter 1 ml de lait à analyser au fond d'un tube à essais. Pipetter de la même manière 1 ml de chloramine T (solution B) dans un autre tube à essais.

4.2. Ajouter à chaque tube à essais 0,1 ml de la solution d'iodure de potassium et 0,1 ml de la solution d'amidon. Bien mélanger.

4.3. Ajouter à chaque tube à essais 1 ml d'acide chlorhydrique sans que celui-ci ne touche la paroi du tube à essais.

4.4. Mélanger immédiatement après addition de l'acide.

4.5. Apprécier la couleur après 3 minutes.

Considérer l'échantillon comme positif lorsque la coloration de l'échantillon est d'intensité égale ou supérieure à celle du standard.

4.6. Quand on effectue des séries d'analyses, il faut recommencer l'épreuve lorsqu'un échantillon réagit positivement. Si la réaction est à nouveau positive, on estime que l'échantillon contient des traces d'oxydants.

## Remarques :

— il est impératif de respecter scrupuleusement la durée de 3 minutes, nécessaire au développement de la coloration.

— en routine, il est conseillé d'effectuer les analyses par petites séries.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

## Annexe 12 : Détermination de la teneur en matière grasse

## 1. Principe

Extraction d'une solution ammoniac-éthanolique d'une prise d'essai au moyen d'oxyde diéthylique et d'éther de pétrole, élimination des solvants par distillation ou évaporation puis détermination de la masse des substances extraites solubles dans l'éther de pétrole (méthode habituellement connue sous le nom de Röse-Gottlieb).

## 2. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue et ne doivent pas laisser de résidu appréciable lors de l'essai à blanc.

Pour vérifier la qualité des réactifs, effectuer une détermination comme spécifié au point 4.3. Pour le pesage, utiliser une fiole, un gobelet ou une capsule métallique vide, préparés en tant que tare comme indiqué au point 4.4 (pour pouvoir corriger l'incidence de modifications des conditions atmosphériques sur le poids obtenu). Si le résidu global, corrigé en fonction des modifications apparentes de la masse de la tare, est supérieur à 2,5 mg, déterminer le résidu des solvants en évaporant respectivement 100 ml d'oxyde diéthylique et 100 ml d'éther de pétrole. Utiliser également une tare pour le pesage. Si le résidu est supérieur à 2,5 mg, nettoyer le solvant par distillation ou le remplacer.

2.1. Hydroxyde d'ammonium, solution à environ 25 % (m/m) de  $\text{NH}_3$ . Une solution d'hydroxyde d'ammonium plus concentrée peut également être utilisée.

2.2. Ethanol, au moins 94 % (v/v). De l'éthanol dénaturé par du méthanol peut être utilisé pour autant qu'il soit certain que cela ne modifiera en rien les résultats de la détermination.

2.3. Rouge congo ou rouge de crésol

Dissoudre 1 g de rouge congo ou de rouge de crésol dans l'eau et diluer à 100 ml.

## Note

L'emploi de cette solution, qui permet de mieux voir l'interface entre le solvant et la couche aqueuse, est facultatif. D'autres solutions aqueuses de colorants peuvent être utilisées pour autant qu'elles ne modifient pas le résultat de la détermination.

2.4. Oxyde diéthylique, exempt de peroxydes, ne contenant pas plus de 2 mg/kg d'antioxydants et conforme aux spécifications de l'essai à blanc.

2.5. Ether de pétrole ayant un point d'ébullition entre 30 et 60 °C.

2.6. Mélange de solvants préparé peu de temps avant l'emploi par mélange de volumes égaux d'oxyde diéthylique et d'éther de pétrole.

## 3. Appareillage et verrerie

## Avertissement

Etant donné que la détermination fait intervenir des solvants volatils inflammables, l'appareillage électrique utilisé doit être conforme à la législation relative à l'emploi de ces solvants.

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

3.1. Balance analytique

3.2. Centrifugeuse dans laquelle les fioles ou les tubes d'extraction peuvent être soumis à une vitesse de rotation de 500 à 600  $\text{tr}/\text{min}^{-1}$  de façon à produire un champ de gravitation de 80 à 90 g à l'extrémité extérieure des fioles ou des tubes.

## Note

L'emploi d'une centrifugeuse est facultatif.

3.3. Appareils de distillation ou d'évaporation permettant de distiller les solvants et l'éthanol des fioles ou de les évaporer des béchers et des capsules à une température n'excédant pas 100 °C.

3.4. Etuve, à chauffage électrique, munie d'ouies de ventilation complètement ouvertes, réglables à une température de  $102 \pm 2$  °C dans l'espace utilisé. L'étuve doit être munie d'un thermomètre convenable.

3.5. Bain d'eau réglable à une température de 35 à 40 °C.

3.6. Fioles d'extraction de la matière grasse, type Mojonier

## Note

On peut également utiliser des tubes d'extraction de la matière grasse munis d'un siphon ou d'un dispositif de lavage dont le mode opératoire, différent dans ce cas, est décrit au point 6.

Les fioles (ou les tubes) doivent être pourvus de bouchons en liège de bonne qualité ou en une autre matière inaltérable aux réactifs utilisés. Les bouchons en liège doivent être lavés à l'oxyde diéthylique, maintenus dans l'eau à 60 °C ou plus pendant au moins 15 minutes et ensuite mis à refroidir dans l'eau, de façon à en être imprégnés au moment de l'emploi.

