

Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich

Teil 1: Quantitatives Tupfverfahren

DIN
10113-1

ICS 07.100.30; 67.020

Deskriptoren: Oberflächenkeimzahl, Bedarfsgegenstand, Lebensmittel, Einrichtungsgegenstand, Gehaltsbestimmung

Determination of surface colony count on fitment and utensils in foodareas — Part 1: Quantitative swab method

Détermination du comptage des colonies de la surface sur objets d'équipement et de consommation dans les domaines alimentaires — Partie 1: Méthode quantitative du tampon

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß "Veterinärmedizinische Fleischuntersuchung", erarbeitet und mit dem Arbeitsausschuß "Mikrobiologische Milchuntersuchung" abgestimmt.

Anhang A und Anhang B sind informativ.

DIN 10113 "Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich" besteht aus:

Teil 1: Quantitatives Tupfverfahren

Teil 2: Semiquantitatives Tupfverfahren

Teil 3: Semiquantitatives Verfahren mit Nährbodenbeschichteten Entnahmeverrichtungen (Abklatschverfahren)

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich am Beispiel eines Tropfplatten-Verfahrens fest.

Im Anschluß an die in dieser Norm beschriebene Probenahme dürfen auch andere geeignete quantitative Nachweisverfahren (siehe Anhang B) verwendet werden.

ANMERKUNG: Dieses Verfahren eignet sich auch für eine mikrobiologische Kontrolle der Wirksamkeit von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln.

Das Verfahren ist nicht für Einrichtungs- und Bedarfsgegenstände anwendbar, die makroskopisch sichtbare Desinfektionsmittel- oder Reinigungsmittelfilme aufweisen.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 10162 : 1982-11

Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen — Vorbereitung der Proben

DIN 12680-1

Laborgeräte aus Glas — Meßzylinder mit Strichteilung

DIN 12695

Laborgeräte aus Glas — Meßpipetten für teilweisen Ablauf, Klasse A und Klasse B

DIN 58945-1

Brutschränke für mikrobiologische Zwecke — Begriffe, Anforderungen, Anwendung

DIN EN 285

Sterilisation — Dampf-Sterilisatoren — Groß-Sterilisatoren; Deutsche Fassung EN 285 : 1996

3 Definitionen

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Definitionen:

3.1 Homogenisierung

Die Homogenisierung ist die mit elektromechanischen Geräten erzielbare, weitgehend homogene Verteilung von Zell- und Gewebekomponenten in einer wäßrigen Phase, wobei auch mikrobielle Zellverbände aufgelöst sein sollen. [DIN 10162 : 1982-11]

3.2 Ausschütteln; Schütteln

Extrahieren und annähernd homogenes Verteilen von Mikroorganismen aus Wasserträgern in die Verdünnungslösung durch elektromechanische Einwirkung.

Fortsetzung Seite 2 bis 9

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

3.3 Erstverdünnung (durch Ausschütteln oder Extraktion)

Verdünnung, die sich durch Ausschütteln von Watteträgern oder Extraktion im Beutel-Walkmischgerät mit einer bestimmten Menge Verdünnungslösung ergibt.

3.4 Dezimalverdünnungen; Dezimalverdünnungsreihe

Verdünnungen, die sich aus dem Vermischen eines Teilverolumens der dezimalen oder nicht-dezimalen Erstverdünnung mit dem 9fachen Volumen Verdünnungslösung und dem Wiederholen dieses Vorganges, stets beginnend mit der vorangegangenen Verdünnung, ergeben, bis eine für die Beimpfung der mikrobiologischen Nährböden geeignete Verdünnungsreihe erhalten wird.

3.5 Einrichtungs- und Bedarfsgegenstände

Bewegliche und nicht bewegliche Teile wie Fußböden, Wände, Podeste, Arbeitsflächen, Maschinenteile und Schneidwerkzeuge.

4 Prinzip

Die zu untersuchende Oberfläche bestimmter Größe wird markiert (z. B. mit einer Schablone) und anschließend mit einem angefeuchteten sowie einem trockenen Watteträger abgestrichen. Beide Watteträger werden nach Kappen der Tupfer vom Träger in einem Gefäß mit steriler Verdünnungslösung elektromechanisch ausgeschüttelt oder homogenisiert (Erstverdünnung). Aus dieser Verdünnung kann durch weiteres dezimales Verdünnen eine Verdünnungsreihe hergestellt werden, die für die Beimpfung der Nährböden geeignet ist. Die Agarplatten werden bebrütet, und die Anzahl der gewachsenen Kolonien wird gezählt.

