II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

RICHTLINIE DER KOMMISSION

vom 20. Dezember 1983

zur Änderung der Richtlinien 71/393/EWG, 72/199/EWG und 78/633/EWG zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

(84/4/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 70/373/EWG des Rates vom 20. Juli 1970 über die Einführung gemeinschaftlicher Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln (1), zuletzt geändert durch die Akte über den Beitritt Griechenlands, insbesondere auf Artikel 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

In den Richtlinien 71/393/EWG (2), 72/199/EWG (3) und 78/633/EWG der Kommission (4) werden Analysemethoden für Rohfett bzw. Virginiamycin und Zink-Bacitracin festgelegt. Es erweist sich als notwendig, diese Methoden durch der Entwicklung der wissenschaftlichen und technischen Kenntnis angepaßte Verfahren zu ersetzen.

Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Futtermittelausschusses —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

In der Anlage der Richtlinie 71/393/EWG erhält Teil 4 „Bestimmung von Rohfett" die Fassung der Anlage I dieser Richtlinie.

Artikel 2

In der Anlage II der Richtlinie 72/199/EWG erhält Teil 5 „Bestimmungen von Virginiamycin — durch Diffusion in Agarnährboden —" die Fassung der Anlage II dieser Richtlinie.

Artikel 3

In der Anlage der Richtlinie 78/633/EWG erhält Teil 1 „Bestimmung von Zink-Bacitracin — durch Diffusion in Agarnährboden —" die Fassung der Anlage III dieser Richtlinie.

Artikel 4

Die Mitgliedstaaten setzen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften in Kraft, um den Bestimmungen dieser Richtlinie bis spätestens 1. Juni 1984 nachzukommen und setzen die Kommission unverzüglich hiervon in Kenntnis.

Artikel 5

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 20. Dezember 1983

Für die Kommission

Poul DALSAGER

Mitglied der Kommission

(1) ABl. Nr. L 170 vom 3. 8. 1970, S. 2.
(2) ABl. Nr. L 279 vom 20. 12. 1971, S. 7.
(3) ABl. Nr. L 123 vom 29. 5. 1972, S. 6.
(4) ABl. Nr. L 206 vom 29. 7. 1978, S. 43.

ANLAGE I

„4. **BESTIMMUNG VON ROHFETT**

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung des Rohfettgehalts von Futtermitteln. Sie bezieht sich nicht auf die Untersuchung von Ölsaaten und Ölfrüchten im Sinne der Verordnung Nr. 136/66/EWG des Rates vom 22. September 1966.

Je nach Art des Futtermittels muß eines der nachstehend beschriebenen Verfahren angewendet werden.

1.1. *Verfahren A*

Auf Einzelfuttermittel pflanzlicher Herkunft anzuwenden mit Ausnahme derjenigen, von denen bekannt ist, daß sie Fett enthalten, das nicht ohne vorherige Hydrolyse gänzlich mit Petroläther extrahiert werden kann. Hierzu gehören Kleber, Hefen, Sojaproteine und Kartoffeleiweiß. Verfahren A ist auch auf Mischfuttermittel anzuwenden mit Ausnahme derjenigen, die Milchpulver enthalten oder deren Fett ohne vorherige Hydrolyse nicht gänzlich mit Petroläther extrahiert werden kann.

1.2. *Verfahren B*

Auf Einzelfuttermittel tierischen Ursprungs anzuwenden sowie bei den unter 1.1 Verfahren A genannten Ausnahmen.

2. **Prinzip**

2.1. *Verfahren A*

Die Probe wird mit Petroläther extrahiert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand getrocknet und gewogen.

2.2. *Verfahren B*

Die Probe wird heiß mit Salzsäure behandelt. Die Mischung wird abgekühlt und filtriert. Der gewaschene und getrocknete Rückstand wird nach dem Verfahren A weiterbehandelt.

3. **Reagenzien**

3.1. Petroläther mit einem Siedebereich von 40-60 °C. Die Bromzahl muß weniger als 1 und der Abdampfrückstand weniger als 2 mg/100 ml betragen.

