

DIN EN ISO 23691



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2024-10-23

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Bestimmung und Verwendung von Kardinalwerten
(ISO/DIS 23691:2024);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 23691:2024**

Microbiology of the food chain –
Determination and use of cardinal values (ISO/DIS 23691:2024);
German and English version prEN ISO 23691:2024

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Détermination et utilisation des valeurs cardinales (ISO/DIS 23691:2024);
Version allemande et anglaise prEN ISO 23691:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-08-23 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 111 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Das Dokument prEN ISO 23691:2024 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218:2024-XX
ISO 16140-1:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 16140-2:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-2:2016-11
ISO 16140-3:2021	siehe	DIN EN ISO 16140-3:2021-06
ISO 16140-4:2020	siehe	DIN EN ISO 16140-4:2020-12
ISO 16140-5:2020	siehe	DIN EN ISO 16140-5:2020-12
ISO 16140-6:2019	siehe	DIN EN ISO 16140-6:2020-04
ISO 20976-1:2019	siehe	DIN EN ISO 20976-1:2019-09

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 7218:2024-XX, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2024)*; Deutsche Fassung EN ISO 7218:2024

DIN EN ISO 16140-1:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 1: Terminologie (ISO 16140-1:2016)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-1:2016

DIN EN ISO 16140-2:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016

DIN EN ISO 16140-3:2021-06, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor (ISO 16140-3:2021)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-3:2021

DIN EN ISO 16140-4:2020-12, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrenvalidierung (ISO 16140-4:2020)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-4:2020

DIN EN ISO 16140-5:2020-12, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 5: Arbeitsvorschrift für eine faktorielle Ringversuch-Verfahrenvalidierung nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren (ISO 16140-5:2020)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-5:2020

DIN EN ISO 16140-6:2020-04, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung (ISO 16140-6:2019)*; Deutsche Fassung EN ISO 16140-6:2019

DIN EN ISO 20976-1:2019-09, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Anforderungen und Leitfaden zur Durchführung von Challenge-Tests bei Lebensmitteln und Futtermitteln — Teil 1: Challenge-Tests zur Untersuchung von Wachstumspotenzial, Zeit der lag-Phase und maximaler Wachstumsrate (ISO 20976-1:2019)*; Deutsche Fassung EN ISO 20976-1:2019

– Leerseite –

September 2024

prEN ISO 23691

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Bestimmung und Verwendung von
Kardinalwerten (ISO/DIS 23691:2024)**

Microbiology of the food chain – Determination and use of cardinal values (ISO/DIS 23691:2024)

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Détermination et utilisation des valeurs cardinales
(ISO/DIS 23691:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	9
4 Kurzbeschreibung	13
4.1 Allgemeines	13
4.2 Mathematische Modelle	14
4.3 Prozess der Kardinalwert- und Lebensmittel-Korrekturwert-Bestimmung	17
4.4 Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate	17
4.4.1 Binäres Verdünnungsverfahren auf OD-Basis	18
4.4.2 Direktes Ausstrichverfahren	19
4.5 Kardinalparameterbestimmung	20
4.6 Korrekturfaktorbestimmung	20
4.7 Validierung	21
4.8 Verwenden von Kardinalwerten und Lebensmittel-Korrekturfaktor in Vorhersagen	22
5 Verdünnungsmittel, Nährmedien und Reagenzien	23
6 Laborausrüstung und Geräte	23
7 Versuchsanordnung und Datenerhebung	24
7.1 Allgemeines	24
7.2 Herstellung von Kultur und Medium	24
7.2.1 Wahl und Lagerung des untersuchten Stamms	24
7.2.2 Herstellung und Beimpfung der mikrobiellen Kultur	24
7.2.3 Herstellung der modifizierten Nährbouillon	25
7.3 Niveaus nach Faktor zum Schätzen von Kardinalparametern	26
7.3.1 Allgemeines	26
7.3.2 Temperatur	26
7.3.3 pH	27
7.3.4 Wasseraktivität	28
7.3.5 Hemmverbindungen	29
7.4 Versuchsanordnung zum Schätzen der maximalen spezifischen Wachstumsrate mit dem binären Verdünnungsverfahren auf OD-Basis	30
7.5 Versuchsanordnung zum Schätzen der maximalen spezifischen Wachstumsrate mit dem direkten Ausstrichverfahren	31
7.6 Bestimmung des Lebensmittel-Korrekturfaktors auf der Grundlage eines Challenge-Tests	31
7.7 Validierung	32
8 Angeben der Ergebnisse: Schätzung der Wachstumsparameter	32
8.1 Allgemeines	32
8.2 Beurteilung der maximalen spezifischen Wachstumsrate bei jedem Niveau von intrinsischen oder extrinsischen Faktoren (erster Schritt)	33
8.2.1 Allgemeines	33
8.2.2 Beurteilung von maximalen spezifischen Wachstumsraten anhand von direkten Ausstrichdaten	33
8.2.3 Beurteilung von maximalen spezifischen Wachstumsraten durch das binäre Verdünnungsverfahren auf OD-Basis	33
8.3 Beurteilung von Kardinalwerten und der optimalen Wachstumsrate in Bouillon μ_{Broth} (zweiter Schritt)	33
8.4 Beurteilung von C_f (dritter Schritt)	34
8.5 Validierung (vierter Schritt)	35

9	Verwenden von Kardinalwerten zum Durchführen von Vorhersagen des mikrobiellen Wachstums	36
9.1	Allgemeines	36
9.2	Voraussetzungen für Wachstumsvorhersagen	36
9.3	Verwenden von Kardinalwerten zum Simulieren von Wachstum	37
9.3.1	Wachstumssimulation bei einer vorgegebenen statischen Temperatur	37
9.3.2	Wachstumsvorhersage mit einem dynamischen Zeit-Temperatur-Szenario	39
9.3.3	Wachstumssimulation in einem statischen Zustand von Temperatur, pH und a_w	39
10	Prüfbericht	41
11	Qualitätssicherung	42
Anhang A (informativ)	Richtliste von Werkzeugen für Primär- und Sekundäranpassungen und Simulationen	43
Anhang B (informativ)	Leitfaden zum Ermitteln von verschiedenen a_w -Werten beim Verwenden von verschiedenen Feuchthaltemitteln in Bouillon	48
Anhang C (informativ)	Wachstumsratenbestimmung	49
C.1	Beurteilung von maximalen spezifischen Wachstumsraten durch das binäre Verdünnungsverfahren auf OD-Basis	49
C.2	Beurteilung von maximalen spezifischen Wachstumsraten anhand von direkten Ausstrichdaten	50
Anhang D (informativ)	Plattenanordnung	53
Anhang E (informativ)	Beispiel für die Verwendung von Kardinalwerten für die Wachstumssimulation und deren Variation	54
Literaturhinweise		57

Bilder

Bild 1	— Mikrobielle Wachstumskinetik, die die Plattenzählungsergebnisse in In KBE/ml zur Zeit (h) darstellt und drei Hauptphasen zeigt: lag-Phase mit dem verknüpften Parameter λ , exponentielle Phase mit dem verknüpften Parameter maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max}	19
Bild 2	— Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für Temperatur in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die zehn Niveaus (L1 bis L10) ermittelt werden (2-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 und/oder L10 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (2-B)	27
Bild 3	— Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für pH in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die acht Niveaus (L1 bis L8) ermittelt werden (3-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 und/oder L8 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (3-B)	28
Bild 4	— Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für die Wasseraktivität in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die fünf Niveaus (L1 bis L5) ermittelt werden (4-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (4-B)	29
Bild 5	— Versuchsanordnung für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die sechs Niveaus (L1 bis L6) ermittelt werden (5-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L6 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (5-B)	30
Bild 6	— Darstellung einer Sekundärmodellanpassung mit dem nlsMicrobio-R-Paket	34
Bild 7	— Darstellung einer Wachstumssimulation (durchgezogene Linie) in einem Lebensmittelerzeugnis bei 9 °C	38
Bild 8	— Darstellung einer Wachstumssimulation (durchgezogene Linie) in einem Lebensmittelerzeugnis bei dynamischer Temperatur (7 °C von t = 0 h bis 192 h und bei 9 °C von t = 192 h bis 288 h, gestrichelte Linie)	39
Bild 9	— Darstellung einer Wachstumsvorhersage (durchgezogene Linie) in einem Lebensmittelerzeugnis bei 8 °C pH = 5,30 und a_w = 0,974	41