Aus der ermittelten Anzahl koloniebildender Einheiten je ml Suspension wird unter Berücksichtigung der Größe der untersuchten Oberfläche und dem Gesamtvolumen der Erstverdünnung und dem Verdünnungsfaktor die Oberflächenkeimzahl je cm^2 berechnet.

5 Chemikalien und Nährbodenbestandteile

5.1 Allgemeines

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

5.2 Nährböden

5.2.1 Allgemeines

Abhängig von dem jeweiligen Untersuchungszweck wird ein für den quantitativen Nachweis spezifischer Keimspektren erforderliches selektives Nährmedium, das den jeweiligen in Normen aufgeführten Rezepturen entspricht, verwendet (siehe Anhang B). Für die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl wird Plate-Count-Agar verwendet.

5.2.2 Plate-Count-Agar

5.2.2.1 Zusammensetzung

- 5,0 g Pepton (Casein, tryptisch verdaut)
- 2,5 g Hefeextrakt, pulverisiert
- 1,0 g Glucose
- 12 bis 15 g Agar, je nach Gelieereigenschaft
- 1 000 ml Wasser

5.2.2.2 Herstellung

Die Nährbodenbestandteile oder der Trockennährboden werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ liegt, gemessen bei einer Temperatur von etwa 45°C . Der Nährboden wird in Kulturröhrchen oder -kolben übergeführt und 15 min bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ sterilisiert.

Wenn der Nährboden nicht unmittelbar nach der Herstellung verwendet wird, ist er im Dunkeln und bei einer Temperatur zwischen 0°C und 5°C so aufzubewahren, daß keine Veränderungen eintreten können. Er darf nicht länger als 1 Monat aufbewahrt werden.

5.2.2.3 Herstellung der Agarplatten

Teilmenngen von etwa 15 ml des geschmolzenen Nährbodens werden in sterile Petrischalen übergeführt und zum Verfestigen stehengelassen. Im voraus hergestellte Agarplatten dürfen nicht länger als 4 h bei Raumtemperatur oder einen Tag bei einer Temperatur zwischen 0°C und 5°C aufbewahrt werden. Sofern die Agarplatten gegen Austrocknung geschützt werden, sind sie bei einer Lager-temperatur zwischen 0°C und 5°C bis 7 Tage verwendbar. Unmittelbar vor der Verwendung werden die Agarplatten mit der Agaroberfläche nach unten, schräg auf dem abgenommenen Deckel liegend, in einem Brutschrank etwa 30 min bei vorzugsweise 50°C getrocknet.

ANMERKUNG: Bei Beachtung entsprechender Vorkehrungen wie Abkleben der Oberflächen dürfen Agarplatten, wenn die Eignung in Vergleichsuntersuchungen überprüft wurde, bis 4 Wochen aufbewahrt werden. Bei im Handel erhältlichen Produkten sollten die Herstellerangaben beachtet werden.

5.3 Verdünnungslösung

5.3.1 Zusammensetzung

- 1,0 g Pepton (Casein, tryptisch verdaut)
- 8,5 g Natriumchlorid (Na Cl)
- 1 000 ml Wasser

5.3.2 Herstellung

Die einzelnen Bestandteile werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ liegt. Wenn die Verdünnungslösung nicht unmittelbar nach der Herstellung verarbeitet wird, ist sie dunkel und bei einer Temperatur zwischen 0°C und 5°C derart aufzubewahren, daß keine Veränderungen des Volumens oder der Zusammensetzung auftreten können. Sie darf nicht länger als 1 Monat aufbewahrt werden.

ANMERKUNG: Alternativ darf auch die in der Milchuntersuchung übliche viertelstarke Ringer-Lösung verwendet werden.

5.4 Befeuchtungsmedium

Als Befeuchtungsmedium wird Verdünnungslösung nach 5.3 verwendet.

Zur Inaktivierung etwaiger Desinfektionsmittelrückstände müssen dem Befeuchtungsmedium entsprechende Ent-

hemmer zugesetzt werden (z. B. 30,0 g Polyoxyethylen-sorbitanmonooleat (Tween 80®)¹⁾ und 3 g Lecithin je Liter).

ANMERKUNG: Prinzipiell kann kein bestimmter Enthemmer vorgegeben werden, da der Einsatz von der Art des verwendeten Desinfektionsmittels abhängt. Haftende Desinfektionsmittel (z. B. quaternäre Ammoniumverbindungen, Amphotenside) können Rückstände auf Flächen hinterlassen und somit einen Enthemmer notwendig machen. Diese Mittel werden durch den angegebenen Enthemmer neutralisiert. Nicht haftende und flüchtige Mittel (z. B. alkoholische Desinfektionsmittel, Säuren) sind nach ordnungsgemäßen Nachspülen zum Zeitpunkt der Probenahme auf der Fläche nicht mehr vorhanden.