3.2. Natriumsulfat, wasserfrei.

3.3. 3N Salzsäure.

3.4. Filtrationsmittel, z. B. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Geräte**

4.1. Extraktionsapparat : Sofern das Gerät mit einem Siphon (Soxhletapparat) ausgestattet ist, muß die Rückflußmenge so bemessen sein, daß das Lösungsmittel mindestens 10 mal in der Stunde abläuft ; wenn es sich um ein Gerät ohne Siphon handelt, muß die Rückflußmenge etwa 10 ml pro Minute betragen.

4.2. Extraktionshülsen : Diese müssen frei sein von petrolätherlöslichen Stoffen und eine Porosität besitzen, die den Forderungen bei (4.1) entspricht.

4.3. Trockenschrank : Vakuumtrockenschrank eingestellt auf 75 °C ± 3 °C oder Lufttrockenschrank eingestellt auf 100 °C ± 3 °C.

5. **Ausführung**

5.1. *Verfahren A* (s. Bemerkung 8.1)

5 g der Probe werden auf 1 mg genau abgewogen, dann in eine Extraktionshülse (4.2) gefüllt und mit einem fettfreien Wattebausch bedeckt.

Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) gebracht und 6 Stunden mit Petroläther (3.1) extrahiert, wobei der Petrolätherextrakt in einem trockenen, mit einigen Stückchen Bimsstein (1) versehenen, tarierten Kolben aufgefangen wird.

Nach beendeter Extraktion wird das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand mit Kolben anschließend 1 1/2 Stunden in einem Trockenschrank (4.3) getrocknet und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen. Durch eine zweite Trocknung von 30 Minuten Dauer vergewissert man sich, ob das Gewicht des Fettes konstant geblieben ist (der Gewichtsverlust zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen muß unter 1 mg bleiben).

(1) Wenn das Fett später qualitativ untersucht werden soll, sind die Bimssteinstückchen durch Glasperlen zu ersetzen.

5.2. *Verfahren B*

2,5 g der Probe (s. Bemerkung 8.2) werden auf 1 mg genau abgewogen und in ein 400-ml-Becherglas oder einen 300-ml-Erlenmeyerkolben gebracht. Anschließend werden 100 ml 3N Salzsäure (3.3) und einige Stückchen Bimsstein hinzugefügt. Das Becherglas wird mit einem Uhrglas bedeckt, bzw. der Erlenmeyerkolben wird mit einem Rückflußkühler versehen. Das Gemisch wird auf kleiner Flamme oder auf einer Heizplatte zu leichtem Sieden gebracht und eine Stunde lang so gehalten. Es ist zu verhindern, daß das Material sich an den Wänden des Gefäßes festsetzt.

Dann wird abgekühlt und so viel vom Filtrationsmittel (3.4) zugesetzt, daß beim Filtrieren kein Fettverlust eintritt. Filtriert wird unter Verwendung zweier ineinandergelegter feuchter fettfreier Papierfilter. Der Rückstand wird bis zur neutralen Reaktion mit kaltem Wasser gewaschen. Danach ist zu prüfen, ob das Filtrat noch Fett enthält. Vorhandensein von Fett zeigt, daß vor der Hydrolyse eine Extraktion der Probe mit Petroläther nach Verfahren A vorzunehmen ist.

Der doppelte Papierfilter mit dem Rückstand ist auf ein Uhrglas zu legen und eineinhalb Stunden lang bei 100 °C ± 3 °C im Trockenschrank zu trocknen.

Der doppelte Filter mit dem trockenen Rückstand wird in eine Extraktionshülse (4.2) gebracht und mit einem fettfreien Wattebausch bedeckt. Die Hülse wird in einen Extraktionsapparat (4.1) gebracht. Dann wird wie unter 5.1, zweiter und dritter Absatz, beschrieben fortgefahren.

6. **Berechnung der Ergebnisse**

Das Gewicht des Rückstands wird in Hundertteilen (Prozenten) der Probe ausgedrückt.

7. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Parallelbestimmungen (eines Analytikers) sollte bei derselben Probe bei Gehalten an Rohfett von

— bis zu 5 v. H. — 0,2 v.H. absolut,

— 5 bis 10 v. H. — 4,0 v. H. des höheren Resultats,

— mehr als 10 v. H. — 0,4 v. H. absolut

nicht überschreiten.

8. **Bemerkungen**

8.1. Bei Erzeugnissen mit hohem Fettgehalt, die schwer zu zerkleinern sind oder sich zur Entnahme einer reduzierten homogenen Probe nicht eignen, ist folgendermaßen zu verfahren.

20 g der Probe werden auf 1 mg genau abgewogen und mit 10 g oder mehr wasserfreiem Natriumsulfat (3.2) gemischt. Dann wird mit Petroläther (3.1) wie unter 5.1 beschrieben extrahiert. Der dabei aufgefangene Extrakt wird mit Petroläther (3.1) auf 500 ml aufgefüllt und gemischt. Von der Lösung werden 50 ml entnommen und in einen kleinen, trockenen, mit Bimssteinkörnchen versehenen (1) und tarierten Kolben gebracht. Das Lösungsmittel wird abdestilliert; dann wird wie unter 5.1, letzter Absatz, beschrieben getrocknet und weiter verfahren.

Der Extraktionsrückstand in der Hülse wird vom Lösungsmittel befreit und auf 1 mm zerkleinert. Das Material wird in die Extraktionshülse zurückgebracht (kein Natriumsulfat hinzufügen). Dann wird wie unter 5.1, zweiter und dritter Absatz, beschrieben fortgefahren.

Der Rohfettgehalt ausgedrückt in Hundertteilen der Probe wird nach folgender Formel ermittelt:

$$(10\ a + b) \times 5$$

wobei:

a = Rückstandsmasse in Gramm nach der 1. Extraktion (aliquoter Teil des Extraktes),

b = Rückstandsmasse in Gramm nach der 2. Extraktion.

8.2. Bei fettarmen Erzeugnissen kann mit einer Einwaage von 5 g gearbeitet werden.".

(1) Wenn das Fett später qualitativ untersucht werden soll, sind die Bimssteinsstückchen durch Glasperlen zu ersetzen.

ANLAGE II

„5. **BESTIMMUNG VON VIRGINIAMYCIN**

— durch Diffusion in Agarnährboden —

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung von Virginiamycin in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 2 mg/kg (2 ppm) (1).

2. **Prinzip**

Die Probe wird mit einer methanolischen Tween-80-Lösung extrahiert. Der Extrakt wird dekantiert oder zentrifugiert und verdünnt. Seine antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Virginiamycin in einem mit *Micrococcus luteus* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen des Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentrationen als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen.

3. **Testorganismus : Micrococcus luteus ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)**

3.1. *Haltung der Stammkultur*

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit *Micrococcus luteus* beimpft und 24 Stunden lang bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 °C aufbewahrt und alle zwei Wochen neu überimpft.

3.2. *Herstellung der Bakteriensuspension* (a)

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml Natriumchloridlösung (4.3) abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 250 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 18-20 Stunden lang bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird in 25 ml Natriumchloridlösung (4.3) aufgenommen und gemischt. Die Suspension wird 1 : 10 mit Natriumchloridlösung 4.3) verdünnt. Die Lichtdurchlässigkeit der Suspension soll bei 650 nm und 1 cm Schichtdichte gegen Natriumchloridlösung (4.3) bei 75 v. H. liegen. Diese Suspension kann eine Woche lang bei ungefähr 4 °C aufbewahrt werden.

4. **Nährboden und Reagenzien**

4.1 *Kultur- und Testnährboden* (b)

Fleischpepton	6,0 g,
Caseinpepton	4,0 g,
Hefeextrakt	3,0 g,
Fleischextrakt	1,5 g,
Glukose	1,0 g,
Agar	10,0 bis 20,0 g,
Wasser	1 000 ml,
pH 6,5 (nach Sterilisation)	

4.2. *Phosphatpuffer, pH 6*

Di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	2,0 g,
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	8,0 g,
Wasser	1 000 ml.