Bild C.1.1 — Darstellung von aufeinander folgenden Verdünnungskinetiken, ermittelt mit dem binären Verdünnungsverfahren auf OD-Basis, Datensatz abgeleitet von (Membré et al. 2002) [14]: Schwellenwert auf 0,35 festgelegt. tD1 auf 12,25 h geschätzt.	49
Bild C.1.2 — Lineare Regression an den Daten (ln der Verdünnungen zu den Erfassungszeiten (h)) zum Ableiten der Steigung zur Darstellung der maximalen spezifischen Wachstumsrate ($\mu_{\max}$, h ⁻¹)	50
Bild C.2.1 — Beispiel für das Anpassen von Plattenzählungs-Wachstumsdaten unter Verwendung von DMFit [32] (A) und Sym'Previus [31] (B) und GrowthPredictor [29] (C)	51
Bild E.1 — Verteilung der Temperatur (links), einer Normalverteilung $N(m = 7, s = 0,5)$ folgend, und die resultierende Verteilung der maximalen spezifischen Wachstumsraten (rechts)	55
Bild E.2 — Darstellung einer Wachstumssimulation in einem Lebensmittelerzeugnis, wenn der extrinsische Faktor Lagertemperatur statisch ist, aber eine gewisse Variabilität von Produkt zu Produkt aufweist. Die durchgezogene Linie stellt das Quantil von 0,5 der Verteilung der Population des untersuchten Mikroorganismus in Abhängigkeit von der Zeit dar und die gestrichelten Linien zeigen die Quantilen von 0,025 und 0,975 dieser Verteilung	56

Tabellen

Tabelle 1 — Parameterschätzung mit R	34
Tabelle A.1 — Richtliste von Werkzeugen für Primär- und Sekundäranpassungen und Simulationen und Hauptfunktionalitäten	44
Tabelle B.1 — Vorhergesagte aw-Werte für Glycerin, Glucose und Saccharose, hinzugefügt in reinem Wasser bei 25 °C	48
Tabelle C.2.1 — Mit DMFit, [32] Sym'Previus [31] und GrowthPredictor [29] ermittelte Ergebnisse beim Anpassen von Versuchsdaten von Bild C.2.1	51
Tabelle D.1 — Beispielhafte Plattenanordnung für acht Niveaus und acht aufeinander folgende zweifache Verdünnungen; C = Kontrolle: mit nicht beimpftem Medium gefülltes Well . . .	53

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 23691:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 23691:2024 wurde von CEN als prEN ISO 23691:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, erarbeitet.

Einleitung

Unter den allgemeinen Grundsätzen des Codex Alimentarius zur Lebensmittelhygiene obliegt es den Lebensmittelunternehmern (FBO; en: food business operators), mikrobiologische Gefahren in Lebensmitteln zu kontrollieren und mikrobielle Risiken zu steuern. Daher müssen die Lebensmittelunternehmer innerhalb des HACCP-Konzeptes (en: hazard analysis and critical control point) validierte Maßnahmen zur Beherrschung einsetzen und Untersuchungen durchführen, um die Einhaltung der Kriterien für Lebensmittelsicherheit in der gesamten Lebensmittelkette zu prüfen.

Im Rahmen der mikrobiellen Risikobewertung (MRA; en: microbial risk assessment) wurden mehrere komplementäre Ansätze entwickelt, um die Risiken durch pathogene oder Verderb fördernde Mikroorganismen in der Lebensmittelkette abzuschätzen. Die MRA wird von den Aufsichtsbehörden unter der Federführung der internationalen Agentur für die Erstellung von Lebensmittelstandards angenommen. Die prädiktive Mikrobiologie ist einer der anerkannten wissenschaftlichen Ansätze, die zur Validierung von Maßnahmen zur Beherrschung innerhalb des HACCP-Systems sowie zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit und Qualität von Lebensmitteln, von Prozessen der Lebensmittelproduktion, von Bedingungen der Lagerung von Lebensmitteln und von Empfehlungen für die Zubereitung von für Konsumenten bestimmten Lebensmitteln genutzt werden.

Dieses Dokument enthält daher die technischen Regeln, Verfahren und Berechnungen für die Schätzung der Kardinalwerte eines maßgeblichen Mikroorganismus und deren Verwendung in Kombination mit Challenge-Tests zum Simulieren und Vorhersagen seines Wachstums in den Ausgangsstoffen, Zwischen- oder Endprodukten unter angemessen vorhersehbaren Bedingungen für Lebensmittelprozesse, Lagerung und Verbrauch.

Hierzu wurden verschiedene Abschnitte erstellt:

- zum Identifizieren des Umweltfaktors/der Umweltfaktoren (z. B. Temperatur, pH, a_w , organische Säuren),
- zum Definieren der entsprechenden Versuchsanordnung,
- zum Schätzen der Kardinalwerte eines Mikroorganismus in Bouillon-Medium,
- zum Durchführen eines Challenge-Tests in der interessierenden Matrix und Ableiten des Lebensmittel-Korrekturfaktors und der maximalen mikrobiellen Populationsdichte,
- zum Verwenden der Kardinalwerte und des Lebensmittel-Korrekturfaktors zum Vorhersagen des Wachstums des untersuchten Mikroorganismus in verschiedenen interessierenden Zuständen (z. B. Änderungen der Zeit und Temperatur während der Kühlkette, Änderungen der Formulierung mit der Zugabe von organischen Säuren oder Konservierungsmitteln).

Regulierungsbehörden können spezifische Empfehlungen aussprechen und diese Unterschiede wurden so weit wie möglich in diesem Dokument berücksichtigt. Es könnte jedoch erforderlich werden, dass zusätzliche Anforderungen integriert werden müssen, um eine behördliche Anerkennung der Untersuchung zu erhalten.

Die Verwendung von ISO 23691 erfordert Fachwissen in maßgeblichen Bereichen wie Lebensmittel-Mikrobiologie, prädiktiver Mikrobiologie und Statistik. Dieses Fachwissen umfasst ein Verständnis der Theorie der Probenahme, des Versuchsaufbaus, der statistischen Analyse mikrobiologischer Daten sowie einen Überblick über wissenschaftlich anerkannte und verfügbare mathematische Konzepte, die in der prädiktiven Mikrobiologie verwendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Grundsätze, Anforderungen und Verfahren fest, um die Kardinalwerte von Bakterien und Hefestämmen zu bestimmen und diese zum Vorhersagen von mikrobiellem Wachstum zu verwenden.

Vier Hauptschritte sind erforderlich: (1) Bestimmung der Kardinalwerte im Nährmedium, (2) Bestimmung des Korrekturfaktors im Ziellebensmittel, (3) Validierung des Modells und (4) Simulationen.

Vier Umweltfaktoren werden berücksichtigt: Temperatur, pH, a_w und Hemmstoffe (z. B. organische Säuren).

ANMERKUNG Mikrobielle Konkurrenz ist nicht als ein Hemmstoff in dieser Norm berücksichtigt und kann durch geeignete Modellierungsansätze behandelt werden.

