

DIN EN 13704



ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 13704:2002-05

**Chemische Desinfektionsmittel –
Quantitativer Suspensionversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung
chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie,
Haushalt und öffentliche Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 13704:2018**

Chemical disinfectants –

Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants
used in food, industrial, domestic and institutional areas –

Test method and requirements (phase 2, step 1);

German version EN 13704:2018

Désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants
chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines
domestiques et en collectivité –

Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);

Version allemande EN 13704:2018

Gesamtumfang 45 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 13704:2018) wurde von der Arbeitsgruppe 3 *Lebensmittelhygiene und Anwendung im Haushalt und öffentlichen Einrichtungen* (Sekretariat: Italien, UNI) des Technischen Komitees CEN/TC 216 *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA *Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)*, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 216/WG 3) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13704:2002-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von EN 14885 in die normativen Verweisungen;
- b) Abschnitt „Begriffe“ (3) überarbeitet (für die Anwendung des Dokumentes gelten die Begriffe nach EN 14885);
- c) Anforderungen (4) überarbeitet (Tabelle 1 „Mindestprüfungen und zusätzliche Prüfbedingungen“ neu aufgenommen);
- d) Abschnitt „Prüfverfahren“ (5) technisch überarbeitet;
- e) Anhang A (normativ) „Herstellung von Sporen-Stammsuspensionen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus*“ überarbeitet;
- f) Anhang B (normativ) „Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens“ überarbeitet;
- g) Anhang C (informativ) „Herstellung einer Stammlösung von *Clostridium sporogenes*-Sporen“ überarbeitet;
- h) Anhang F (informativ) „Beispiel für einen typischen Prüfbericht“ überarbeitet;
- i) Anhang G (informativ) „Referenzstämme in nationalen Sammlungen“ aktualisiert;
- j) Anhang H (informativ) „Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ wurde gestrichen;
- k) Literaturhinweise aktualisiert;
- l) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN 13704: 2002-05

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel —
Quantitativer Suspensionversuch zur Bestimmung
der sporiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel
in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und
öffentliche Einrichtungen —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants —
Quantitative suspension test for the evaluation of
sporicidal activity of chemical disinfectants used in
food, industrial, domestic and institutional areas —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés
dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie,
dans les domaines domestiques et en collectivité —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 16. März 2018 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen.....	8
5 Prüfverfahren.....	8
5.1 Kurzbeschreibung.....	8
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismen.....	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines.....	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laboratoriumsausrüstung und im Besonderen die folgenden Geräte:.....	12
5.4 Herstellung der Sporensuspension und Prüflösungen	13
5.4.1 Sporensuspensionen	13
5.4.2 Produktprüflösung	15
5.5 Verfahren.....	15
5.5.1 Auswahl der Untersuchungsbedingungen	15
5.5.2 Prüfverfahren für die Bewertung der sporiziden Wirkung des Produktes	16
5.5.3 Validierung des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens.....	18
5.6 Berechnung und Angabe der Ergebnisse.....	19
5.6.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische.....	19
5.6.2 Berechnung	19
5.7 Verifizierung des Verfahrens	25
5.7.1 Allgemeines.....	25
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen.....	25
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	25
5.7.4 Angabe der Ergebnisse	26
5.8 Schlussfolgerung	26
5.9 Prüfbericht	26
Anhang A (normativ) Herstellung von Sporen-Stammsuspensionen von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus cereus</i>	28
A.1 Material und Reagenzien	28
A.2 Herstellung der <i>Bacillus</i> -Sporen-Stammsuspension	28
Anhang B (normativ) Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens.....	30
B.1 Kurzbeschreibung.....	30
B.2 Herstellung der Sporensuspension	30
B.3 Herstellung der Produktprüflösung	30
B.4 Prüfung zur Validierung	30
B.4.1 Verdünnungs-Neutralisationsverfahren	30

B.4.2	Membranfiltrationsverfahren.....	32
B.5	Validierung.....	34
Anhang C (informativ) Herstellung einer Stammlösung von <i>Clostridium sporogenes</i> -Sporen.....		35
C.1	Kulturmedien und Reagenzien	35
C.2	Geräte und Glasgeräte.....	36
C.3	Herstellung von regenerierten Medien und Bebrütungsbedingungen.....	36
C.4	Herstellung einer <i>Clostridium</i> -Sporen-Stammsuspension.....	37
Anhang D (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten.....		38
Anhang E (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht.....		40
Anhang F (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen		42
F.1	<i>Bacillus subtilis</i>	42
F.2	<i>Bacillus cereus</i>	42
F.3	<i>Clostridium sporogenes</i>	42
Literaturhinweise		43

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 13704:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2019 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 13704:2002.

Es wurde überarbeitet, um die Kontrollen zur Sporenempfindlichkeit aufzunehmen, um besser die Durchführung der Sporenerstellung zu beschreiben und das Auszählen und die Darstellung der Ergebnisse mit den anderen aktuellen Normen des CEN/TC 216 zu harmonisieren.