4.3. Natriumchloridlösung 0,8 v. H. (G/V) : 8 g Natriumchlorid werden in Wasser aufgelöst, auf 1 000 ml verdünnt und sterilisiert.

4.4. Methanol.

4.5. Mischung des Phosphatpuffers (4.2)/Methanol (4.4) : 80/20 (V/V).

4.6. Methanolische Tween-80-Lösung 0,5 v. H. (G/V) : 5 g Tween 80 werden in Methanol (4.4) aufgelöst und auf 1 000 ml mit Methanol verdünnt.

4.7. Standardsubstanz : Virginiamycin mit bekannter Aktivität.

---

(1) 1 mg Virginiamycin entspricht 1 000 „UK"-Einheiten.

(a) Andere Methoden, die entsprechende Bakteriensuspensionen ergeben, können angewendet werden.

(b) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechend der Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

5. **Standardlösungen**

Eine genau abgewogene Menge der Standardsubstanz (4.7) wird in Methanol (4.4) gelöst und verdünnt um eine Stammlösung zu erhalten, die 1 000 µg Virginiamycin je ml enthält.

In verschlossener Flasche bei 4 °C aufbewahrt hält sich diese Lösung 5 Tage lang.

Aus dieser Stammlösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit der Mischung (4.5) folgende Lösungen hergestellt:

S_8 1 µg/ml,
S_4 0,5 µg/ml,
S_2 0,25 µg/ml,
S_1 0,125 µg/ml.

6. **Herstellung des Extrakts und der Testlösungen**

6.1. *Extraktion*

6.1.1. Erzeugnisse mit einem Virginiamycingehalt bis zu 100 mg/kg

Eine Menge von 50,0 g der Probe wird abgewogen, mit 200 ml der Lösung (4.6) versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Nach dem Absetzen oder Zentrifugieren werden 20 ml des Überstands entnommen und in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei einer Temperatur nicht höher als 40 °C auf ca. 5 ml verdampft. Der Rückstand wird mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Virginiamycingehalt von 1 µg/ml (= U_8) zu erhalten.

6.1.2. Erzeugnisse mit einem Virginiamycingehalt über 100 mg/kg

Eine Menge von höchstens 10,0 g der Probe mit einem Virginiamycingehalt zwischen 1 und 50 mg wird abgewogen, mit 100 ml der Lösung (4.6) versetzt und 30 Minuten lang geschüttelt. Nach dem Absetzen oder Zentrifugieren wird der Überstand mit der Mischung (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Virginiamycingehalt von 1 µg/ml (= U_8) zu erhalten.

6.2. *Testlösungen*

Von der Lösung U_8 werden die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt: 0,5 µg/ml), U_2 (erwarteter Gehalt: 0,25 µg/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt: 0,125 µg/ml) durch aufeinanderfolgende Verdünnung (1 : 1) mit der Mischung (4.5) hergestellt.

7. **Testverfahren**

7.1. *Beimpfung des Testnährbodens*

Der Testnährboden (4.1) wird mit der Bakteriensuspension (3.2) bei ungefähr 50 °C beimpft. Bei Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.1) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große und scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen Virginiamycin-Konzentrationen ergibt.

7.2. *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und der Testlösung (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extrakts. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10-13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem darauf gelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunstoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden. Auf die Platten wird eine Menge des nach 7.1 beimpften Testnährbodens (4.1) gegossen, so daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht festgeworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert. (Zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in vierfacher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3. *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während 16 bis 18 Stunden bei 30 °C ± 2 °C.

8. **Auswertung**

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen.

Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt :

$$\text{(a) SL} = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt :

$$\text{(b) SH} = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Genauso werden auch die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extrakts ermittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von s_1, s_2, s_4 und s_8 — u_1, u_2, u_4 und u_8 eingesetzt werden.

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Die Geraden können als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder u_1 und s_1 oder u_8 und s_8 ausschalten. Dann sind die Werte, SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten :

$$\text{(a')} \ SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{(b')} \ SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Hier muß denselben Parallelitätsanforderungen entsprochen werden. Falls die Ergebnisse aus drei Niveaus ermittelt wurden, sollte dies im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind wird der Logarithmus der relativen Aktivität (log. A) durch eine der folgenden Formeln ermittelt, je nachdem, ob 3 oder 4 Niveaus für die Beurteilung der Parallelität verwendet wurden.

Für 4 Niveaus

$$\text{(c) log A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Für 3 Niveaus

$$\text{(d) log A} = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

oder

$$\text{(d')} \ \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Aktivität des Probenextrakts = Aktivität der jeweiligen Standardlösung × A :

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereichs der Werte 0,5 bis 2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen, bzw. der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, ist das Ergebnis als annähernd anzusehen. Dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

Die Ergebnisse werden in Milligramm Virginiamycin je kg Futtermittel ausgedrückt.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein- und derselben Probe bei Gehalten von

— bis zu 10 mg/kg — 2 mg/kg absolut,

— 10 — 25 mg/kg — 20 v. H. des höheren Resultats,

— 25 — 50 mg/kg — 5 mg/kg absolut,

— über 50 mg/kg — 10 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.".

ANLAGE III

„1. **BESTIMMUNG VON ZINK-BACITRACIN**

— durch Diffusion in Agarnährboden —

1. **Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode dient zur Bestimmung von Zink-Bacitracin in Futtermitteln und Vormischungen. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit beträgt 5 mg/kg (5 ppm) (1).

2. **Prinzip**

Die Probe wird bei pH 2 mit einer Mischung aus Methanol/Wasser/Salzsäure unter Zusatz einer Natriumsulfidlösung extrahiert. Natriumsulfid wird zugefügt, um etwa vorhandene lösliche Kupfersalze, die den Test stören würden, auszufällen. Der Extrakt wird erforderlichenfalls auf pH 6,5 gebracht, konzentriert und verdünnt. Die antibiotische Aktivität wird durch Messung der Diffusion des Zink-Bacitracin in einem mit *Micrococcus luteus (flavus)* beimpften Agarnährboden bestimmt. Die Diffusion wird durch die entstehenden Hemmzonen des Testorganismus nachgewiesen. Der Durchmesser dieser Hemmzonen wird für den Bereich der angewandten Konzentrationen als dem Logarithmus der Konzentration an Antibiotikum direkt proportional angesehen.

3. **Testorganismus : Micrococcus luteus (flavus) ATCC** 10240

3.1. *Haltung der Stammkultur*

Agarschrägröhrchen mit Kulturnährboden (4.1) werden mit *Micrococcus luteus (flavus)* beimpft und 24 Stunden lang bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird im Kühlschrank bei etwa 4 °C aufbewahrt und alle zwei Wochen neu überimpft.

3.2. *Herstellung der Bakteriensuspensionen* (a)

Eine junge Kultur auf Agarschrägröhrchen (3.1) wird mit 2 bis 3 ml Natriumchloridlösung (4.3) abgewaschen. Mit dieser Suspension wird eine Rouxflasche, die 250 ml des Nährbodens (4.1) enthält, beimpft und 18 bis 20 Stunden lang bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wird in 25 ml Natriumchloridlösung (4.3) aufgenommen und gemischt.

Die Suspension wird 1 : 10 mit Natriumchloridlösung (4.3) verdünnt. Die Lichtdurchlässigkeit der Suspension soll bei 650 nm und 1 cm Schichtdichte gegen Natriumchloridlösung (4.3) bei 75 v. H. liegen. Diese Suspension kann eine Woche lang bei ungefähr 4 °C aufbewahrt werden.

4. **Nährböden und Reagenzien**

4.1. *Kulturnährböden* (b)

Fleischpepton	6,0 g,
Caseinpepton	4,0 g,
Hefeextrakt	3,0 g,
Fleischextrakt	1,5 g,
Glukose	1,0 g,
Agar	10,0 bis 20,0 g
Wasser	1 000 ml,
pH 6,5 — 6,6 (nach Sterilisation)	

4.2. *Testnährböden* (b)

Trypton	10,0 g,
Hefeextrakt	3,0 g,
Fleischextrakt	1,5 g,
Glukose	1,0 g,
Agar	10,0 bis 20,0 g,
Tween 80	1 ml,
Wasser	1 000 ml,
pH 6,5 (nach Sterilisation)	

4.3. Natriumchloridlösung 0,8 v. H. (G/V) : 8 g Natriumchlorid werden in Wasser aufgelöst, auf 1 000 ml verdünnt und sterilisiert.

4.4. Mischung aus Methanol/Wasser/Salzsäure (4.6) : 80 : 17,5 : 2,5 (V/V/V).

---

(1) 1 mg Zink-Bacitracin entspricht 42 internationalen Einheiten (IE).

(a) Andere Methoden, die entsprechende Bakteriensuspensionen ergeben, können angewendet werden.

(b) Jeder handelsübliche Nährboden entsprechender Zusammensetzung, der dieselben Ergebnisse erbringt, kann verwendet werden.

4.5. *Phosphatpuffer, pH 6,5*

Di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	22,15 g,
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	27,85 g,
Wasser	1 000 ml.

4.6. Salzsäure, d : 1,18 — 1,19.

4.7. Salzsäure, 0,1 M.

4.8. Natronlauge, 1 M.

4.9. Natriumsulfid, ca. 0,5 M Lösung.

4.10 Bromkresol-Purpurlösung 0,04 v. H. (G/V) : 0,1 g Bromkresol-Purpur werden in 18,5 ml 0,01 M Natronlauge aufgelöst und mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt und gemischt.

4.11. Standardsubstanz : Zink-Bacitracin mit bekannter Aktivität (in IE).

5. **Standardlösung**

Eine Menge der Standardsubstanz (4.11), die 1 050 IE (gemäß der angegebenen Aktivität) entspricht, wird abgewogen, mit 5 ml 0,1 M Salsäure versetzt und 15 Minuten stehengelassen. Dann werden 30 ml Wasser hinzugefügt, der pH-Wert auf 4,5 mit Phosphatpuffer (4.5) (ungefähr 4 ml) eingestellt, die Lösung mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und gut gemischt (1 ml = 21 IE).

Aus dieser Lösung werden durch aufeinanderfolgende Verdünnungen mit Phosphatpuffer (4.5) folgende Lösungen hergestellt :

S_8	0,42	IE/ml,
S_4	0,21	IE/ml,
S_2	0,105	IE/ml,
S_1	0,0525	IE/ml.

6. **Herstellung des Extrakts und der Testlösungen**

6.1. *Extraktion*

6.1.1. Vormischungen und mineralische Futtermittel

Eine Menge von 2,0 bis 5,0 g der Probe wird abgewogen und mit 29,0 ml der Mischung (4.4) und 1,0 ml Natriumsulfidlösung (4.9) versetzt und kurz geschüttelt. Es ist darauf zu achten, daß der pH-Wert bei 2 liegt. Die Mischung wird 10 Minuten lang geschüttelt und mit 30 ml des Phosphatpuffers (4.5) versetzt, dann erneut 15 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Ein angemessener Anteil des Überstands wird entnommen und der pH-Wert durch eine Zugabe von 1 M Natronlauge (4.8) mit einem pH-Meter oder mit Bromkresol-Purpurlösung (4.10) als Indikator auf 6,5 eingestellt.

Anschließend wird mit Phosphatpuffer (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Zink-Bacitracingehalt von 0,42 IE/ml (= U_8) zu erhalten.

6.1.2. Eiweißkonzentrate

Eine Menge von 10,0 g der Probe wird abgewogen , mit 49,0 ml der Mischung (4.4) und 1,0 ml Natriumsulfidlösung (4.9) versetzt und kurz geschüttelt. Es ist darauf zu achten, daß der pH-Wert bei 2 liegt. Die Mischung wird 10 Minuten lang geschüttelt. Dann werden 50 ml des Phosphatpuffers (4.5) zugesetzt, 15 Minuten lang geschüttelt und zentrifugiert. Anschließend wird eine angemessene Menge der überstehenden Lösung entnommen und der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Natronlauge (4.8) mit einem pH-Meter oder mit Bromkresolpurpurlösung (4.10) als Indikator auf 6,5 eingestellt. Die Mischung wird in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei höchstens 35 °C auf ungefähr die Hälfte eingedampft.