Die Bestimmung von Kardinalwerten erfordert einen Ansatz mit zwei Schritten:

- die Bestimmung von maximalen spezifischen Wachstumsraten des untersuchten in Bouillon kultivierten Stamms in einem definierten Bereich von Werten des/der untersuchten Umweltfaktors/-faktoren und
- die Verwendung von anerkannten Sekundärmodellen der prädiktiven Mikrobiologie zum Anpassen der erhaltenen Versuchsdaten für das Erhalten der Kardinalwerte.

Die Verwendung von Kardinalwerten in der Simulation von mikrobiellem Wachstum beruht auf Primär- und Sekundärmodellen der prädiktiven Mikrobiologie. Die Kardinalwerte werden mit Challenge-Test-Daten kombiniert, um die Matrixauswirkung zu berücksichtigen. Abhängig vom Ziel der Wachstumssimulation ist es entscheidend, die Variation von Kardinalwerten zwischen Stämmen innerhalb einer Bakterien- oder Hefeart einzubeziehen.

Kardinalwerte stellen einen guten Indikator für die Wachstumsfähigkeit eines Stamms bei den untersuchten Umweltfaktoren dar. Sie werden daher als Kriterien für die Auswahl von Stämmen zusätzlich zu ihrem Ursprung und ihrer Virulenz beim Durchführen von Wachstums-Challenge-Tests (Norm ISO 20976-1) oder in der Methodenvalidierung (ISO 16140-Normenreihe) verwendet.

ANMERKUNG Dieses Dokument konzentriert sich auf die Bestimmung von Kardinalwerten für einen Stamm. Die gleiche Methodik kann zum unabhängigen Charakterisieren von mehreren Stämmen verwendet werden, um die biologische Variabilität von Stämmen abzudecken und diese Ergebnisse in den Vorhersagen einzubeziehen.

WARNUNG — Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen mit der Erfassung des/der Zielmikroorganismus/-organismen nur in Laboratorien mit geeigneter Ausstattung und unter der Leitung eines qualifizierten Mikrobiologen erfolgen und dass bei der Entsorgung allen inkubierten Materials mit äußerster Vorsicht vorgegangen wird. Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, auf alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsaspekte einzugehen. Es obliegt der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 20976-1:2019, *Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate*

ISO 18787:2017, *Foodstuffs — Determination of water activity*

ISO 16140-2:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*

ISO 5127:2017, *Information and documentation — Foundation and vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

binäre Verdünnung

Verfahren, das verwendet wird, um eine mikrobielle Suspension schrittweise mit einem konstanten Verdünnungsfaktor von 2 in jedem Schritt zu verdünnen

3.2

biologische unabhängige Wiederholung

bezieht sich auf einen Versuch, der unter Verwendung einer neu zubereiteten Kultur und eines neu zubereiteten Mediums durchgeführt wurde

3.3

Kardinalfaktor

extrinsische (Temperatur) und intrinsische Merkmale (pH, a_w , Hemmstoffe), für die Kardinalwerte abgeleitet werden

3.4

Kardinalparameter

Kardinalwert

geschätzte minimale, optimale oder maximale Werte von extrinsischen und intrinsischen Faktoren (z. B. Temperatur, pH, a_w , Hemmstoffe), die das Wachstum eines bestimmten Bakterienstamms charakterisieren

3.5

Challenge-Test

Studie über das Wachstum (oder die Inaktivierung) einer artifiziell in ein Lebensmittel eingebrachten Bakterienpopulation

3.6

Variationskoeffizient

CV, en: coefficient of variation

Verhältnis der Standardabweichung zum Mittel

3.7

Korrekturfaktor

dimensionsloser Wert, der verwendet wird, um die optimalen Wachstumsraten von Bouillon und Lebensmittel zu verknüpfen. Dabei handelt es sich um das Verhältnis der in der untersuchten Matrix geschätzten optimalen Wachstumsrate (μ_{Food}) zum in Bouillon geschätzten optimalen Wachstumsraten-Wert (μ_{Broth})

3.8

Erfassungszeit (td)

Zeit, in der die optische Dichte (OD) das vordefinierte Ziel während des exponentiellen Wachstums erreicht

3.9

exponentielle Wachstumsphase

Phase, in der die Multiplikation der mikrobiellen Population am schnellsten verläuft. In dieser Phase wird die maximale spezifische Wachstumsrate erreicht

3.10

extrinsischer Faktor

Faktor in der umgebenden Umwelt des Lebensmittels oder der Bouillon, etwa Temperatur oder gasförmige Zusammensetzung der Verpackung, der die Wachstumskinetik des Mikroorganismus beeinflusst

3.11

Gamma-Konzept

γ

legt fest, dass intrinsische (z. B. pH, Wasseraktivität, Hemmstoffe) und extrinsische Faktoren (z. B. Temperatur, gasförmige Zusammensetzung der Verpackung) die maximale spezifische Wachstumsrate unabhängig unter Verwendung von linearen und/oder nicht linearen Funktionen, z. B. $\gamma(\text{Temperatur})$, $\gamma(\text{pH})$, $\gamma(\text{Wasseraktivität})$, $\gamma(\text{Hemmstoffe})$, normalisiert zwischen Null (kein Wachstum) und Eins (optimale Bedingungen für Wachstum), beeinflussen; in Kombination ist der Effekt der Faktoren multiplikativ

3.12

Gamma-Funktion

$\gamma(X)$

nicht lineare, dimensionslose Funktion, normalisiert zwischen Null (kein Wachstum) und Eins (optimale Bedingungen für Wachstum) zum Beschreiben des relativen Effekts eines untersuchten Faktors (X) auf die maximale spezifische Wachstumsrate (z. B. $\gamma(\text{Temperatur})$, $\gamma(\text{pH})$, $\gamma(\text{Wasseraktivität})$, $\gamma(\text{Hemmstoffe})$)

3.13

Wachstumskurve

graphische Darstellung der zunehmenden Zahl von lebenden Zellen einer mikrobiellen Population unter einer bestimmten intrinsischen und extrinsischen Bedingung über eine Zeitspanne

3.14

Inokulum

mikrobielle Suspension, die verwendet wird, um das untersuchte Lebensmittel oder die untersuchte Bouillon in einer gewünschten Konzentration zu verunreinigen

3.15

intrinsischer Faktor

Faktor, der mit der Lebensmittelmatrix oder der Bouillon selbst verbunden ist, etwa Nährstoffe, Wasseraktivität, organische Säuren oder pH, und der die Wachstumskinetik des Mikroorganismus beeinflusst

3.16

lag-Phase

Phase unmittelbar nach der Beimpfung, während der sich die mikrobielle Population an die Umweltbedingungen anpasst, bevor sie in die *exponentielle Wachstumsphase* (3.9) eintreten

3.17

Zeit der lag-Phase

λ

kinetischer Parameter in der Zeiteinheit zur Charakterisierung der Dauer der *lag-Phase* (3.16)

3.18

maximale spezifische Wachstumsrate

$\mu_{\max}$

kinetischer Parameter (h^{-1}) zur Kennzeichnung der *exponentiellen Wachstumsphase* (3.9), dargestellt als Steigung der Kurve, mit der die Entwicklung des natürlichen Logarithmus der Population als Funktion der Zeit unter konstanten Wachstumsbedingungen angezeigt wird; wenn die maximale spezifische Wachstumsrate in Lebensmittel geschätzt wird, wird dies als $\mu_{\max, \text{food}}$ bezeichnet

3.19

minimale Hemmkonzentration

MIC, en: minimal inhibitory concentration

geschätzter Parameter zur Darstellung der niedrigsten Konzentration eines Hemmstoffs, der einen Wert der maximalen spezifischen Wachstumsrate von Null ergibt

3.20

modifizierte Bouillon

Nährmedium mit einer spezifischen Zusammensetzung (z. B. erhöhter Salzgehalt) oder Charakteristik (z. B. pH) zum Untersuchen von intrinsischen Faktoren

3.21

Monte-Carlo-Simulation

iteratives Zufallsstichproben-Verfahren, das die Variabilität über Modellparameter propagiert, um die Verteilung von Eingangsvariablen zu nähern. Monte-Carlo-Simulationen kommen in der quantitativen Risikobeurteilung und Entscheidungsfindung in breitem Umfang zum Einsatz

3.22

optimale Wachstumsrate

$\dot{\mu}$

höchster Wert der maximalen spezifischen Wachstumsraten, geschätzt bei optimalen Bedingungen für das Wachstum des Mikroorganismus in einem untersuchten Lebensmittel oder einer untersuchten Bouillon

3.23

optimale Wachstumsrate in Bouillon

$\dot{\mu}_{\text{Broth}}$

höchster Wert der maximalen spezifischen Wachstumsraten in Bouillon, geschätzt bei optimalen Bedingungen für das Wachstum des Mikroorganismus

3.24

optimale Wachstumsrate im Lebensmittel

$\dot{\mu}_{\text{Food}}$

höchster Wert der maximalen spezifischen Wachstumsraten im Lebensmittel, geschätzt bei optimalen Bedingungen für das Wachstum des Mikroorganismus

Anmerkung 1 zum Begriff: $\dot{\mu}_{\text{Food}}$ ist ein statistischer Parameter und wird nicht im Lebensmittel gemessen.

Anmerkung 2 zum Begriff: $\dot{\mu}_{\text{Food}}$ ist ein mathematisches Ergebnis, das erhalten wird, wenn alle untersuchten Faktoren ihre optimalen Werte aufweisen und die jeweiligen γ -Terme gleich 1 sind.

3.25

organisierende Laboratorien

Laboratorien mit Verantwortung für das Bestimmen der *Kardinalwerte* (3.4) und Durchführen der Simulationen; Datensammlung und Datenanalyse (einschließlich Anpassung und Simulation) werden in einem einzelnen oder in mehreren Laboratorien durchgeführt

3.26

pH-Wert

Messung der Konzentration der Azidität oder Alkalinität eines Materials in einer wässrigen Lösung

[QUELLE: ISO 5127:2017, 3.12.2.29, modifiziert — Anmerkungen 1 und 2 zum Begriff wurden gelöscht.]

3.27

pKa

quantitatives Maß (negativer dekadischer Logarithmus) der Säurelösungskonstante oder des Ka-Werts, das die Stärke einer Säure in Lösung angibt (je niedriger der pKa-Wert, desto stärker die Säure)

3.28

Primärmodell

mathematisches Modell zur Beschreibung der Änderungen der mikrobiellen Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit unter konstanten und bekannten Bedingungen eines oder mehrerer intrinsischer und/oder extrinsischer Faktoren

3.29

relativer Standardfehler

r

Standardfehler (se) (3.31), geteilt durch die Parameterschätzung und angegeben als eine Prozentzahl

3.30

Sekundärmodell

mathematisches Modell zur Beschreibung der Auswirkungen des intrinsischen und/oder extrinsischen Faktors/der intrinsischen und/oder extrinsischen Faktoren (z. B. Temperatur, pH, a_w) auf die Parameter des *Primärmodells* (3.28) (z. B. maximale spezifische Wachstumsrate)

3.31

Standardfehler

se, en: standard error

Maß der Unsicherheit, das mit dem geschätzten Parameter oder der Gesamtmodellanpassung verknüpft ist

3.32

stationäre Phase

Phase, in der die mikrobielle Population nicht mehr zunimmt (ihre maximale Konzentration erreicht und bei dieser bleibt)

3.33

starke Säure

durch ihren negativen pKa-Wert gekennzeichnet, sie ionisiert vollständig in einer wässrigen Lösung durch Verlust von einem Proton; Salz- und Schwefelsäure sind Beispiele für starke Säuren

3.34

Unsicherheit

bezieht sich auf die Variation, die auf fehlendem oder unvollständigem Wissen über einige Merkmale eines Systems beruht; sie beruht auf der Parameterunsicherheit und Modellunsicherheit. Quellen für die Parameterunsicherheit sind u. a. fehlende Daten, Messfehler, Probenahmefehler und systematische Fehler; Quellen für die Modellunsicherheit sind u. a. Modellstruktur, ausgeschlossene Variablen, Modellauflösung und Extrapolation; der Standardfehler stellt die mit dem Parameter verknüpfte Unsicherheit dar

3.35

Variabilität

bezieht sich auf die Variation, die einem bestimmten System inhärent ist, typischerweise als ein Ergebnis der wahren Heterogenität der untersuchten Population, und die durch zusätzliche Messung nicht reduzierbar ist; drei Quellen für Variation werden unterschieden: Variabilität zwischen Stämmen (Variabilität zwischen Spezies), Variabilität innerhalb eines Stamms und analytische Variabilität; die Variabilität zwischen Stämmen ist in dieser Norm nicht enthalten, da sie nur für die Untersuchung von jeweils einem Stamm vorgesehen ist; die Standardabweichung stellt die biologische Variabilität innerhalb des Stamms dar, die mit dem Parameter verknüpft ist

3.36

Wasseraktivität

a_w

Verhältnis des Wasserdampfdrucks im Medium oder Lebensmittel zum Dampfdruck von reinem Wasser bei derselben Temperatur; sie stellt das für die Mikroorganismen zur Verwendung verfügbare Wasser dar

[QUELLE: ISO 18787:2017, 3.1, modifiziert — Die Definition wurde gekürzt und die Gleichung sowie die Anmerkungen 1 und 2 zum Begriff wurden gelöscht. Der Satz „Sie stellt das für die Mikroorganismen zur Verwendung verfügbare Wasser dar“ wurde hinzugefügt.]

3.37

schwache Säure

durch ihren hohen pKa-Wert gekennzeichnet; sie dissoziiert nicht vollständig in wässriger Lösung; Essig- und Citronensäure sind Beispiele für schwache Säuren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Die allgemeine Gleichung, die zur Beschreibung der Auswirkung von verschiedenen unabhängigen intrinsischen und extrinsischen Faktoren auf die maximale spezifische Wachstumsrate eines Mikroorganismus verwendet wird, beruht auf einem modularen Ansatz, der als „Gamma-Konzept“ [28] bezeichnet wird und in Gleichung (1) beschrieben ist.

$$\mu_{\max} = \dot{\mu} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(\text{pH}) \cdot \gamma(a_w) \cdot \gamma(\text{Hemmstoffe}) \quad (1)$$

Dabei ist

$\mu_{\max}$	die maximale spezifische Wachstumsrate (h^{-1}) des untersuchten Stamms in der Matrix;
$\dot{\mu}$	die optimale Wachstumsrate (h^{-1}) des untersuchten Stamms in der Matrix;
$\gamma(T)$	die dimensionslose Funktion zur Beschreibung der relativen Auswirkung der Temperatur auf das mikrobielle Wachstum;
$\gamma(\text{pH})$	die dimensionslose Funktion zur Beschreibung der relativen Auswirkung des pH-Werts auf das mikrobielle Wachstum;
$\gamma(a_w)$	die dimensionslose Funktion zur Beschreibung der relativen Auswirkung von a_w auf das mikrobielle Wachstum;
$\gamma(\text{Hemmstoffe})$	dimensionslose Funktionen zur Beschreibung der relativen Auswirkung von verschiedenen messbaren Hemmstoffen, etwa der undissoziierten Form der schwachen (organischen) Säuren (HA) oder CO_2 .

Die γ -Terme variieren alle zwischen 0 und 1, $\gamma = 0$ bei voller Hemmung des Wachstums durch den untersuchten Faktor und $\gamma = 1$ bei nicht vorhandener Hemmung des Wachstums durch den untersuchten Faktor.

Die Literatur enthält verschiedene Sekundärmodelle zum Beschreiben des mathematischen Ausdrucks der Gamma-Terme. In dieser Norm werden die Kardinalmodelle verwendet und in 4.2 dargestellt.

Für die angemessene Verwendung der Modelle und Interpretation von Daten ist Wissen über die Verwendung von Modellen der prädiktiven Mikrobiologie und Erfahrung mit dieser wesentlich.

4.2 Mathematische Modelle

Nach dem Gamma-Konzept weisen verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren (z. B. Temperatur, pH, Wasseraktivität, Hemmstoffe) separate und unabhängige Auswirkungen auf die maximale spezifische Wachstumsrate auf, was bedeutet, dass die mit einem Faktor verknüpften Kardinalwerte ebenfalls separat und unabhängig geschätzt werden.

In der Literatur wurden verschiedene mathematische Modelle entwickelt.

- Zur Beschreibung der Auswirkungen der Temperatur muss eines der zwei folgenden Modelle verwendet werden: das CTMI-(Cardinal-Temperature-Model-with-Inflection-)Modell [Gleichung (2)] muss verwendet werden, wenn optimale und superoptimale Temperaturen erforderlich sind [25], während das eingeschränkte (lineare) Ratkowsky-Modell [Gleichung (3)] [21] verwendet werden muss, wenn die Eingangstemperatur von der minimalen Temperatur zur Förderung des Wachstums bis zu einer Referenztemperatur, die unterhalb der optimalen Temperatur liegt, reicht.

$$\gamma(T) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } T \leq T_{min^C} \\ \frac{(T-T_{max})(T-T_{min^C})^2}{(T_{opt}-T_{min^C})((T_{opt}-T_{min^C})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min^C}-2T))}, & \text{wenn } T_{min^C} < T < T_{max} \\ 0, & \text{wenn } T \geq T_{max} \end{cases} \quad (2)$$

Dabei ist

T die Temperatur (°C);

T_{min^C} die geschätzte Mindesttemperatur für das Wachstum für den Kardinal-Gamma-Term;

T_{opt} die geschätzte optimale Temperatur für das Wachstum;

T_{max} die geschätzte Höchsttemperatur für das Wachstum.

$$\gamma(T) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } T < T_{min^R} \\ \left(\frac{T-T_{min^R}}{T_{ref}-T_{min^R}} \right)^2, & \text{wenn } T > T_{min^R} \end{cases} \quad (3)$$

Dabei ist

T die Temperatur (°C);

T_{min^R} die geschätzte Mindesttemperatur für das Wachstum für den eingeschränkten Ratkowsky-Gamma-Term;

T_{ref} die Referenztemperatur.

Wenn das eingeschränkte Ratkowsky-Modell für den Gamma-Term zum Beschreiben der Auswirkungen der Temperatur verwendet wird, ist es wesentlich, das Modell nicht außerhalb des Versuchsbereichs zu verwenden, für den es entwickelt wurde.

- Für die Beschreibung der Auswirkungen des pH-Werts muss eines der zwei folgenden Modelle verwendet werden: das Kardinalmodell [25], wenn die regelmäßige Deltaform beobachtet wird [Gleichung (4)], oder das Aryani-Modell [8], wenn ein Plateau rund um das Optimum beachtet wird, das ein Schätzen von pH_{max} unmöglich macht [Gleichung (5)].

$$\gamma(pH) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } pH \leq pH_{min} \\ \frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min}^C)}{(pH - pH_{min}^C)(pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2}, & \text{wenn } pH_{min} < pH < pH_{max} \\ 0, & \text{wenn } pH \geq pH_{max} \end{cases} \quad (4)$$

Dabei ist

pH das Wasserstoffpotential;

pH_{min}^C der geschätzte minimale pH-Wert für das Wachstum für den Kardinal-Gamma-Term;

pH_{opt} der geschätzte optimale pH-Wert für das Wachstum;

pH_{max} der geschätzte maximale pH-Wert für das Wachstum.

$$\gamma(pH) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } pH \leq pH_{min}^A \\ \left(\frac{(pH - pH_{min}^A)}{1 - 2 \frac{(pH_{min}^A - pH_{1/2})}{(pH_{ref} - pH_{min}^A)}} \right), & \text{wenn } pH > pH_{min}^A \end{cases} \quad (5)$$

Dabei ist

pH das Wasserstoffpotential;

pH_{min}^A der geschätzte minimale pH-Wert für das Wachstum für den Aryani-Gamma-Term;

$pH_{1/2}$ der pH-Wert, bei dem die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} die Hälfte von μ ;

pH_{ref} der Referenz-pH-Wert.

- Für die Beschreibung der Auswirkungen von a_w müssen Modelle basierend auf einer linearen [Gleichung (6)] oder nicht linearen Beziehung, etwa das Kardinal- a_w -Modell [26], dargestellt in Gleichung (7), verwendet werden:

$$\gamma(a_w) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } a_w \leq a_{w_{min}^L} \\ \frac{a_w - a_{w_{min}^L}}{1 - a_{w_{min}^L}}, & \text{wenn } a_w > a_{w_{min}^L} \end{cases} \quad (6)$$

Dabei ist

a_w die Wasseraktivität;

$a_{w_{min}^L}$ die geschätzte minimale Wasseraktivität für das Wachstum für den linearen Gamma-Term.

Wenn eine lineare Beziehung zur Beschreibung der Auswirkungen von a_w verwendet wird, ist es wesentlich, das Modell nicht außerhalb des Versuchsbereichs zu verwenden, für den es entwickelt wurde; (wenn z. B. Versuche bis 0,996 durchgeführt wurden, kann nicht bei 0,998 extrapoliert werden).

$$\gamma(a_w) = \begin{cases} 0, & \text{wenn } a_w \leq a_{w_{\min}} \\ \frac{(a_w - a_{w_{\max}})(a_w - a_{w_{\min}^C})^n}{(a_{w_{\text{opt}}} - a_{w_{\min}^C})^{n-1} \left((a_{w_{\text{opt}}} - a_{w_{\min}^C})(a_w - a_{w_{\text{opt}}}) - (a_{w_{\text{opt}}} - a_{w_{\max}})(a_{w_{\text{opt}}} + a_{w_{\min}^C} - n \cdot a_w) \right)}, & \text{wenn } a_{w_{\min}} < a_w < a_{w_{\max}} \\ 0, & \text{wenn } a_w \geq a_{w_{\max}} \end{cases} \quad (7)$$

Dabei ist

a_w die Wasseraktivität;

n ein Formparameter;

$a_{w_{\min}^C}$ der geschätzte minimale a_w -Wert für das Wachstum für den Kardinal-Gamma-Term;

$a_{w_{\text{opt}}}$ der geschätzte optimale a_w -Wert für das Wachstum;

$a_{w_{\max}}$ der geschätzte maximale a_w -Wert für das Wachstum.

ANMERKUNG Meistens gilt $n = 1$ und $a_{w_{\max}}$ wird mit 1,0 angenommen.

- Für die Beschreibung der Auswirkungen von Konzentrationen von Hemmstoffen einschließlich undissoziierter organischer Säuren, CO₂ und anderen, muss die folgende Gleichung verwendet werden:

$$\gamma(\text{Inhibitors}) = \begin{cases} 1 - \left(\frac{[\text{Inhibitors}]}{MIC} \right)^\alpha, & \text{wenn } [\text{Inhibitors}] < MIC \\ 0, & \text{wenn } [\text{Inhibitors}] \geq MIC \end{cases} \quad (8)$$

Dabei ist

$[\text{Inhibitor}]$ die Konzentration des Hemmstoffs (z. B. undissoziierte organische Säure (mM), CO₂ (%));

MIC die minimale Hemmkonzentration;

$\alpha =$ der Formparameter der Kurve, wobei bei:

- $\alpha = 1$ die Form linear ist;
- $\alpha > 1$ die Form nach unten zeigt;
- $\alpha < 1$ die Form nach oben zeigt.

ANMERKUNG Wenn mehrere Hemmstoffe in Kombination einwirken, werden mehrere Gamma-Terme verwendet.

4.3 Prozess der Kardinalwert- und Lebensmittel-Korrekturwert-Bestimmung

Die Kardinalwerte sind geschätzte Parameter, die mit den gewählten Gamma-Termen verknüpft sind. Zum Beispiel lauten die Kardinalwerte für die Temperatur $T_{\min}^C$, T_{opt} , $T_{\max}$ und ermöglichen die Berechnung der relativen Auswirkung der Temperatur durch $\gamma(\tau)$.

Es wird angenommen, dass die Kardinalwerte spezifische Merkmale des untersuchten mikrobiellen Stamms darstellen, die unabhängig von der Umwelt sind, in denen das Wachstum stattfindet. Sie werden daher meist in Bouillon untersucht, um die Versuche zu vereinfachen und zu automatisieren, die erforderlich sind, um diese zu bestimmen. Die Auswirkung des Mediums wird durch den Parameter μ ersichtlich [siehe Gleichung (1)]. Wenn das Medium ein Lebensmittelerzeugnis ist, wird μ als μ_{Food} identifiziert, und wenn das Medium Bouillon ist, wird μ als μ_{Broth} identifiziert. Der Lebensmittel-Korrekturfaktor verknüpft diese zwei Parameter (siehe 4.6).

Die Kardinalwerte und der Lebensmittel-Korrekturfaktor werden als Wachstumsparameter bezeichnet. Deren Bestimmung erfordert drei Schritte.

Die Bestimmung der Kardinalwerte ist ein Verfahren mit zwei Schritten, das einzeln für jeden untersuchten Faktor angewendet wird. Zunächst werden die maximalen spezifischen Wachstumsraten des Mikroorganismus in Bouillon für verschiedene Niveaus des untersuchten Faktors beurteilt. Anschließend wird ein Sekundärmodell (4.2) verwendet, um die beobachteten maximalen spezifischen Wachstumsraten an die verschiedenen Niveaus des untersuchten Faktors für die Beurteilung der Kardinalwerte anzupassen. Der dritte Schritt besteht in der Bestimmung des Lebensmittel-Korrekturfaktors.

Nach Bestimmung und Validierung werden die Kardinalwerte und der Lebensmittel-Korrekturfaktor zum Vorhersagen des Verhaltens des untersuchten Organismus unter neuen Bedingungen verwendet.

4.4 Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate

Die zur Beurteilung von Kardinalwerten verwendeten maximalen spezifischen Wachstumsraten werden in Bouillon ermittelt. Die Wahl der entsprechenden Bouillon muss auf der Grundlage von Literatur oder Voruntersuchungen begründet sein, da diese eine Auswirkung auf die Bestimmung der Kardinalwerte haben kann. [16]

E DIN EN ISO 23691:2024-09
prEN ISO 23691:2024 (D)

Die maximale spezifische Wachstumsrate wird für verschiedene Niveaus von jedem untersuchten Faktor in Bouillon, angepasst an die Prüfbedingungen (modifizierte Bouillon), durch Verwenden von einem der folgenden Verfahren bestimmt:

1. Binäres Verdünnungsverfahren auf OD-Basis, durchgeführt durch Anpassen einer linearen Regression, die am natürlichen Logarithmus des Verdünnungsfaktors als Funktion von t_d , der Zeit bis Erreichen einer Ziel-OD-Schwelle, durchgeführt wird.
2. Direktes Ausstrichverfahren, durchgeführt durch Anpassen eines anerkannten Primärmodells an die Wachstumskinetikdaten des untersuchten Stamms unter bestimmten Umweltbedingungen.

Üblicherweise kommen bevorzugt automatisierte Messungen der optischen Dichte (OD) mit einer Ausrüstung mit hohem Durchsatz zum Einsatz, um die Datenerfassung zu beschleunigen. Wenn eine automatisierte Ausrüstung nicht zur Verfügung steht, muss die maximale spezifische Wachstumsrate durch das direkte Ausstrichverfahren berechnet werden.

Wenn indirekte Verfahren nicht verwendet werden können (z. B. zur Bestimmung von maximalen spezifischen Wachstumsraten unter extremen Bedingungen an den Wachstumsgrenzen), muss ein direktes Ausstreichen verwendet werden.

4.4.1 Binäres Verdünnungsverfahren auf OD-Basis

Die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ (h^{-1}) ist wie folgt definiert:

$$\mu_{\max} = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt} \quad (9)$$

Dabei ist N die Anzahl von Mikroorganismen zu einem bestimmten Zeitpunkt t (h).

Während der exponentiellen Wachstumsphase ist $\mu_{\max}$ konstant und die Gleichung (9) kann wie folgt integriert werden:

$$\ln(N_t/N_0) = \mu_{\max} \cdot (t - \lambda) \quad (10)$$

Dabei ist N_0 die Anzahl von Mikroorganismen bei $t = 0$ und λ (h) die Zeit der lag-Phase.

Somit kann für die folgende binäre Verdünnungskinetik mit der gleichen Kultur, für die die lag-Zeit als konstant angenommen werden könnte, die Gleichung (10) wie in Gleichung (11) und Gleichung (12) angegeben modifiziert werden.

$$\begin{cases} \ln(N_d/N_{01}) = \mu_{\max} \cdot (t_{d1} - \lambda) \\ \ln(N_d/N_{0k}) = \mu_{\max} \cdot (t_{dk} - \lambda) \end{cases} \quad (11)$$

$$\ln(N_{01}/N_{0k}) = \mu_{\max} \cdot (t_{dk} - t_{d1}) \quad (12)$$

Dabei ist

N_{01}/N_{0k} das binäre Verdünnungsverhältnis (1, 2, 4, 8 ...), bezeichnet als D ;

t_{d1} und t_{dk} die Erfassungszeiten für die Verdünnungen 1 und k .

Wenn das Wachstum durch Messen der Änderungen in Messungen der optischen Dichte (OD) im Laufe der Zeit überwacht wird, wird eine Schwellenwert-OD definiert, und die Erfassungszeit t_d kann für mehrere binäre Verdünnungen des gleichen Inokulums beurteilt werden. Somit entspricht beim Auftragen von $\ln(D)$ gegen die Erfassungszeiten t_d die maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{\max}$ der Steigung und wird durch lineare Regression unter Verwendung des von Cuppers und Smelt (1993) vorgeschlagenen Verfahrens [12], weiter dargestellt durch Membré et al. (2002) [14], ermittelt.

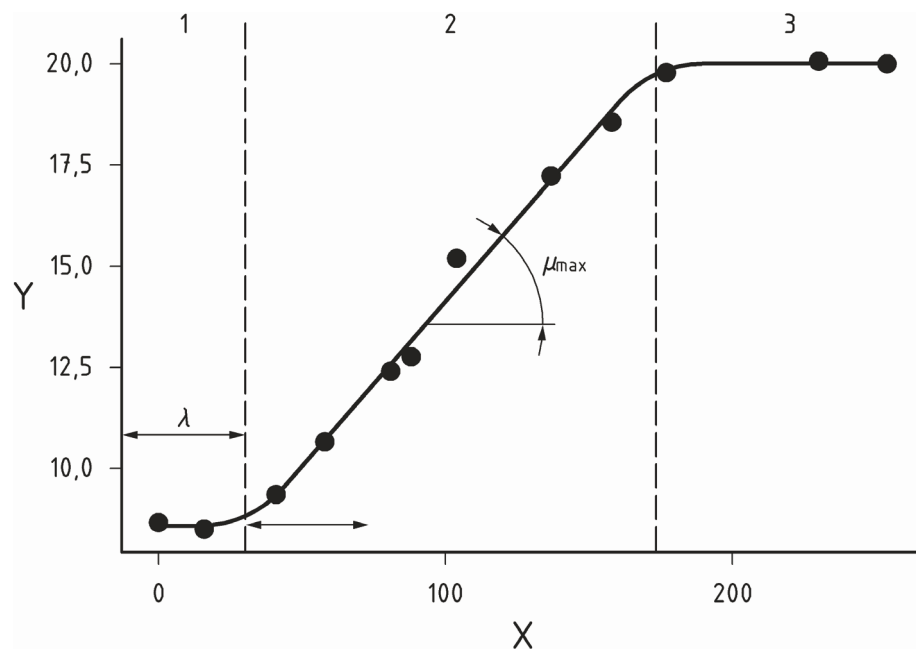
Der mit der maximalen spezifischen Wachstumsrate verknüpfte relative Standardfehler darf 10 % nicht überschreiten.

Wenn maximale spezifische Wachstumsraten für verschiedene Wiederholungen durch das binäre Verdünnungsverfahren auf OD-Basis ermittelt werden, muss der Variationskoeffizient CV (CV = Standardabweichung/Mittelwert) kleiner als 15 % sein.

4.4.2 Direktes Ausstrichverfahren

Die Bouillon wird an die Prüfbedingungen angepasst, mit dem untersuchten Mikroorganismus beimpft und anschließend werden zu geeigneten Zeiten Proben entnommen, um eine vollständige Wachstumskurve zu erzeugen. Die maximale spezifische Wachstumsrate wird anhand der vollständigen Menge von experimentellen Datenpunkten der Wachstumskurve (Bild 1) (mindestens acht experimentelle Datenpunkte, verteilt entlang der drei Phasen der Wachstumskurve mit mindestens fünf Punkten in der exponentiellen Phase) für die untersuchte Bedingung durch Anpassen eines anerkannten Primärmodells [15] geschätzt.

Eine experimentelle Wachstumskurve kann eine lag-Phase vor der exponentiellen Wachstumsphase umfassen oder nicht. Modelle, die eine lag-Phase erzwingen, müssen vermieden werden, wenn die experimentell bestimmte Kurve keine lag-Phase darstellt.



Legende

X Zeit (h)

Y ln KBE/ml

Bild 1 — Mikrobielle Wachstumskinetik, die die Plattenzählungsergebnisse in ln KBE/ml zur Zeit (h) darstellt und drei Hauptphasen zeigt: lag-Phase mit dem verknüpften Parameter λ , exponentielle Phase mit dem verknüpften Parameter maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max}

Es können adäquate Werkzeuge verwendet werden, um die Plattenzählungsdaten anzupassen (siehe Anhang A) und die maximale spezifische Wachstumsrate zu ermitteln. Der relative Standardfehler r darf 10 % nicht überschreiten. Wenn der berechnete Standardfehler nicht zufriedenstellend ist, muss eine Ursachenanalyse durchgeführt werden und bei Bedarf muss ein neuer Challenge-Test durchgeführt werden.

Wenn maximale spezifische Wachstumsraten für verschiedene Wiederholungen durch das direkte Ausstrichverfahren ermittelt werden, muss der Variationskoeffizient CV (CV = Standardabweichung/Mittelwert) bei

Temperaturversuchen kleiner als 15 % sein. Andere Faktoren sind schwerer experimentell zu steuern und daher ist ein CV von 25 % annehmbar.

4.5 Kardinalparameterbestimmung

Die Kardinalparameter werden durch Anpassen von einem der Sekundärmodelle (4.2) an die Versuchsdaten (für verschiedene Niveaus des untersuchten Faktors ermittelte maximale spezifische Wachstumsraten) bestimmt.

Diese Bestimmung wird für jeden Faktor unabhängig durchgeführt.

Die Verknüpfungsfunktion Quadratwurzel wird zum Stabilisieren der Varianz wie folgt verwendet:

$$\sqrt{\mu_{max}} = \sqrt{\dot{\mu}_{Broth} \cdot \gamma_X} \quad (13)$$

Dabei ist/sind

μ_{max} (h^{-1}) die maximale spezifische Wachstumsrate, die unter den geprüften Bedingungen für den untersuchten Faktor ermittelt wird;

$\dot{\mu}_{Broth}$ (h^{-1}) die optimale Wachstumsrate des mikrobiellen Stamms, die in Bouillon ermittelt wird;

$\dot{\mu}_{Broth}$ (h^{-1}) die optimale Wachstumsrate des mikrobiellen Stamms, die in Bouillon ermittelt wird;

γ_X die relativen Auswirkungen von Temperatur, pH, a_w γ_X : Die Parameter und die relativen Standardfehler r ($r = \text{Standardfehler} / \text{Schätzung}$) müssen berechnet werden. Der relative Standardfehler r darf 10 % nicht überschreiten; andernfalls darf die Schätzung in weiteren Vorhersagen nicht verwendet werden und die Versuchsanordnung muss verbessert werden, um die Qualitätskriterien von 10 % zu erfüllen.

Für diesen Zweck können geeignete Merkblätter und freie Software verwendet werden (siehe Anhang A).

4.6 Korrekturfaktorbestimmung

Der Korrekturfaktor dient zur Berücksichtigung der Matrixauswirkung in der Vorhersage, zusätzlich zu den Auswirkungen der extrinsischen und intrinsischen Faktoren, die durch die Gamma-Terme und die damit verknüpften Kardinalwerte evaluiert werden.

Der Korrekturwert wird aus zwei Parametern ermittelt, nämlich $\dot{\mu}_{Broth}$ und $\dot{\mu}_{Food}$, entsprechend den jeweils in der Bouillon und im Lebensmittel ermittelten optimalen Wachstumsraten.

$\dot{\mu}_{Food}$ ist von einer Wachstumskinetik-Challenge-Test-Untersuchung abgeleitet, in der das direkte Ausstrichverfahren zum Schätzen der maximalen spezifischen Wachstumsrate in der Ziel-Lebensmittelmatrix unter bestimmten statischen Bedingungen verwendet wird (siehe ISO 20976-1, 4.3 Schätzung der Parameter zur Wachstumskinetik).[1]. Der berechnete relative Standardfehler der maximalen spezifischen Wachstumsrate darf 10 % nicht überschreiten. Andernfalls muss eine Ursachenanalyse durchgeführt werden und es muss bei Bedarf ein neuer Challenge-Test durchgeführt werden.

Der Korrekturfaktor C_f wird zum Beschreiben der Auswirkungen des Lebensmittels, das nicht in den dimensionslosen γ -Termen enthalten ist, und der optimalen Wachstumsrate der Bouillon $\dot{\mu}_{Broth}$ durch die folgende Gleichung verwendet:

$$C_f = \frac{\dot{\mu}_{Food}}{\dot{\mu}_{Broth}} \quad (14)$$

Dabei ist

C_f ein dimensionsloser Korrekturfaktor, der die Lebensmittelmatrix-Auswirkung berücksichtigt;

$\dot{\mu}_{Broth} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ die optimale Wachstumsrate des mikrobiellen Stamms, geschätzt in Bouillon;

$\dot{\mu}_{Food} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ die optimale Wachstumsrate des mikrobiellen Stamms, geschätzt im Lebensmittel unter konstanten Bedingungen.

Nach der Bestimmung muss der Korrekturfaktor C_f mit mindestens einem zusätzlichen Challenge-Test validiert werden. Bei heterogenen Lebensmitteln können zusätzliche Validierungen erforderlich sein.

Wenn ein neuer Faktor berücksichtigt wird (z. B. bei Berücksichtigung eines neuen Hemmstoffs), muss der Korrekturfaktor erneut evaluiert werden.