EN 13704:2018 enthält im Vergleich zu EN 13704:2002 die folgenden Änderungen:

- Einschluss von Kontrollen für die Empfindlichkeit der Sporensuspensionen;
- Änderung des Verfahrens für die Sporenerstellung;
- Einschluss der Reifungszeit der Sporen;
- Harmonisierung der Auszählung und der Darstellung der Ergebnisse mit anderen aktuellen Normen des CEN/TC 216;
- Streichung der obligatorischen Bedingungen für die Einwirkzeit und -temperatur;
- Einschluss von Minimum- und Maximum-Bedingungen für die Einwirkzeit und -temperatur;
- Einschluss hoher Belastung.

Ergebnisse, die mit der vorherigen Fassung erhalten werden, sind ungültig.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Suspensionsprüfverfahren, mit dem festgestellt werden kann, ob ein chemisches Desinfektionsmittel für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche eine sporizide Wirkung aufweist oder nicht.

Dieses Verfahren ist ein Laborversuch und simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, in Suspension usw.) spiegeln Parameter wider, wie sie in der Praxis vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können. Jede Anwendungskonzentration, die aus dieser Prüfung resultiert, entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen.

Die Bedingungen genügen den allgemeinen Ansprüchen und wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten erlauben.

Unter besonderen Bedingungen können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen und deshalb sind zusätzliche Prüfbedingungen erforderlich.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren (Phase 2, Stufe 1) und die Mindestanforderungen an die sporizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und in öffentlichen Einrichtungen fest, die mit Wasser standardisierter Härte eine homogene, physikalisch stabile Lösung ergeben. Ausgenommen davon sind Bereiche und Situationen mit medizinisch indizierter Desinfektion und Produkte, die auf lebenden Geweben benutzt werden, mit Ausnahme derjenigen für die Handhygiene in den oben angegebenen Bereichen.

Diese Europäische Norm gilt mindestens für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milchprodukte;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Erzeugnisse;
- Eier und Eiprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.;

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Früchte, Gemüse und daraus hergestellte Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- Tiernahrung;
- usw.;

b) öffentliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;
- Geschäfte;
- Sportstätten;

- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche von Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.;

c) andere industrielle Bereiche:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
- Pharmazeutika;
- Kosmetika und Toilettenartikel;
- Textilien;
- Luft- und Raumfahrtindustrie, Computerindustrie;
- usw.

Bei Anwendung dieser Europäischen Norm ist die Bestimmung der sporiziden Wirkung des unverdünnten Produktes nicht möglich, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe des Inokulums und der Belastungssubstanz auftritt. Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder darunter geprüft werden.

ANMERKUNG Das beschriebene Verfahren bestimmt die Wirksamkeit gewerblich hergestellter Rezepturen oder anderer Wirkstoffe auf Sporen unter Anwendungsbedingungen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885.

4 Anforderungen

Das Produkt muss bei einer nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 durchgeführten Prüfung eine dezimal-logarithmische (lg)-Reduktion um mindestens 3 Stufen aufweisen.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen für die Oberflächendesinfektion	
Mindestspektrum von Prüforganismen	<i>Bacillus subtilis</i>
zusätzliche sporizide Wirkung gegen Anaerobier bei spezifischen Anwendungen	<i>Clostridium sporogenes</i>
zusätzliche sporizide Wirkung gegen Aerobier bei spezifischen Anwendungen	<i>Bacillus cereus</i>
erforderliche Reduktion	≥ 3 lg
Prüftemperatur	entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen 4 °C und 75 °C
Einwirkzeit (in Minuten)	entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen 1 min und 60 min (in diesem Bereich sind nur Einwirkzeiten von 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min und 60 min zulässig)
Belastungssubstanz	niedrige Belastung: 0,3 g/l Rinderserumalbumin-Lösung oder hohe Belastung: 3,0 g/l Rinderserumalbumin-Lösung
zusätzliche Belastungssubstanzen für Molkereien	10,0 g/l rekonstituierte Milch

Andere zusätzliche Stämme und zusätzliche Prüfbedingungen dürfen entsprechend des Produktanspruches geprüft werden.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakteriensporen in einer Lösung einer Belastungssubstanz, die die niedrige und/oder hohe Belastung simuliert, wird zu einer vorbereiteten Probe des zu testenden Produkts gegeben, das in Wasser standardisierter Härte gelöst ist (in Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten). Das Gemisch wird für den spezifischen Prüfkontakt (Zeit ± 10) s auf der spezifischen Prüftemperatur ± 1 °C gehalten (geforderte Prüfbedingungen). Beträgt die Einwirkzeit 1 min, muss die zulässige Abweichung ± 5 s betragen.

Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen; die in dieser Probenmenge vorhandene sporizide Wirkung wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Vorzugsverfahren ist die Verdünnungs-Neutralisation. Sollte kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden, wird die Membranfiltration verwendet. Die Anzahl der überlebenden Bakteriensporen in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahlen wird berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die sporizide Wirkung muss mit Sporen des folgenden Bakterienstamms bewertet werden:

— *Bacillus subtilis* ATCC 6633¹⁾.

Falls für spezifische Anwendungen oder Produkte erforderlich, dürfen zusätzliche Stämme gewählt werden, zum Beispiel:

— *Bacillus cereus* CIP 105151;

— *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.3¹⁾.

ANMERKUNG 1 Bezüglich der entsprechenden Stammsammlungsnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang F.

ANMERKUNG 2 Bezüglich besonderer Kultur- und Handhabungsbedingungen für *Clostridium sporogenes* siehe Anhang C.

ANMERKUNG 3 Es ist bekannt, dass *Bacillus cereus*-Stämme aus verschiedenen Quellen unterschiedliches Sporulationsverhalten aufweisen können, insbesondere der Stamm CIP 105151 scheint besser zu sporulieren.

Wenn zusätzliche Stämme verwendet werden, müssen sie unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre) bebrütet und im Prüfbericht vermerkt werden.

Wenn die ausgewählten zusätzlichen Stämme nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wenn diese geprüften zusätzlichen Stämme nicht durch ein Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifikationsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie 5 Jahre von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung als Referenzprobe aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frei von toxischen oder für Bakteriensporen oder für Bakterien hemmenden Substanzen sein. Es muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.2.1). Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird. Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen verwendet werden.

Zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.6.

1) ATCC 6633 und ATCC 19404 sind die Sammelnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collection vertrieben werden. CIP 79.3 ist die Sammelnummer von Sporen, die von der Collection de l'Institut Pasteur vertrieben werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Stämme anderer Kultursammlungen dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Für das Auszählen von lebensfähigen *Bacillus*-Sporen:

Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.2.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,2 \pm 0,2$, gemessen bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, betragen.

5.2.2.4 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach dem im Anhang D beschriebenen Verfahren validiert werden. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

ANMERKUNG In Anhang D sind Angaben zu Neutralisationsmedien aufgeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.5 Spülflüssigkeit (für Membranfiltration)

Die Flüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran verträglich und für die Filtration durch die Filtermembran unter den in Anhang B beschriebenen Prüfbedingungen geeignet sein.

ANMERKUNG In Anhang D sind Angaben zu Spülflüssigkeiten aufgeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist im Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (nach 5.3.2.15) für höchstens vier Wochen aufzubewahren;
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung ist im Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (nach 5.3.2.15) für höchstens eine Woche aufzubewahren;
- in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchgemischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1)\text{ °C}$ (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verbraucht werden.

ANMERKUNG Bei der Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 375 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.7 Belastungssubstanz

5.2.2.7.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

5.2.2.7.2 Niedrige Belastung

Rinderserumalbumin-Lösung für die Prüfbedingungen muss wie folgt hergestellt werden:

- 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst;
- Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5.2) beträgt 0,3 g/l.

5.2.2.7.3 Hohe Belastung

3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins muss im Prüfverfahren (5.5.2) 3,0 g/l betragen.

5.2.2.7.4 Zusätzliche Belastungssubstanzen für Molkereien

Magermilch, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen sowie im Verhältnis von 100 g Pulver je Liter Wasser (5.2.2.2) rekonstituiert, muss wie folgt hergestellt werden:

- Es wird eine Lösung von 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Diese wird für 30 min bei $105\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (oder 5 min auf $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch im Prüfverfahren [5.5.1, c)] beträgt 10,0 g/l.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter Geräte werden alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert:

- a) in einem Autoklaven (siehe 5.3.2.1);
- b) in einem Heißluft-Sterilisator (siehe 5.3.2.1).

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laboratoriumsausrüstung²⁾ und im Besonderen die folgenden Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

- a) zur Sterilisation durch Dampf ein Autoklav, der für eine Haltezeit von mindestens 15 min auf einer Temperatur von (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Haltezeit von mindestens 30 min auf 180 °C, für eine Haltezeit von mindestens 1 h auf 170 °C oder für eine Haltezeit von mindestens 2 h auf 160 °C gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $75\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und auf Prüftemperaturen $\pm 1\text{ °C}$ (siehe 5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20 °C oder gleichwertig.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schüttelmischer (elektromechanisches Rührgerät, d. h. Vortex®-Mischer³⁾)

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät (bei Verwendung dieses Verfahrens) aus einem Material, das mit dem zu prüfenden Produkt verträglich ist, mit einem Filterhalter, der ein Nutzvolumen von mindestens 50 ml haben muss und der für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und mit einer Porenweite von 0,45 µm geeignet ist.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine gleichmäßige Filtrationsdurchflussrate gewährleisten. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen über die Membran zu erreichen und um einen zu lange andauernden Filtrationsvorgang zu vermeiden, muss das Gerät so eingestellt sein, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

5.3.2.8 Behältnisse: Reagenzgläser oder Glaskolben mit geeignetem Nennvolumen.

5.3.2.9 Graduierte Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser: 3 mm bis 4 mm).

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Roux-Flaschen aus Glas mit geradem Hals.

5.3.2.14 Mikroskop, vorzugsweise ein Phasenkontrastgerät mit einem Vergrößerungsfaktor von mindestens $\times 400$.

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

3) Ein Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.