Der Rückstand wird mit Phosphatpuffer (4.5) verdünnt, um einen erwarteten Zink-Bacitracingehalt von 0,42 IE/ml (= U_8) zu erhalten.

6.1.3. Sonstige Futtermittel

Eine Menge von 10,0 g (20,0 g für einen erwarteten Zink-Bacitracingehalt von 5 mg/kg) der Probe wird abgewogen, mit einer Mischung aus 24,0 ml der Mischung (4.4) und 1,0 ml Natriumsulfidlösung (4.9) versetzt und 10 Minuten lang homogenisiert. Anschließend werden 25 ml Phosphatpuffer (4.5) zugesetzt und 15 Minuten lang geschüttelt und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung werden 20 ml entnommen und der pH-Wert mit Hilfe einer 1 M Natronlauge (4.8) mit einem pH-Meter oder mit Bromkresolpurpurlösung (4.10) als Indikator auf 6,5 eingestellt. Die Mischung wird in einem Vakuum-Rotationsverdampfer bei höchstens 35 °C auf ungefähr 4 ml eingedampft. Der Rückstand wird mit Phosphatpuffer verdünnt (4.5), um einen erwarteten Zink-Bacitracingehalt von 0,42 IE/ml (= U_8) zu erhalten.

6.2. *Testlösungen*

Von der Lösung U_8 werden die Lösungen U_4 (erwarteter Gehalt : 0,21 IE/ml), U_2 (erwarteter Gehalt : 0,105 IE/ml) und U_1 (erwarteter Gehalt : 0,0525 IE/ml) durch aufeinanderfolgende Verdünnung (1 : 1) mit Phosphatpuffer (4.5) hergestellt.

7. Testverfahren

7.1. *Beimpfung des Nährbodens*

Der Testnährboden (4.2) wird mit der Bakteriensuspension (3.2) bei ungefähr 50 °C beimpft. Bei Vorversuchen auf Platten mit dem Testnährboden (4.2) wird die Menge des Inokulums ermittelt, die möglichst große, aber noch scharfe Hemmzonen mit den verschiedenen Zink-Bacitracin-Konzentrationen ergibt.

7.2. *Herstellung der Platten*

Der Test ist als Diffusionstest auf Platten mit je vier Konzentrationsstufen der Standardlösung (S_8, S_4, S_2, S_1) und der Testlösungen (U_8, U_4, U_2, U_1) angelegt. Jede Platte erhält unbedingt alle vier Konzentrationen des Standards und des Extrakts. Daher muß die Plattengröße so bemessen sein, daß mindestens acht Löcher mit einem Durchmesser von 10-13 mm und mindestens 30 mm zwischen den Lochzentren in die Nährbodenschicht gestanzt werden können. Der Test sollte vorzugsweise auf Platten durchgeführt werden, die aus einer Glasscheibe mit einem daraufgelegten plangedrehten Aluminium- oder Kunstoffring von 20 mm Höhe und 200 mm Durchmesser hergestellt werden.

Auf die Platten wird eine Menge des nach 7.1 beimpften Testnährbodens (4.1) gegossen, so daß sich eine ca. 2 mm dicke Schicht ergibt (60 ml für eine Platte von 200 mm Durchmesser). Nachdem die Schicht festgeworden ist, werden die Löcher gestanzt und genau abgemessene Mengen der Standard- und Testlösungen einpipettiert. (Zwischen 0,10 und 0,15 ml pro Loch, je nach Lochdurchmesser). Jede Konzentration muß mindestens in vierfacher Wiederholung angewendet werden, so daß für jeden Test 32 Hemmzonen ausgewertet werden.

7.3. *Inkubation*

Die Inkubation erfolgt während 16 bis 18 Stunden bei 30° C ± 2° C.

8. Auswertung

Der Durchmesser der Hemmzonen wird auf 0,1 mm genau gemessen. Für jede Konzentration werden die Mittelwerte auf Semilogarithmenpapier aufgetragen, wobei der Logarithmus der Konzentrationen gegen den Durchmesser der Hemmzonen eingetragen wird. Für die Standardlösung sowie für den Extrakt werden die geeignetsten Geraden — wie beispielsweise nachstehend berechnet — gezogen. Der geeignetste Punkt für das niedrigste Niveau der Standardlösung (SL) wird nach folgender Formel ermittelt :

$$\text{(a) } SL = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

Der geeignetste Punkt für das höchste Niveau der Standardlösung (SH) wird nach folgender Formel ermittelt :

$$\text{(b) } SH = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Genauso werden uch die geeignetsten Punkte für das niedrigste (UL) und höchste Niveau (UH) des Extrakts errmittelt, indem in der obigen Formel — anstelle von s_1, s_2, s_4 und s_8 — u_1, u_2, u_4 und u_8 eingesetzt werden.

Die ermittelten SL- und SH-Werte werden auf dasselbe Diagramm aufgetragen. Indem man die beiden Punkte miteinander verbindet, erhält man die geeignetste Gerade für die Standardlösung. Ebenso wird mit den UL- und UH-Werten verfahren, um die geeignetste Gerade für den Extrakt zu erhalten.

In Abwesenheit von Störfaktoren sollten die Geraden parallel sein. Die Geraden können als parallel angesehen werden, wenn die Werte (SH-SL) und (UH-UL) nicht mehr als 10 v. H. vom Mittelwert abweichen.

Falls die Geraden nicht parallel sind, kann man entweder u_1 und s_1 oder u_8 und s_8 ausschalten. Dann sind die Werte, SL, SH, UL und UH mit folgenden Formeln zu ermitteln, um die geeignetste Gerade zu erhalten :

$$\text{(a') } SL = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_2 + 2s_4 - s_8}{6}$$

$$\text{(b') } SH = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{oder} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

Ebenso wird für UL und UH verfahren. Auch hier gelten dieselben Parallelitätsanforderungen. Falls das Ergebnis aus drei Niveaus ermittelt wurde, sollte dies im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden als parallel anzusehen sind wird der Logarithmus der relativen Aktivität (log A) durch eine der folgenden Formeln ermittelt, je nachdem, ob 3 oder 4 Niveaus für die Beurteilung der Parallelität verwendet wurden.

Für 4 Niveaus

$$\text{(c) } \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}602}{u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2}$$

Für 3 Niveaus

$$\text{(d) } \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0{,}401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

oder

$$\text{(d') } \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0{,}401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Tätigkeit des Probenextrakts = Aktivität der jeweiligen Standardlösung × A:

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Wenn die relative Aktivität außerhalb des Bereichs der Werte 0,5 bis 2,0 liegt, wird die Bestimmung bei entsprechender Anpassung der Extraktkonzentrationen, bzw. der Standardlösungen wiederholt. Falls die relative Aktivität nicht in den Bereich der erforderlichen Werte gebracht werden kann, ist das Ergebnis als annähernd anzusehen. Dies sollte im Analyseprotokoll vermerkt werden.

Wenn die Geraden nicht als parallel anzusehen sind, wird die Bestimmung wiederholt. Wenn noch keine Parallelität erreicht wurde, ist die Bestimmung als unbefriedigend anzusehen.

Die Ergebnisse werden in Milligramm Zink-Bacitracin je kg Futtermittel ausgedrückt.

9. **Wiederholbarkeit**

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen zweier Bestimmungen eines Analytikers sollte bei ein- und derselben Probe bei Gehalten von

— bis zu 10 mg/kg — 2 mg/kg absolut,
— 10 — 25 mg/kg — 20 v. H. des höheren Resultats,
— 25 — 50 mg/kg — 5 mg/kg absolut,
— über 50 mg/kg — 10 v. H. des höheren Resultats

nicht überschreiten.".