6 Geräte

6.1 Allgemeines

Alle Glas- und Metallgeräte müssen vor der Verwendung sorgfältig gereinigt und sterilisiert werden. Kunststoffgeräte müssen steril sein. Sie sind eine annehmbare Alternative zu Glasgeräten, sofern sie die gleichen Anforderungen erfüllen.

Die Sterilisation kann nach einem der folgenden Verfahren durchgeführt werden:

- a) Trockensterilisation:
Mindesttemperatur 170 °C;
Mindestdauer 1 h.
- b) Wasserdampfsterilisation:
Temperatur (121 ± 1) °C;
Mindestdauer 15 min.

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

6.2 Dampf-Sterilisator (Autoklav), regelbar auf (121 ± 1) °C, z. B. Dampf-Sterilisator nach DIN EN 285

6.3 Heißluftsterilisator, regelbar auf mindestens 180 °C

6.4 Beutel-Walkmischgerät mit sterilen Kunststoffbeuteln. Gefäße und Beutel müssen ein geeignetes Volumen aufweisen, um die Probe von üblicherweise mindestens 10 g und die 9fache Menge der Verdünnungslösung aufnehmen zu können.

6.5 pH-Meßeinrichtung mit Temperaturkompensation, geeignet zum Messen des pH-Werts auf ± 0,05

6.6 Kulturröhrchen, etwa 15 mm Durchmesser und 150 mm Länge

6.7 Kulturkolben, Nennvolumen 100 bis 500 ml

6.8 Elektromechanisches Mischgerät, mechanisches Gerät zum Mischen von Flüssigkeiten in Kulturröhrchen bzw. Erlenmeyerkolben, das nach dem Prinzip der exzentrischen Rotation des Kulturröhrcheninhalts arbeitet.

6.9 Meßpipetten mit Wattestopfen, Nennvolumen 1 ml, 100 ml, z. B. Pipetten nach DIN 12695

6.10 Meßzylinder, Nennvolumen 100 ml, z. B. Meßzylinder nach DIN 12680-1

6.11 Brutschrank, regelbar auf (30 ± 1) °C, z. B. Brutschrank nach DIN 58945-1

6.12 Meßzylinder, Nennvolumen abhängig von der Größe der zu untersuchenden Oberfläche (Fläche der Schablone nach 6.13) 20, 50 oder 100 ml

6.13 Schablone²⁾, die eine genau bekannte Fläche von mindestens 20 cm² begrenzt. Die Schablone muß aus einem korrosionsbeständigen Material, das leicht zu reinigen und sterilisierbar ist, gefertigt sein. Sie muß leicht auf der Unterlage zu fixieren sein und eine genügende Festigkeit aufweisen, um eine Formveränderung während der Probenahme auszuschließen. Andererseits muß die Schablone ausreichend flexibel sein, um eine Anpassung an gewölbte Oberflächen zu ermöglichen.

6.14 Watteträger in dicht verschließbaren Transportgefäßen, der sich hinsichtlich der Abriebstabilität und der Saugfähigkeit als geeignet erwiesen hat. Geeignet sind z. B. Watteträger mit einem Kopf aus fest gewickelter Baumwoll-Viskose-Watte (50% Baumwolle und 50% Viskose) mit einem Kopfdurchmesser zwischen 7 mm und 10 mm und einer Wattekopflänge von mindestens 20 mm.

6.15 Zange oder Schere zum Abkneifen bzw. Abschneiden der Watteträgerköpfe, abflammbar

6.16 Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 bis 250 ml

6.17 Glasgefäße, Nennvolumen 100 ml, mit weitem Hals, gut verschließbar, z. B. mit Schraubverschluß

7 Durchführung

(Siehe Bild A.1)

7.1 Vorbereitung der Verdünnungslösung und des Befeuchtungsmediums

7.1.1 Vorbereitung der Verdünnungslösung

Die Verdünnungslösung (siehe 5.3) wird 15 min bei 121 °C sterilisiert und anschließend in sterile Kulturröhrchen oder Kulturkolben in geeigneten Teilmengen übergeführt und bis zur Verwendung bei einer Temperatur zwischen 0 °C und 5 °C aufbewahrt. Die Sterilität der abgefüllten Verdünnungslösung ist sicherzustellen.

¹⁾ Tween 80® ist ein Warenzeichen der ICI-America Inc. Über die Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin

²⁾ Über Bezugsquellen für geeignete Schablonen gibt Auskunft: Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin