

Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen
Bestimmung
 von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien
 Plattengußverfahren (Referenzverfahren)

DIN
10103

Microbiological analysis of meat and meat products; determination of mesophilic sulfite reducing clostridia; method with poured plates (reference method)

Analyse microbiologique de la viande et des produits à base de viande; détermination des clostridia mésophiliques réduisant le sulfite; méthodes d'ensemencement en profondeur (méthode de référence)

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm legt ein Referenzverfahren zur Bestimmung der Anzahl von mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien fest. Das Verfahren ist anwendbar bei Fleisch und Fleischerzeugnissen sowie bei Erzeugnissen mit einem Zusatz von Fleisch und Fleischerzeugnissen.

Mit dieser Norm kann darüber hinaus die Anzahl von Clostridium perfringens innerhalb der Gruppe der mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien nach Abschnitt 8.2.3 bestimmt werden.

ANMERKUNG: Ferner ist es möglich, die Anzahl mesophiler sulfitreduzierender Clostridien-Sporen je g oder ml der Probe zu bestimmen (siehe Anmerkung zu Abschnitt 7).

2 Begriff

Mesophile sulfitreduzierende Clostridien

Mesophile sulfitreduzierende Clostridien sind Bakterien, die nach dem in dieser Norm festgelegten Verfahren in einem Selektivnährboden schwarze Kolonien bilden und sich durch GRAM-Färbung als grampositive Stäbchen mit typischer Struktur darstellen.

3 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Jeweils 1 ml der unverdünnten homogenisierten Probe oder der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungen werden in leere Petrischalen eingebracht, in die anschließend ein selektiver Nährboden gegossen wird.

Bei einer Temperatur von 37°C wird unter anaeroben Bedingungen 24 bis 48 h bebrütet. Aus dem Anteil der schwarzen, durch GRAM-Färbung bestätigten Kolonien wird die Anzahl mesophiler sulfitreduzierender Clostridien je g oder je ml der Probe berechnet.

Bei zusätzlicher Durchführung des Reverse-CAMP-Tests¹⁾ kann außerdem die Anzahl von Clostridium perfringens je g oder je ml der Probe innerhalb der Gruppe der mesophilen sulfitreduzierenden Clostridien berechnet werden.

4 Chemikalien, Nährböden und Testorganismus

Die Nährbodenbestandteile und Chemikalien müssen für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sind eindeutig deklarierte Nährbodenbestandteile und analysenreine Chemikalien

oder Trockennährböden zu verwenden. Den Anweisungen des Herstellers ist strikt zu folgen. Das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und mindestens von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Bestandteile enthalten, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen.

4.1 Sulfit-Cycloserin-Azid-Agar (SCA-Agar)

4.1.1 Grundnährboden

4.1.1.1 Zusammensetzung

- 15,0 g Tryptose
- 5,0 g Pepton aus Sojamehl
- 5,0 g Hefeextrakt
- 5,0 g Fleischextrakt
- 2,0 g Glucose
- 0,5 g Ammoniumeisen(III)-citrat
- 0,5 g Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)
- 12 bis 15 g Agar, je nach Gelieeigenschaften
- 1000 ml Wasser

4.1.1.2 Herstellung

Die Nährbodenbestandteile oder der Trockennährboden werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$ liegt, gemessen bei einer Temperatur von etwa 45°C. Der Nährboden wird in Portionen zu etwa 100 ml in Kulturkolben übergeführt und 10 min bei 121°C sterilisiert. Wenn der Nährboden nicht unmittelbar nach der Herstellung verwendet wird, ist er im Dunkeln und bei einer Temperatur zwischen 0 und 5°C so aufzubewahren, daß keine Veränderungen eintreten können. Er darf nicht länger als 2 Wochen aufbewahrt werden.

ANMERKUNG: Es empfiehlt sich, die Chemikalien Ammoniumeisen(III)-citrat und Natriummetabisulfit getrennt von den übrigen Nährbodenbestandteilen in wäßriger Lösung anzusetzen. Dazu werden 0,5 g Ammoniumeisen(III)-citrat und 0,5 g Natriummetabisulfit in 100 ml Wasser gelöst. Die Wassermenge für den Grundnährboden reduziert sich dadurch auf 900 ml.

¹⁾ Das Wort „CAMP“ ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben der Autoren, die das typische Phänomen erstmals beobachteten (Christie, R., N.E. Atkins und E. Munch-Petersen: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 22, 197-200 (1944)).

Fortsetzung Seite 2 bis 5

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

4.1.2 Cycloserin-Azid-Lösung

4.1.2.1 Zusammensetzung

- 1,5 g D-Cycloserin, $w = \text{mindestens } 97\%^{2,3)}$
- 0,25 g Natriumazid
- 50 ml Wasser

4.1.2.2 Herstellung

Die Substanzen werden in Wasser gelöst. Die Lösung wird anschließend durch Filtration sterilisiert und kann bei einer Temperatur zwischen 0 und 5°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

4.1.3 Vollständiger Nährboden

4.1.3.1 Zusammensetzung

- 100 ml Grundnährboden nach Abschnitt 4.1.1
- 1 ml Cycloserin-Azid-Lösung nach Abschnitt 4.1.2

4.1.3.2 Herstellung

Vor dem Ausgießen des Nährbodens in die Petrischalen wird die Cycloserin-Azid-Lösung dem auf etwa 45°C abgekühlten Grundnährboden hinzugefügt und gut vermischt.

4.2 Diagnostischer Sensibilitätstest-Blutagar

mit einem Volumenanteil von 7 % defibriniertem Schafblut (DST-Agar mit 7 % defibriniertem Schafblut)⁴⁾

4.2.1 Grundnährboden

4.2.1.1 Zusammensetzung

- 10,0 g Proteose-Pepton
- 10,0 g Fleischextrakt
- 2,0 g Glucose
- 3,0 g Natriumchlorid
- 2,0 g di-Natriumhydrogenphosphat
- 1,0 g Natriumacetat
- 0,01 g Adeninsulfat
- 0,01 g Guaninhydrochlorid
- 0,01 g Uracil
- 0,01 g Xanthin
- 0,00002 g Thiaminhydrochlorid
- 12 bis 15 g Agar, je nach Gelieeigenschaften
- 1000 ml Wasser

4.2.1.2 Herstellung

Die Nährbodenbestandteile oder der Trockennährboden werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$ liegt, gemessen bei einer Temperatur von etwa 45°C. Der Nährboden wird in Kulturkolben übergeführt und 15 min bei 121°C sterilisiert. Wenn der Nährboden nicht unmittelbar nach der Herstellung verwendet wird, ist er im Dunkeln und bei einer Temperatur zwischen 0 und 5°C so aufzubewahren, daß keine Veränderungen eintreten können. Er darf nicht länger als 2 Wochen aufbewahrt werden.

4.2.2 Schafblut

Selbstgewonnenes defibriniertes Schafblut zur unmittelbaren Verwendung oder steriles defibriniertes Schafblut aus dem Handel.

4.2.3 Vollständiger Nährboden

Zur Herstellung des vollständigen Nährbodens werden dem verflüssigten, auf etwa 45°C temperierten Grundnährboden nach Abschnitt 4.2.1 70 ml Schafblut (Raumtemperatur) unter sterilen Bedingungen zugegeben und gut vermischt.

4.2.4 Herstellen der Agarplatten

Teilmengen von etwa 15 ml des vollständigen Nährbodens werden in Petrischalen übergeführt und zum Verfestigen stehengelassen. Im voraus hergestellte Platten dürfen nicht länger als 4 h bei Raumtemperatur oder einen Tag bei einer Temperatur zwischen 0 und 5°C aufbewahrt werden. Sofern die Platten gegen Austrocknung geschützt werden, sind sie bei einer Lagertemperatur zwischen 0 und 5°C bis zu 7 Tage verwendbar.

Unmittelbar vor der Verwendung werden die Platten mit der Agaroberfläche nach unten, schräg auf dem abgenommenen Deckel liegend, in einem Brutschrank etwa 30 min bei vorzugsweise 50°C getrocknet. Alternativ können die Platten bei 37°C etwa 60 min getrocknet werden.

4.3 Verdünnungslösung

Nach DIN 10162

4.4 Physiologische Kochsalzlösung

4.4.1 Zusammensetzung

- 8,5 g Natriumchlorid
- 1000 ml Wasser

4.4.2 Herstellung

Das Natriumchlorid wird in Wasser gelöst und in einem Kulturkolben 20 min bei 121°C sterilisiert.

4.5 Testorganismus

Als Indikatorstamm für den Reverse-CAMP-Test wird ein β -hämolisierender *Streptococcus agalactiae* (Referenzstamm z. B. DSM 2134, der ATCC 13813 und NCTC 8181 entspricht) verwendet, der mit α -toxinproduzierenden *C. perfringens* eine typische β -hämolytische Reaktion auf DST-Agar mit 7 % defibriniertem Schafblut nach Bebrütung zeigt.

5 Geräte

Alle Glasgeräte müssen vor der Verwendung sorgfältig gereinigt und sterilisiert werden. Kunststoffgeräte müssen steril sein.

Zusätzlich zu den in DIN 10162 aufgeführten Geräten werden die Geräte nach den Abschnitten 5.1 und 5.8 benötigt.

ANMERKUNG: Mechanische Pipetten und andere Geräte für die mechanisierte und automatisierte Durchführung der Arbeitsvorgänge dürfen verwendet werden, sofern durch entsprechende Untersuchungen sichergestellt ist, daß vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

5.1 Brutschrank, einstellbar auf 50°C

5.2 Brutschrank, einstellbar auf $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, z. B. Brutschrank nach DIN 58 945 Teil 1

²⁾ w = Massenanteil

³⁾ Nach dem jeweils gültigen Arzneibuch

⁴⁾ Auskunft über Bezugsquellen für geeignete Basis-Trockennährböden erteilt der Normenausschuß für Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN, 10772 Berlin.

5.3 Wasserbäder zum Erhitzen und Kühlen der Nährböden auf geeignete Temperaturen

5.4 Petrischalen, Durchmesser etwa 9 cm, z. B. Petrischalen nach DIN 12 339

5.5 Geeignete Gefäße und Geräte zur Herstellung anaerober Verhältnisse

5.6 Impföse

5.7 Objektträger

5.8 Mikroskop

6 Probenahme

Nach DIN 10 162

7 Durchführung

Die Zeitspanne vom Beginn der Herstellung der Erstverdünnung nach Abschnitt 7.3 bis zur Beimpfung des Nährbodens nach Abschnitt 7.5 darf 30 min nicht überschreiten.

ANMERKUNG: Falls die Anzahl mesophiler sulfitreduzierender Clostridien-Sporen je g bzw. ml der Probe ermittelt werden soll, ist es erforderlich, das Probenmaterial (unverdünnte flüssige oder verdünnte Probe) vorab einer Erhitzung (Pasteurisierung) bei 80 °C über 10 min zu unterziehen.

7.1 Vorbereitung der Verdünnungsröhrchen und -kolben

Nach DIN 10 162

7.2 Vorbereitung der Probe

Nach DIN 10 162

7.3 Herstellung der Erstverdünnung

Nach DIN 10 162

7.4 Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen

Nach DIN 10 162

7.5 Beimpfung

Die Verdünnungsreihe wird im Doppelansatz untersucht. Mit einer Pipette wird jeweils 1 ml der unverdünnten, homogenisierten Probe oder der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungen in leere Petrischalen übergeführt. Dabei ist mit der höchsten Verdünnung zu beginnen.

Innerhalb von 5 min werden in jede Petrischale etwa 20 ml des geschmolzenen, auf etwa 45 °C abgekühlten Nährbodens nach Abschnitt 4.1.3 gegossen.

Der Nährboden wird mit der Impfmenge gründlich vermisch.

Es ist darauf zu achten, daß die Petrischalen beim Verfestigen in horizontaler Lage sind.

7.6 Bebrütung

Die Platten werden unter anaeroben Bedingungen, jedoch nicht unter Vakuum, mit dem Boden nach oben 24 bis 48 h bei einer Temperatur von 37 °C im Brut-

schränk nach Abschnitt 5.2 bebrütet. Dabei ist besonders darauf zu achten, daß die beimpften Platten so schnell wie möglich, spätestens jedoch nach 30 min, unter anaerobe Bedingungen zu bringen sind, da Clostridien gegenüber Sauerstoffzutritt sehr empfindlich reagieren.

ANMERKUNG: Längere Bebrütungszeiten können bei Anwesenheit eines überwiegenden Anteils von Clostridium perfringens zu einer übermäßigen Schwärzung am Bodenrand der Platte führen.

8 Auswertung

8.1 Zählen der Kolonien

Nach Ablauf der Bebrütungszeit wird die Anzahl der schwarzen Kolonien jeder Platte bestimmt.

8.1.1 Beim Zählen werden nur solche Platten berücksichtigt, auf denen sich 1 bis 150 Kolonien gebildet haben. Bei kleinen und gut auszählbaren Kolonien können auch Platten mit bis zu 200 Kolonien herangezogen werden.

8.1.2 Wenn weniger als 15 schwarze Kolonien bei den Platten mit einer unverdünnten, homogenisierten Probe oder mit der niedrigsten Dezimalverdünnung (Erstverdünnung) vorhanden sind, werden diese Platten zur Schätzung der Zahl mesophiler sulfitreduzierender Clostridien bzw. Clostridium perfringens herangezogen.

8.2 Bestätigung

8.2.1 Auswahl der Kolonien

Von einer der nach den Abschnitten 8.1.1 oder 8.1.2 ausgezählten Platten werden 10 gut abgesetzte schwarze Kolonien ausgewählt. Sind auf einer Platte eines Doppelansatzes weniger als 10 schwarze Kolonien vorhanden, ist die andere Platte der gleichen Verdünnungsstufe mit heranzuziehen. Sind auf den Platten einer Verdünnungsstufe weniger als 10 schwarze Kolonien vorhanden, sind alle Kolonien zu verwenden.

8.2.2 Prüfung auf mesophile sulfitreduzierende Clostridien

Jede der ausgewählten Kolonien wird mit der Impföse aus dem Agar entnommen, auf einem Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung nach Abschnitt 4.4 verrieben und nach GRAM gefärbt.

ANMERKUNG: Soll zusätzlich auf das Vorhandensein von Clostridium perfringens geprüft werden, wird aus der Keimsuspension vor der Färbung erst der DST-Agar mit 7 % defibriniertem Schafblut nach Abschnitt 4.2 beimpft.

Als mesophile sulfitreduzierende Clostridien gelten schwarze Kolonien dann, wenn die mikroskopischen Ausstriche das Vorliegen einer der folgenden Befunde ergeben haben:

- a) grampositive bis gramlabile Stäbchen mit oder ohne Sporen
- b) gramlabile bis gramnegative Stäbchen mit Sporenbildung.

8.2.3 Prüfung auf Clostridium perfringens

Für die zusätzliche Bestätigung von C. perfringens wird der Reverse-CAMP-Test herangezogen.

Mit Hilfe einer Impföse wird der Indikatorstamm nach Abschnitt 4.5 auf eine Platte nach Abschnitt 4.2.4 über die Mitte der Petrischale als durchgehender Impfstrich aufgetragen. Im Abstand von 1 mm zu diesem Impfstrich werden beidseitig im rechten Winkel parallele Impfstriche der zu prüfenden Keimsuspensionen nach Abschnitt 8.2.2 aufgetragen.