

Untersuchung von Lebensmitteln
Nachweis von Salmonellen mittels
Impedanz-Verfahren

DIN
10120

ICS 07.100.30

Analysis of foodstuffs —
Detection of Salmonella with impedance-method

Analyse pour produits alimentaires —
Recherche de Salmonella à base de la méthode
d'impédance

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), Arbeitsausschuss „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellverfahren“, erarbeitet.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mittels Impedanzmessung fest.

ANMERKUNG Auf die Vorschriften des Bundesseuchengesetzes wird hingewiesen.

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 (einschließlich Änderungen).

DIN 10115, *Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von Mikroorganismen in Lebensmitteln mittels Impedanz-Verfahren.*

DIN 12339, *Laborgeräte aus Glas — Petrischalen.*

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 12824, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen (ISO 6579:1993 modifiziert); Deutsche Fassung EN 12824:1997.*

ISO 7218:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations.*

Fortsetzung Seite 2 bis 12

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe:

3.1

Salmonellen

Mikroorganismen, die bei Wachstum und Vermehrung in flüssigen Anreicherungsmedien (Probenflüssigkeiten) auf Grund ihrer spezifischen Stoffwechselaktivität Veränderungen von elektrischen Messgrößen bewirken; sie bilden typische Kolonien auf festen, selektiven Nährböden und besitzen bei der Untersuchung nach diesem Verfahren die hier beschriebenen biochemischen und serologischen Eigenschaften

3.2

Nachweis von Salmonellen

Verfahren, mit dem die Anwesenheit oder Abwesenheit lebensfähiger Formen dieser Mikroorganismen in einer untersuchten Probenmenge festgestellt wird

ANMERKUNG In dieser Norm wird die Anwesenheit von Salmonellen anhand eines auffälligen Kurvenverlaufs der Messgrößen während der Inkubation der Probenflüssigkeit durch eine oder mehrere Kenngrößen angezeigt.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Die Untersuchung wird im Allgemeinen in mehreren aufeinander folgenden Schritten durchgeführt, da Salmonellen im Probenmaterial in geringer Anzahl, subletal geschädigt oder gemeinsam mit einer größeren Anzahl anderer Mikroorganismen vorkommen können.

4.2 Voranreicherung

Die Proben werden in einem nicht selektiven, flüssigen Nährmedium 16 h bis 20 h bei 37 °C bebrütet.

4.3 Anreicherung

Zwei Messzellen mit unterschiedlichen selektiven, flüssigen Nährmedien werden mit einer bestimmten Menge des bebrüteten Voranreicherungsnährmediums beimpft. Die Probenflüssigkeiten werden in der Bebrütungseinheit des Impedanzmesssystems mindestens 18 h bei 35 °C bis 37 °C bzw. 40 °C bis 42 °C bebrütet.

4.4 Isolierung

Sind die Messergebnisse aus einer oder beiden Messzellen als verdächtig zu bewerten, werden jeweils zwei feste, selektive Nährböden beimpft. Diese werden bei 37 °C für mindestens 18 h bebrütet. Danach wird auf die Anwesenheit von Kolonien untersucht, die auf Grund ihres Aussehens salmonellenverdächtig sind.

ANMERKUNG Die Agglutination verdächtiger Kolonien mit polyvalentem oder omnivalentem Salmonella-Antiserum kann zur Vorprüfung durchgeführt werden.

4.5 Identifizierung

Die salmonellenverdächtigen Kolonien werden in Reinkulturen weitergezüchtet und auf ihre besonderen serologischen und biochemischen Eigenschaften untersucht.

5 Chemikalien und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Chemikalien und Nährmedienbestandteile müssen für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Trocken-nährböden müssen nach den Anweisungen des Herstellers zubereitet werden.

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.

Für die Nachweisverfahren dürfen auch im Handel befindliche Nährmedien verwendet werden, sofern ihre Zusammensetzung den in diesem Abschnitt genannten Rezepturen entspricht oder bei vergleichbarer Wirksamkeit nur geringfügig von diesen abweicht.

5.2 Nährmedien

5.2.1 Nährmedien für die Voranreicherung

Gepuffertes Peptonwasser

a) Zusammensetzung

– Pepton aus Casein (tryptisch verdaut):	10,0 g
– Natriumchlorid:	5,0 g
– di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$:	9,0 g
– Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 :	1,5 g
– Wasser:	1 000 ml

b) Herstellung

Die Bestandteile werden durch Erhitzen gelöst. Der pH-Wert ist so einzustellen, dass er nach dem Sterilisieren bei $7,2 \pm 0,1$ liegt, bezogen auf eine Temperatur von 20°C .

Jeweils 225 ml dieser Lösung werden in 500-ml-Kolben übergeführt und 15 min bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ sterilisiert.

Es dürfen andere wissenschaftlich erprobte Voranreicherungs-nährmedien, auch unter Zusatz von Elektivsubstanzen, verwendet werden. Elektivsubstanzen sollten schonender sterilisiert werden.

5.2.2 Nährmedien für die Anreicherung

5.2.2.1 Allgemeines

Die Nährmedien müssen an die Verhältnisse des Messprinzips angepasst sein. Da sich auch gleichartige Nährmedien messsystembedingt in ihrer Rezeptur unterscheiden können, werden hier nur einige grundlegende Medien beispielhaft aufgeführt. Die über die Festlegungen dieser Norm hinausgehenden Angaben der Hersteller über die Zubereitung und Verwendung der Nährmedien sind strikt einzuhalten. Es kann erforderlich sein, die Nährmedien auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Matrix zu modifizieren.

Es empfiehlt sich, die Nährmedien nur in solchen Teilmengen abzufüllen, die dem täglichen Verbrauch entsprechen.

5.2.2.2 Modifiziertes Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Impedanz-Medium nach RAPPAPORT-VASSILIADIS (mod. RVI-Medium)

5.2.2.2.1 Grundnährmedium

a) Zusammensetzung

– Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	40,0 g
– Natriumchlorid	2,0 g
– Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)	5,0 g
– Hefeextrakt	3,0 g
– D(–)-Mannit	5,0 g
– Malachitgrün-oxalat	0,04 g
– Glycerophosphat-Natrium	1,56 g
– Wasser	auf 1 000 ml



b) Herstellung

Die Bestandteile oder das Trockennährmedium werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert ist auf $6,5 \pm 0,1$ einzustellen, bezogen auf eine Temperatur von 20°C . Das Nährmedium wird in Teilmengen von maximal 500 ml in Kolben abgefüllt und anschließend 10 min (Haltezeit) bei 80°C im Wasserbad pasteurisiert oder 10 min (Gesamtzeit) im Dampftopf erhitzt. Unmittelbar nach der Erhitzung werden die Kolben rasch abgekühlt.

Das Nährmedium ist unter Kühlung (2°C bis 8°C) und lichtgeschützt etwa eine Woche haltbar.

ANMERKUNG Soll das Nährmedium länger aufbewahrt werden, empfiehlt es sich, die Erhitzung durch eine Sterilfiltration zu ersetzen.

5.2.2.2.2 Selenit-Lösung

a) Zusammensetzung

- | | |
|---|------------|
| – Natriumhydrogenselenit, NaHSeO_3 | 2,0 g |
| – Wasser | auf 100 ml |

b) Herstellung

Das Selenit wird im Wasser aufgelöst. Die Lösung wird steril filtriert.

ANMERKUNG Der Zusatz von Novobiocin-Lösung (5.2.2.2.3) an Stelle von Selenit-Lösung sollte bei Trockenprodukten (z. B. Milchpulver und ähnliche Erzeugnisse, Gewürze) erfolgen, wenn mit einer gram-positiven Mikroflora, insbesondere aeroben Sporenbildern, zu rechnen ist.

5.2.2.2.3 Novobiocin-Lösung

a) Zusammensetzung

- | | |
|--------------|------------|
| – Novobiocin | 0,2 g |
| – Ethanol | 10 ml |
| – Wasser | auf 100 ml |

b) Herstellung

Das Novobiocin wird im Ethanol aufgelöst. Die Lösung wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und sterilisiert.

5.2.2.2.4 Vollständiges Nährmedium

Herstellung

Zu 1 000 ml Grundnährmedium werden entweder 10 ml der Selenit-Lösung nach 5.2.2.2.2 oder 10 ml der Novobiocin-Lösung nach 5.2.2.2.3 zugesetzt.

5.2.2.3 Modifiziertes Selenit-Cystin-Impedanz-Medium nach EASTER-GIBSON (mod. SCI-Medium)

5.2.2.3.1 Grundnährmedium

a) Zusammensetzung

- | | |
|--|--------------|
| – Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut) | 5,0 g |
| – Dulcit | 5,0 g |
| – Trimethylamin-N-oxid-Dihydrat (TMAO) | 5,6 g |
| – Natriumhydrogenselenit, NaHSeO_3 | 4,0 g |
| – di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 10,0 g |
| – Wasser | auf 1 000 ml |

b) Herstellung

Die Nährbodenbestandteile oder das Trockennährmedium werden in Wasser gelöst. Der Ansatz wird in Teilmengen von maximal 500 ml in Kolben abgefüllt. Das Nährmedium darf kurzfristig auf maximal 60°C erwärmt werden und wird anschließend sofort abgekühlt.