3.7. Portoir pour maintenir les fioles (ou les tubes) d'extraction de la matière grasse.

3.8. Flaçon de lavage approprié à l'emploi du mélange de solvants. Ne pas utiliser de flacon en plastique.

3.9. Récipients pour la récupération de la matière grasse, par exemple fioles à ébullition (fioles à fond plat) ou d'Erlenmeyer d'une capacité de 125-250 ml ou capsules métalliques. Lorsqu'on utilise des capsules métalliques, elles doivent, de préférence, être en acier inoxydable, à fond plat, avec un bec et elles doivent avoir un diamètre de 80 à 100 mm et une hauteur d'environ 50 mm.

3.10. Régulateurs d'ébullition, exempts de matière grasse, en porcelaine non poreuse, en carbure de silicium ou billes de verre (emploi facultatif dans le cas de capsules métalliques).

3.11. Eprouvettes graduées de 5 et 25 ml de capacité.

3.12. Pipettes graduées de 10 ml de capacité.

3.13. Pinces métalliques permettant de tenir les fioles, béchers ou capsules.



#### 4. Mode opératoire

##### 4.1. Préparation de l'échantillon pour essai

Amener la température de l'échantillon pour essai à 35-40 °C environ pendant 15 minutes en utilisant le bain d'eau si nécessaire. Mélanger convenablement, mais doucement, l'échantillon en retournant plusieurs fois le récipient sans provoquer de mousse ou de barattage et refroidir rapidement à 20 °C environ.

##### 4.2. Prise d'essai

Mélanger l'échantillon (4.1) en retournant doucement le récipient trois ou quatre fois et peser immédiatement, à 1 mg près, 10 à 11 grammes de l'échantillon pour essai, directement ou par différence, dans une fiole d'extraction.

La prise d'essai doit être placée le plus complètement possible dans le bulbe inférieur (étroit) de la fiole d'extraction.

##### 4.3. Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en même temps que la détermination en utilisant le même mode opératoire et les mêmes réactifs, mais en remplaçant la prise d'essai par 10 à 11 ml d'eau.

Le changement de masse apparent du récipient de récupération de la matière grasse, corrigé du changement apparent de masse du récipient de contrôle, ne doit pas être supérieur à 2,5 mg.

##### 4.4. Préparation du récipient pour la récupération de la matière grasse

Sécher un récipient contenant quelques régulateurs d'ébullition — pour permettre une ébullition modérée au cours de l'élimination ultérieure du solvant — dans l'étuve pendant une heure. Laisser refroidir le récipient (non dans un dessiccateur, mais à l'abri de la poussière) à la température de la salle des balances (pendant une heure au moins pour les récipients en verre et pendant 30 minutes au moins pour les capsules métalliques). À l'aide de pinces (en particulier pour éviter les écarts de température), placer le récipient sur la balance et peser à 0,1 mg près.

##### 4.5. Détermination

4.5.1. Ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium ou un volume équivalent, d'une solution plus concentrée et mélanger vigoureusement avec la prise d'essai dans le bulbe étroit de la fiole. Après addition de l'hydroxyde d'ammonium, effectuer la détermination sans attendre.

4.5.2. Ajouter 10 ml d'éthanol et mélanger doucement, mais convenablement, en laissant le contenu de la fiole aller et venir entre les deux bulbes : éviter d'amener le liquide trop près du col de la fiole. Ajouter, éventuellement, deux gouttes de solution de rouge congo ou de rouge de cresol.

4.5.3. Ajouter 25 ml d'oxyde diéthylique fermer la fiole avec un bouchon en liège saturé d'eau ou avec un bouchon mouillé avec de l'eau, agiter la fiole vigoureusement, mais sans excès (afin d'éviter la formation d'émulsions persistantes), pendant une minute en position horizontale, le bulbe étroit étant en haut. De temps en temps, laisser le liquide du bulbe large passer dans le bulbe étroit. Si nécessaire, refroidir la fiole à l'eau courante puis retirer avec précaution le bouchon en liège ou le dispositif de fermeture et le rincer ainsi que le col de la fiole avec une petite quantité de mélange de solvants en se servant du flacon de lavage, de façon à ce que les liquides de rinçage coulent dans la fiole.

4.5.4. Ajouter 25 ml d'éther de pétrole, obturer la fiole à l'aide du bouchon en liège réhumidifié (réhumidification par trempage dans de l'eau) ou d'un autre dispositif de fermeture et agiter doucement la fiole pendant 30 secondes comme décrit, au point 4.5.3.

4.5.5. Centrifuger la fiole bouchée pendant 1 à 5 minutes à une vitesse de rotation de 500 à 600 tr/min<sup>-1</sup>. En l'absence d'une centrifugeuse, laisser la fiole bouchée reposer dans le portoir pendant 30 minutes au moins jusqu'à ce que la couche surnageante soit claire et nettement séparée de la couche aqueuse. Si nécessaire, refroidir la fiole à l'eau courante.

4.5.6. Enlever avec précaution le bouchon en liège ou tout autre dispositif de fermeture et le rincer ainsi que l'intérieur du col de la fiole avec un peu de mélange de solvants de façon à ce que les liquides de rinçage coulent dans la fiole.

Si l'interface se situe au-dessous du fond du col de la fiole, la faire monter à ce niveau en ajoutant doucement de l'eau par le côté de la fiole, afin de faciliter la décantation du solvant.

4.5.7. En tenant la fiole d'extraction par le bulbe étroit, décanter avec soin le plus possible de la couche surnageante dans le récipient préparé, destiné à la récupération de la matière grasse contenant quelques régulateurs d'ébullition dans le cas des fioles (facultatif avec les capsules métalliques), en évitant de décanter une partie quelconque de la couche aqueuse.

4.5.8. Rincer l'extérieur du col de la fiole d'extraction avec un peu de mélange de solvants en recueillant les liquides de rinçage dans le récipient destiné à la récupération de la matière grasse et en veillant à ce que le mélange de solvants ne soit pas projeté sur l'extérieur de la fiole d'extraction.

Le solvant peut, éventuellement, être éliminé totalement ou partiellement du récipient par distillation ou évaporation comme décrit au point 4.5.12.

4.5.9. Ajouter 5 ml d'éthanol au contenu de la fiole d'extraction en se servant de l'éthanol pour rincer l'intérieur du col de la fiole et mélanger comme décrit au point 4.5.2.

4.5.10. Effectuer une deuxième extraction en recommençant les opérations décrites aux points 4.5.3 à 4.5.8, mais en utilisant seulement 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole : utiliser l'oxyde diéthylique pour rincer l'intérieur du col de la fiole d'extraction. Si nécessaire, faire monter l'interface au milieu du col de la fiole, pour permettre à la décantation finale des solvants d'être aussi complète que possible.

4.5.11. Effectuer une troisième extraction en répétant à nouveau les opérations décrites aux points 4.5.3 à 4.5.8, mais en utilisant seulement 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole : utiliser l'oxyde diéthylique pour rincer l'intérieur du col de la fiole d'extraction. Si nécessaire, faire monter l'interface au milieu du col de la fiole d'extraction pour permettre à la décantation finale des solvants d'être aussi complète que possible.

La troisième extraction peut être supprimée dans le cas du lait écrémé.

4.5.12. Éliminer les solvants (éthanol y compris), aussi complètement que possible, de la fiole par distillation ou du bécher ou de la capsule par évaporation, en rinçant l'intérieur du col de la fiole avec un peu de mélange de solvants avant de commencer la distillation.

4.5.13. Chauffer le récipient destiné à la récupération de la matière grasse (la fiole étant penchée pour permettre aux vapeurs de solvants de s'échapper) durant une heure dans l'étuve. Retirer le récipient destiné à la récupération de la matière grasse de l'étuve, laisser refroidir (pas dans un dessiccateur, mais à l'abri de la poussière) à la température de la salle des balances (pendant une heure au moins pour les récipients en verre, pendant 30 minutes au moins pour les capsules métalliques) et peser à 0,1 mg près.

Ne pas essuyer le récipient juste avant la pesée. Placer le récipient sur la balance à l'aide de pinces pour éviter notamment les variations de température.

4.5.14. Répéter les opérations décrites en 4.5.13 jusqu'à ce que la masse du récipient destiné à la récupération de la matière grasse diminue de 0,5 mg ou moins, ou augmente, entre deux pesées successives. Noter la masse minimale comme étant la masse du récipient de récupération de la matière grasse et de la matière extraite.

4.5.15. Ajouter 25 ml d'éther de pétrole au récipient d'extraction de la matière grasse, de façon à vérifier si oui ou non la matière extraite est entièrement soluble. Chauffer doucement et agiter le solvant par un mouvement rotatoire jusqu'à dissolution de toute la matière grasse.

Si la matière extraite est entièrement soluble dans l'éther de pétrole, relever la masse de la matière grasse comme étant la différence entre la masse finale de la fiole contenant l'extrait (4.5.14) et sa masse initiale (4.4).

4.5.16. Si la matière extraite n'est pas entièrement soluble dans l'éther de pétrole, ou en cas de doute, extraire complètement la matière grasse du récipient par des lavages répétés avec de l'éther de pétrole chaud.

Laisser déposer les matières insolubles et décanter soigneusement l'éther de pétrole sans enlever les matières insolubles. Répéter cette opération trois fois en utilisant l'éther de pétrole pour rincer l'intérieur du col du récipient.

Enfin, rincer l'extérieur du sommet du récipient avec le mélange de solvants, de telle sorte que le solvant ne se répande pas à l'extérieur du récipient. Chasser les vapeurs d'éther de pétrole en chauffant le récipient pendant 1 heure dans l'étuve, laisser refroidir et peser comme décrit aux points 4.5.13 et 4.5.14.

Relever la masse de la matière grasse comme étant la différence entre la masse déterminée au point 4.5.14 et cette masse finale.

## 5. Expression des résultats

### 5.1. Calcul et formule

Calculer la teneur en matières grasses, exprimée en pourcentage en masse, selon la formule :

$$F = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

où

F = est la teneur en matière grasse.

m<sub>0</sub> = représente la masse, en grammes, de la prise d'essai (4.2).

m<sub>1</sub> = représente la masse, en grammes, du récipient destiné à la récupération de la matière grasse et de la matière extraite, déterminée au point 4.5.14.

m<sub>2</sub> = représente la masse, en grammes, du récipient préparé pour la récupération de la matière grasse ou, dans le cas de matières non dissoutes, du récipient destiné à la récupération de la matière grasse et du résidu insoluble, déterminée au point 4.5.16.

m<sub>3</sub> = représente la masse, en grammes, du récipient de récupération de la matière grasse utilisé pour l'essai à blanc (4.4) et de la matière extraite, déterminée au point 4.5.14.

m<sub>4</sub> = représente la masse, en grammes, du récipient de récupération de la matière grasse (4.4) utilisé pour l'essai à blanc (4.3) ou, dans le cas des matières non dissoutes, du récipient de récupération de la matière grasse et du résidu insoluble déterminée au point 4.5.16.

Noter le résultat à 0,01 % près.

### 5.2. Fidélité

#### 5.2.1. Répétabilité (r)

— pour le lait entier et le lait partiellement écrémé : 0,02 g de matière grasse pour 100 g de produit,

— pour le lait écrémé : 0,01 g de matière grasse pour 100 g de produit.

#### 5.2.2. Reproductibilité (R)

— pour le lait entier : 0,04 g de matière grasse pour 100 g de produit,

— pour le lait partiellement écrémé : 0,03 g de matière grasse pour 100 g de produit,

— pour le lait écrémé : 0,025 g de matière grasse pour 100 g de produit.

## 6. Autre mode opératoire avec tubes d'extraction de la matière grasse, munis d'un siphon ou d'un dispositif de lavage

### 6.1. Mode opératoire

6.1.1. Préparation de l'échantillon pour essai : cf. 4.1.

#### 6.1.2. Prise d'essai

Procéder comme précisé au point 4.2, mais en utilisant les tubes d'extraction de la matière grasse.

La prise d'essai doit être transférée aussi complètement que possible au fond du tube d'extraction.

6.1.3. Essai à blanc : cf. 4.3.

6.1.4. Préparation du récipient destiné à la récupération de la matière grasse : cf. 4.4.

#### 6.1.5. Détermination

6.1.5.1. Ajouter 2 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium ou un volume équivalent d'une solution d'hydroxyde d'ammonium plus concentrée et mélanger convenablement avec la prise d'essai prétraitée au fond du tube. Après addition de l'hydroxyde d'ammonium, effectuer la détermination sans attendre.

6.1.5.2. Ajouter 10 ml d'éthanol et mélanger doucement, mais convenablement, au fond du tube. Ajouter, éventuellement, deux gouttes de solution de rouge congo ou de rouge de crésol.

6.1.5.3. Ajouter 25 ml d'oxyde diéthylique, fermer le tube avec un bouchon en liège saturé d'eau ou avec un bouchon en une autre matière mouillé avec de l'eau et agiter vigoureusement le tube, mais pas trop fort (afin d'éviter la formation d'émulsions persistantes), par des retournements répétés pendant une minute.

Si nécessaire, refroidir le tube sous l'eau courante, retirer avec précaution le bouchon en liège ou en une autre matière, le rincer ainsi que le col du tube avec une petite quantité de mélange de solvants en utilisant le flacon de lavage, de façon à ce que les liquides de rinçage coulent dans le tube.

6.1.5.4. Ajouter 25 ml d'éther de pétrole, fermer le tube avec le bouchon en liège réhumidifié (réhumidifié en le trempant dans de l'eau) ou en une autre matière et agiter soigneusement le tube pendant 30 secondes comme décrit au point 6.1.5.3.

6.1.5.5. Centrifuger le tube fermé pendant 1 à 5 minutes à une vitesse de rotation de 500 à 600 tr min<sup>-1</sup>. Si l'on ne dispose pas d'une centrifugeuse (cf. note au point 3.2), laisser le tube bouché reposer dans le portoir pendant au moins 30 minutes jusqu'à ce que la couche surnageante soit claire et nettement séparée de la couche aqueuse. Si nécessaire, refroidir le tube sous l'eau courante.

6.1.5.6. Retirer avec précaution le bouchon en liège ou en une autre matière et le rincer, ainsi que le col du tube, avec une petite quantité de mélange de solvants, de sorte que les liquides de rinçage coulent dans le tube.

6.1.5.7. Introduire un siphon ou un dispositif de lavage dans le tube et enfoncer la longue tubulure à l'intérieur jusqu'à ce que l'orifice se trouve environ 3 mm au-dessus de l'interface des couches. La tubulure intérieure doit être parallèle à l'axe du tube d'extraction.

Transvaser avec précaution la couche surnageante du tube dans le récipient préparé pour la récupération de la matière grasse et contenant quelques régulateurs d'ébullition dans le cas de fioles (facultatif dans le cas de capsules métalliques) en évitant de transvaser une partie quelconque de la couche aqueuse. Rincer l'orifice avec une petite quantité de mélange de solvants en recueillant les liquides de rinçage dans le récipient servant à la récupération de la matière grasse.

6.1.5.8. Desserrer le dispositif du col du tube, puis le soulever légèrement et rincer la partie inférieure de sa longue tubulure interne avec un peu de mélange de solvants. Abaisser et réintroduire le dispositif et transvaser les liquides de rinçage dans le récipient de récupération de la matière grasse.

Rincer l'orifice externe du dispositif avec un peu de mélange de solvants, recueillir ensuite les liquides de rinçage dans le récipient. Le solvant peut éventuellement être éliminé partiellement ou totalement du récipient par distillation ou évaporation comme décrit au point 4.5.12.

6.1.5.9. Desserrer à nouveau le dispositif du col, soulever légèrement le dispositif et ajouter 5 ml d'éthanol dans le tube en utilisant l'éthanol pour rincer la longue tubulure interne : mélanger comme décrit au point 6.1.5.2.

6.1.5.10. Effectuer une deuxième extraction en répétant les opérations décrites aux points 6.1.5.3 à 6.1.5.8, mais en utilisant seulement 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole. Utiliser l'oxyde diéthylique pour rincer la longue tubulure interne pendant le retrait du dispositif du tube après la première extraction.

6.1.5.11. Effectuer une troisième extraction en répétant à nouveau les opérations décrites aux points 6.1.5.3 à 6.1.5.8, en utilisant 15 ml d'oxyde diéthylique et 15 ml d'éther de pétrole et en rinçant la longue tubulure interne du dispositif comme décrit en 6.1.5.10.

La troisième extraction peut être supprimée dans le cas du lait écrémé.

6.1.5.12. Procéder comme décrit aux points 4.5.12 à 4.5.16.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

### Annexe 13 : Détermination de la teneur en azote total du lait

#### 1. Définition

Par teneur en azote total du lait, on entend la teneur en azote, exprimée en pourcentage en masse, obtenue par application de la méthode Kjeldahl.

#### 2. Principe

Une quantité pesée de l'échantillon de lait est minéralisée à l'aide d'acide sulfurique concentré et de sulfate de potassium en présence de sulfate de cuivre (II) faisant fonction de catalyseur, afin de convertir l'azote des composés organiques en sulfate d'ammoniaque. L'ammoniaque libéré par adjonction d'une solution d'hydroxyde de sodium est distillé et recueilli dans une solution d'acide borique. Cette solution est ensuite titrée avec une solution acide.

#### 3. Réactifs

3.1. Sulfate de potassium (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

3.2. Solution de sulfate de cuivre.

Dissoudre 5,0 g de sulfate de cuivre (II) pentahydrate (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) dans de l'eau et compléter à 100 ml (à 20 °C) dans une fiole jaugée.

3.3. Acide sulfurique, au moins 98,0 % (m/m), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

3.4. Solution d'hydroxyde de sodium, 47 % (m/m) 704 g NaOH/l (à 20 °C)

#### Note

On peut également utiliser une solution d'hydroxyde de sodium moins concentrée, par exemple 40 % (m/m) 572 g/l, 20 °C ou 30 % (m/m) 399 g/l, 20 °C.

3.5. Solution d'acide borique

Dissoudre 40 g d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) dans un litre d'eau chaude, laisser refroidir et conserver dans une bouteille en verre borosilicaté.

**3.6. Indicateur**

Dissoudre 0,01 g de rouge de méthyle, 0,02 g de bleu de bromothymol et 0,06 g de vert de bromocrésol dans 100 ml d'alcool éthylique. Conserver la solution dans une bouteille bouchée brune dans un endroit frais et sombre.

3.7. Solution volumétrique acide normalisée,  $c(1/2 H_2SO_4)$  ou  $c(HCl) = 0,05 \text{ mol/l}$  titrée à  $0,0001 \text{ mol/l}$  près.

3.8. Saccharose exempt de composés azotés

3.9. Sel d'ammonium, pur, tel que l'oxalate d'ammonium  $(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$  ou le sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_4$ .

3.10. Tryptophane  $(C_{11}H_{12}N_2O_2)$ , phénacétine  $(C_{10}H_{11}CH_2CONH_2)$  ou monó- ou dichlorhydrate de lysine  $(C_6H_{11}N_2O_2 \cdot HCl)$  ou  $(C_6H_{10}N_2O_2 \cdot 2HCl)$ .

**Note**

Le degré de pureté des réactifs visés aux points 3.9 et 3.10 devrait être supérieur à la « qualité analytique ». Pour le point 3.9 utiliser, si possible, une solution de sels d'ammonium certifiés.

**Appareillage et verrerie**

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

4.1. Ballons Kjeldahl de 500 ml de capacité.

4.2. Régulateurs d'ébullition, par exemple billes de verre d'environ 5 mm de diamètre, granules d'Hengar et pierre ponce.

4.3. Burette ou pipette automatique, délivrant 1,0 ml.

4.4. Eprouvettes graduées en verre, d'une capacité de 50, 100 et 250 ml.

4.5. Appareil de digestion en position inclinée (à environ 45°), équipé d'un dispositif de chauffage électrique ou de brûleurs à gaz réglables pour que le contenu du ballon ne monte pas au-dessus de 1/3 du col, et d'un dispositif d'extraction des fumées.

4.6. Appareil de distillation, en verre borosilicaté, auquel peut être adapté le ballon Kjeldahl, se composant d'un déflégmateur efficace relié à un réfrigérant efficace à tube intérieur droit, à la partie inférieure duquel est relié un tube d'évacuation; le tube de raccordement et le(s) bouchon(s) doivent être étanches et de préférence en néoprène.

4.7. Pipette ou pipette automatique, délivrant 0,10 ml.

4.8. Fioles coniques de 500 ml de capacité, graduées à 200 ml.

4.9. Burette de 50 ml de capacité, graduée tous les 0,1 ml, avec une erreur maximale de  $\pm 0,05 \text{ ml}$ .

4.10. Loupe grossissante pour une lecture précise de la burette.

4.11. pH-mètre

4.12. Burette automatique

**5. Mode opératoire**

5.1. Introduire successivement dans le ballon Kjeldahl les régulateurs d'ébullition (par exemple 3 billes de verre), 15 g de sulfate de potassium, 1,0 ml de solution de sulfate de cuivre, environ 5 g de lait (pesé à 0,001 g près) et 25 ml d'acide sulfurique. Utiliser l'acide pour entraîner les résidus de la solution de sulfate de cuivre, de sulfate de potassium ou de lait qui seraient restés sur le col du ballon et mélanger le contenu du ballon.

**Note**

Étant donné que les matières organiques absorbent de l'acide sulfurique lors de l'ébullition, il est conseillé d'utiliser, pour la digestion, 30 et non 25 ml d' $H_2SO_4$  si le lait contient plus de 5,0 % (m/m) de matière grasse. Il en va de même pour l'essai à blanc.

5.2. Chauffer chaque ballon Kjeldahl sur l'appareil de minéralisation très doucement au début, de façon à ce que toute la mousse noire reste dans le ballon. Lorsque la mousse initiale disparaît pour faire place à de fortes fumées blanches, porter à forte ébullition (les vapeurs d'acide se condensent à mi-chemin dans le col du ballon) jusqu'à ce que les particules noires disparaissent complètement et que le contenu du ballon devienne limpide et bleu-vert pâle. Poursuivre l'ébullition plus modérément pendant au moins 1h30. Veuillez noter les points suivants :

a) la période de clarification ne doit pas dépasser 1 heure et la durée totale de la minéralisation ne doit pas être inférieure à 2h30. S'il faut plus d'une heure pour obtenir la clarification, le temps de minéralisation doit être augmenté en conséquence;

b) le sulfate de potassium favorise la minéralisation, étant donné qu'il élève la température d'ébullition du mélange. Si le volume résiduel de  $H_2SO_4$  est inférieur à 15 ml environ à la fin du temps de minéralisation, il se peut qu'il y ait eu perte d'azote due à un chauffage excessif. Dans le cas d'un chauffage au gaz, utiliser une plaque en matériau isolant pourvue d'une ouverture circulaire ayant un diamètre tel que la flamme libre ne touche que la partie du ballon qui se trouve sous la surface du contenu liquide;

c) si des particules noires entrent dans le col du ballon et ne sont pas toutes entraînées à l'intérieur du ballon par l'acide refluant au cours de la phase initiale de forte ébullition (reflux que l'on peut faciliter en faisant tourner le ballon), laisser refroidir le ballon suffisamment et entraîner soigneusement les particules avec un minimum d'eau. Poursuivre ensuite la minéralisation comme décrit ci-dessus.

5.3. Lorsque les ballons Kjeldahl sont refroidis, ajouter 300 ml d'eau (voir note) dans chacun des récipients, de façon à entraîner toutes les particules adhérant au col du ballon. Mélanger soigneusement le contenu jusqu'à dissolution des cristaux qui se sont séparés. Ajouter quelques régulateurs d'ébullition pour obtenir une ébullition homogène. Ajouter ensuite dans chaque ballon 70 ml de solution d'hydroxyde de sodium (voir note) en tenant le ballon incliné, de manière à ce que la solution d'hydroxyde de sodium forme la couche inférieure dans le ballon. Veiller à ne pas en répandre sur le dessus du col.

**Note**

Le volume combiné d'eau et de solution d'hydroxyde de sodium doit être de 370 ml pour pouvoir recueillir environ 150 ml de distillat avant que le contenu du ballon ne présente des soubresauts (5.4).

Si on ajoute une plus grande quantité de solution d'hydroxyde de sodium concentrée à moins de 47 % (m/m), le volume d'eau ajouté doit être proportionnellement réduit. Ainsi, si on ajoute 85 ml de solution à 40 % (m/m) ou 125 ml de solution à 30 % (m/m), le volume d'eau ajouté doit être respectivement de 285 ml et de 245 ml.

5.4. Raccorder immédiatement chaque ballon Kjeldahl à un appareil de distillation. Veiller à ce que l'extrémité du tube du réfrigérant plonge dans 50 ml de solution d'acide borique et 0,20 ml (5 à 6 gouttes) d'indicateur contenus dans la fiole conique. Agiter le contenu de chaque ballon Kjeldahl pour bien mélanger et porter à ébullition tout d'abord à feu doux, pour éviter la formation excessive de mousse. Après avoir recueilli entre 100 et 125 ml de distillat, abaisser chaque fiole d'Erlenmeyer jusqu'à ce que l'extrémité du tube du réfrigérant se trouve environ 40 mm au-dessus du trait repère de 200 ml. Poursuivre chaque distillation jusqu'à ce que le contenu du ballon présente des soubresauts et couper immédiatement la source de chaleur. Enlever chaque ballon Kjeldahl et rincer l'extrémité de chaque tuyau d'évacuation du réfrigérant avec un peu d'eau en recueillant l'eau de rinçage dans une fiole d'Erlenmeyer. Veuillez noter les points suivants :

- a) la vitesse de distillation doit être telle qu'environ 150 ml de distillat doit avoir été recueilli lorsque les soubresauts commencent, correspondant à un volume total dans la fiole d'Erlenmeyer de 200 ml environ.
- b) l'efficacité de chaque réfrigérant doit être telle que la température du liquide contenu dans chaque fiole n'excède pas 25 °C au cours de la distillation.

5.5. Titrer chaque distillat avec une solution volumétrique jusqu'à pH  $4,6 \pm 0,1$ , en utilisant un pH-mètre et une burette automatique. L'addition d'un indicateur permet de contrôler si le titrage se déroule correctement. Relever les indications de chaque burette à 0,01 ml près en utilisant une loupe grossissante pour éviter toute erreur de parallaxe.

Le titrage peut être réalisé à l'aide du seul indicateur. Titrer jusqu'à ce que la couleur du distillat corresponde à celle d'une solution récemment préparée à partir de 150 ml d'eau additionnée de 50 ml de la solution d'acide borique et de 0,20 ml de l'indicateur contenus dans une fiole d'Erlenmeyer.

5.6. Effectuer un essai à blanc conformément aux points 5.1 à 5.5 inclus en utilisant 5 ml d'eau distillée avec environ 0,1 g de saccharose au lieu de l'échantillon de lait.

#### Note

Pour le titrage du distillat blanc, il ne faut qu'une très faible quantité de solution volumétrique acide normalisée.

5.7. Vérifier régulièrement l'exactitude des résultats en effectuant deux essais de récupération en suivant la procédure décrite aux points 5.1 à 5.5.

5.7.1. S'assurer qu'il n'y a eu, au cours de la distillation, aucune perte d'azote due à une chaleur excessive ou à des fuites mécaniques en utilisant une prise d'essai composée de 0,15 g d'oxalate d'ammonium ou de sulfate d'ammonium pesé à 0,001 g près et de 0,1 g de saccharose.

Le pourcentage d'azote récupéré doit être de 99 à 100 %.

Des résultats inférieurs ou supérieurs sont l'indication d'une erreur de procédure et/ou d'une erreur de concentration de la solution normalisée.

5.7.2. Vérifier que la procédure de minéralisation est capable de libérer tout l'azote protidique, en utilisant une prise d'essai composée de 0,20 g de tryptophane pur, 0,35 g de phénacétine ou 0,20 g de chlorhydrate de lysine. Tout doit être pesé à 0,001 g près. Le taux de récupération de l'azote doit être au moins de 98 à 99 %.

### 6. Mesures de sécurité

Lors de la manipulation d'acide sulfurique concentré, d'hydroxyde de sodium concentré et de ballons Kjeldahl, veiller à toujours porter un tablier de laboratoire, des lunettes de protection et des gants résistants aux acides.

Au cours de la distillation, surveiller les ballons Kjeldahl en permanence. En raison des risques, arrêter immédiatement la distillation si le contenu de la bouteille présente de violents « soubresauts ». En cas de panne du système de chauffage de distillation pendant plus de deux à trois minutes, abaisser le ballon collecteur, de façon à ce que l'extrémité du réfrigérant émerge du liquide.

### 7. Expression des résultats

#### 7.1. Calcul et formule

Calculer la teneur en azote, en grammes d'azote pour 100 g de produit à l'aide de la formule :

$$N = \frac{1,40 (V - V_0) c}{m}$$

ou :

- N représente la teneur en azote
- V représente le volume en ml de la solution volumétrique acide normalisée utilisée pour le dosage
- V<sub>0</sub> représente le volume en ml de la solution volumétrique acide normalisée utilisée pour l'essai à blanc
- c représente la concentration, en mol/l, de la solution volumétrique acide normalisée
- m représente la masse en g de la prise d'essai.

Arrondir le résultat à 0,001 g près pour 100 g.

#### 7.2. Fidélité

Répétabilité (r) : 0,007 g par 100 g

Reproductibilité (R) : 0,015 g par 100 g.

### 8. Mode opératoire modifié

8.1. Utilisation d'un bloc chauffant de minéralisation au lieu du système de minéralisation avec ballon Kjeldahl. Dans ce cas, pour repérer les pannes éventuelles, vérifier chaque point individuellement (5.7.).

8.2. Utilisation d'un système de distillation par entraînement à la vapeur au lieu d'un chauffage direct (5.4.). Si l'appareillage ne permet pas d'utiliser de l'eau distillée, s'assurer que l'eau ne contient pas de matières volatiles acides ou alcalines.

8.3. Il est possible d'utiliser une prise d'essai de 1 g de lait (semi-macro Kjeldahl) au lieu de 5 g (5.1) à condition que :

- les quantités de réactifs utilisées pour la minéralisation (5.1) :  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , soient réduites dans le même rapport (un cinquième).
- la durée totale de la minéralisation (5.2) soit réduite à 75 minutes.
- la quantité d'hydroxyde de sodium (5.3) soit réduite dans le même rapport (un cinquième).
- une solution acide normalisée de plus faible concentration (0,02 — 0,03 mol/l) soit utilisée.

Note

L'emploi de l'une ou l'autre de ces options n'est acceptable que si la répétabilité (7.2) et les résultats des deux essais de contrôle de la précision (5.7) correspondent aux valeurs données dans la norme.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

#### Annexe 14 : Détermination de la teneur en matière grasse et en protéines du lait par spectrophotométrie dans l'infrarouge moyen

##### 1. Principe

La matière grasse et les protéines comportent des liaisons chimiques spécifiques qui absorbent la lumière à des longueurs d'onde déterminées dans l'infrarouge moyen. L'absorption électromagnétique, mesurée à ces longueurs d'onde et corrigée pour l'influence réciproque des constituants du lait par l'application de facteurs d'intercorrection, permet la détermination quantitative de la matière grasse et des protéines du lait.

##### 2. Réactifs

Aucun réactif n'est nécessaire pour l'exécution de la spectrophotométrie dans le moyen infra-rouge.

##### 3. Appareillage

###### 3.1. Spectrophotomètre dans l'infrarouge moyen

En analyse spectrophotométrique dans l'infrarouge moyen, on peut utiliser les filtres suivants :

3,5  $\mu\text{m}$  (filtre B) ou 5,7  $\mu\text{m}$  (filtre A) pour la matière grasse

6,5  $\mu\text{m}$  pour les protéines

9,6  $\mu\text{m}$  pour le lactose (seulement nécessaire pour l'intercorrection).

3.2. Bain-marie à circulation d'eau, réglable à 40 °C (précision de  $\pm 2$  °C)

##### 4. Mode opératoire

###### 4.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons à analyser sont préalablement réchauffés dans un bain-marie à  $40 \pm 2$  °C et ensuite soigneusement mélangés. Les échantillons doivent être analysés dans un délai de 15 minutes après mélange.

###### 4.2. Mise en route du spectrophotomètre dans l'infrarouge moyen

Avant de commencer les analyses, on procède d'abord au nettoyage des tuyauteries et de la cuvette avec une solution détergente. Ensuite, on contrôle le point zéro avec de l'eau distillée et on l'ajuste éventuellement. Le calibrage de l'appareil est alors contrôlé avec l'échantillon de lait cru étalon et avec un échantillon de lait écrémé. Ces opérations de réglage doivent être effectuées conformément aux spécifications du constructeur de l'appareil.

###### 4.3. Conduite des analyses

Après la mise en route de l'appareil, on peut commencer les analyses. L'appareil doit être contrôlé avec l'échantillon étalon au minimum tous les 50 échantillons lors des analyses en série. L'interprétation des résultats pour les échantillons étalons s'effectue selon la norme FIL 141 la plus récente.

Si les résultats de l'(des) échantillon(s) étalon(s) divergent selon la norme ci-dessus, la raison en est immédiatement recherchée et le problème doit être résolu avant de continuer les analyses. Chaque flacon d'échantillon étalon ne peut être utilisé qu'une seule fois.

Au minimum tous les 400 échantillons, il faut contrôler le point zéro et, si nécessaire, procéder à un lavage des tuyauteries et de la cuvette avec une solution détergente.

Toutes les opérations ci-dessus seront exécutées conformément aux spécifications du constructeur de l'appareil.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS

## Annexe 15 : Détermination de la masse volumique

## 1. Définition

La masse volumique du lait est le quotient de la masse d'un certain volume de lait, à 20 °C, à ce volume.

## 2. Principe

La masse volumique à 20 °C est déterminée par aréométrie.

## 3. Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

## 3.1. Aréomètre

L'aréomètre à masse volumique est un instrument se composant d'un flotteur en verre, large et lesté à son extrémité inférieure et d'une tige cylindrique en verre, soudée à la partie supérieure du flotteur et coaxial à celui-ci, l'extrémité supérieure de la tige étant fermée.

Le flotteur en verre contient le lest (plomb, mercure, etc.) destinée à ajuster la masse de l'aréomètre. La tige comporte une échelle graduée de 1,025 à 1,035 g/ml.

L'aréomètre doit être contrôlé par la méthode pycnométrique, en utilisant un pycnomètre de 100 ml environ de capacité, équipé d'un thermomètre de précision.

## 3.2. Eprouvettes cylindriques (en verre ou en acier inoxydable) ayant les dimensions minimales suivantes :

- diamètre interne du cylindre : 35 mm environ
- hauteur interne du cylindre : 225 mm environ.

## 3.3. Bain d'eau réglé à 20 ± 0,1 °C

## 3.4. Bain d'eau réglé à 40 ± 2 °C

## 3.5. Thermomètre gradué au moins par 0,5 °C.

## 4. Mode opératoire

4.1. Mélanger l'échantillon en le retournant pour disperser la matière grasse. Placer l'échantillon dans le bain d'eau (3.4) jusqu'à ce qu'il atteigne 40 °C et le laisser à cette température pendant 5 minutes. Mélanger convenablement par retournements successifs pour obtenir une répartition homogène de la matière grasse. Refroidir à 20 °C dans le deuxième bain d'eau (3.3).

4.2. Mélanger convenablement l'échantillon en le retournant soigneusement pour éviter l'incorporation d'air. Verser le lait dans l'éprouvette cylindrique maintenir en position inclinée, pour éviter la formation de mousse ou de bulles. Utiliser suffisamment de lait pour provoquer un débordement de liquide lors de l'introduction de l'aréomètre dans l'éprouvette. Plonger avec précaution l'aréomètre dans le lait et le laisser flotter librement jusqu'à ce qu'il atteigne son point d'équilibre. Placer l'éprouvette en position verticale. L'aréomètre doit être placé au milieu de la colonne de liquide et ne doit pas toucher les parois de l'éprouvette.

4.3. Lorsque l'aréomètre a atteint son point d'équilibre, effectuer la lecture de la graduation à la partie supérieure du ménisque.

4.4. Immédiatement après la lecture de l'aréomètre, introduire le thermomètre dans l'échantillon et lire la température par 0,5 °C. La température ne doit pas différer de plus de ± 2 °C par rapport à 20 °C.

## 5. Correction de la température

Si la température du lait à analyser n'est pas exactement de 20 °C lors de la mesure de la masse volumique, le résultat obtenu doit être corrigé en ajoutant à la masse volumique lue 0,0002 par degré Celsius au-dessus de 20 °C ou en retranchant 0,0002 par degré Celsius au-dessous de 20 °C. Cette correction est uniquement valable si la température de l'échantillon diffère de 5 °C au maximum par rapport à 20 °C.

## 6. Expression des résultats

Le calcul de la masse volumique de l'échantillon, exprimée en g/ml de lait écrémé à 20 °C, s'effectue selon la formule suivante :

$$\frac{1000 \cdot mv - MG \cdot mv}{1000 - \frac{MG \cdot mv}{0,92}} = \frac{0,92 \cdot mv (100 - MG)}{920 - MG \cdot mv}$$

où :

mv est la masse volumique de l'échantillon, résultant de la lecture de l'aréomètre (4.4) en g/l

MG est la teneur en matière grasse de l'échantillon (g/l)

0,92 est la densité de la matière grasse.

## 7. Fidélité

7.1. Répétabilité (r) : 0,0003 g/ml

7.2. Reproductibilité (R) : 0,0015 g/ml.

Vu pour être annexé à l'arrêté ministériel du 14 octobre 1994.

Le Ministre de l'Agriculture,  
A. BOURGEOIS