Die Verknüpfungsfunktion Quadratwurzel wird zum Stabilisieren der Varianz verwendet, d. h. die Gleichung (1) wird wie folgt ausgedrückt:

$$\sqrt{\mu_{max,food}} = \sqrt{\dot{\mu}_{Broth} \cdot C_f \cdot \gamma_T \cdot \gamma_{pH} \cdot \gamma_{aw} \cdot \gamma_{Inhibitors}} \quad (15)$$

Dabei ist

$\mu_{max,Food} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ die simulierte maximale spezifische Wachstumsrate, die im Lebensmittelerzeugnis unter den neuen Zielbedingungen ermittelt wird;

$\dot{\mu}_{Broth} \text{ (h}^{-1}\text{)}$ die optimale Wachstumsrate des mikrobiellen Stamms, ermittelt in Bouillon;

C_f ein dimensionsloser Korrekturfaktor, der die Lebensmittelmatrix-Auswirkung berücksichtigt;

γ die relativen Auswirkungen von Temperatur, pH, a_w und Hemmstoffen.

4.7 Validierung

Vor der dem Verwenden der Modellparameter in Vorhersagen ist es wesentlich, Validierungsversuche durchzuführen, um neue Daten zu erhalten, die sich vom zum Schätzen der Modellparameter verwendeten Datensatz unterscheiden.

Wenn die Validierung unter statischen Bedingungen durchgeführt wird, werden systematische Abweichungs- und Genauigkeitsfaktoren [11] für die maximalen spezifischen Wachstumsraten berechnet wie in Gleichung (16) und Gleichung (17) dargestellt.

$$B_f = e^{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log \mu_{max,observed} - \log \mu_{max,predicted}} \quad (16)$$

$$A_f = e^{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\log \mu_{max,observed} - \log \mu_{max,predicted})^2}} \quad (17)$$

Dabei ist

B_f der systematische Abweichungsfaktor;

A_f der Genauigkeitsfaktor;

$\mu_{max,observed}$ das Ergebnis des Validierungsversuchs;

$\mu_{max,predicted}$ das Ergebnis der Modellvorhersage unter Verwendung der geschätzten Parameter;

n die Anzahl von für die Validierung verwendeten Chargen.

Mindestens eine Charge muss untersucht werden; zusätzliche Chargen sind empfohlen, aber nicht verbindlich vorgeschrieben.

Der berechnete relative Standardfehler von $\mu_{\text{max-observed}}$ muss kleiner sein als 10 %. Andernfalls muss eine Ursachenanalyse durchgeführt werden und bei Bedarf muss ein neuer Challenge-Test durchgeführt werden.

Wenn die Validierung unter dynamischen Bedingungen durchgeführt wird, dürfen A_f und B_f nicht verwendet werden. Stattdessen müssen der mittlere Fehler (ME , en: mean error) und der mittlere quadratische Fehler ($RMSE$, en: root mean squared error) statt eines Maßes für jeweils die systematische Abweichung und die Genauigkeit verwendet werden wie in Gleichung (18) und Gleichung (19) definiert.

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log N_{obs,i} - \log N_{predicted,i} \quad (18)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\log N_{obs,i} - \log N_{predicted,i})^2} \quad (19)$$

Dabei ist

$\log N_{obs,i}$ jeweils eine der beobachteten mikrobiellen $\log_{10}$ -Konzentrationen;

$\log N_{predicted,i}$ jeweils eine der vom Modell vorhergesagten/angepassten mikrobiellen $\log_{10}$ -Konzentrationen;

n die Gesamtanzahl der geprüften mikrobiellen Konzentrationen.

Die Auszählungsergebnisse werden zum Vergleichen der Modellvorhersagen mit den beobachteten log-Zählungen im Laufe der Zeit verwendet.

4.8 Verwenden von Kardinalwerten und Lebensmittel-Korrekturfaktor in Vorhersagen

Die Kardinalwerte und C_f sind erforderlich zum Durchführen von Vorhersagen in Lebensmittel-Matrices.

- Wenn der Korrekturfaktor C_f bestimmt ist, kann die maximale spezifische Wachstumsrate des untersuchten Mechanismus in der interessierenden Matrix für verschiedene Bedingungen simuliert werden. Dies kann zum Unterstützen von Qualitäts- und Sicherheitsbewertungen an Lebensmitteln (z. B. Haltbarkeitsdauer-Validierung, Rechtfertigung von Maßnahmen zur Beherrschung in HACCP-Studien) verwendet werden.
- Wenn Challenge-Test-Daten zum Bestimmen von C_f in Lebensmitteln fehlen, können die Vorhersagen in Bouillon durchgeführt werden. In diesem Fall gilt $C_f = 1$.

Die beim Durchführen der Vorhersagen verwendeten Modelle müssen die gleichen sein, die für die Anpassungen verwendet werden entsprechend den in 4.2 dargestellten Gleichungen. Hierzu können Statistiksoftware oder benutzerfreundliche Werkzeuge für die prädiktive Mikrobiologie verwendet werden, die Anpassungs- und Vorhersagefunktionen bieten können. Eine nicht vollständige Richtliste enthält Anhang A. Die Auswahl und richtige Verwendung dieser Werkzeuge sollten dem Zweck angemessen sein und obliegen der Entscheidung der Benutzer, vorausgesetzt diese verfügen über die maßgebliche Sachkenntnis auf dem Gebiet der Lebensmittel-Mikrobiologie, der prädiktiven Mikrobiologie und der Statistik. Diese Kenntnisse umfassen ein Verständnis der Theorie der Probenahme, des Versuchsaufbaus, der statistischen Analyse mikrobiologischer Daten sowie einen Überblick über wissenschaftlich anerkannte und verfügbare mathematische Konzepte, die in der prädiktiven Mikrobiologie verwendet werden.

Beim Verwenden von Werkzeugen der prädiktiven Mikrobiologie zum Vorhersagen des Wachstums ist es von entscheidender Bedeutung, die spezifischen Module, die Modellierungsansätze und die zum Erzeugen der Ergebnisse verwendeten Parameterwerte zu dokumentieren.

5 Verdünnungsmittel, Nährmedien und Reagenzien

Es werden aktuelle Laborpraktiken nach ISO 7218 befolgt.

Zur Vorbereitung und Durchführung der Tests an Nährmedien und Reagenzien werden die Verfahren nach ISO 11133 sowie nach den Angaben in der jeweiligen Internationalen Norm beachtet, die sich mit dem Zielmikroorganismus befasst. Außerdem sind international anerkannte und gemeinhin akzeptierte Routineverfahren oder nach international anerkannten Verfahrensanweisungen validierte Alternativverfahren für die Auszählung der Zielmikroorganismen zu verwenden (z. B. ISO 16140-2) [3].

Die Bouillon muss nicht selektiv nährstoffreich und für den untersuchten mikrobiellen Stamm geeignet sein.

Bei pH-Einstellungen der Bouillon müssen starke Säuren, etwa Salzsäure (HCl), oder starke Basen, etwa Natriumhydroxid (NaOH) verwendet werden und es müssen die Lieferantenherkunft, die Reinheit, die Stoffmengenkonzentration oder die Konzentration der Lösung dokumentiert werden. Die Menge von zugefügtem HCl oder NaOH (Gewicht in Gramm, Volumen) muss aufgezeichnet werden. Der endgültige pH-Wert muss anhand des Ziels verifiziert, aufgezeichnet und vor der Verwendung geprüft werden.

Bei Wasseraktivitätseinstellungen der Bouillon werden Salz (z. B. Natriumchlorid) oder Zucker (z. B. Saccharose) oder andere Feuchthaltemittel verwendet. Die Lieferantenherkunft, die Reinheit, die Stoffmengenkonzentration oder die Konzentration der Lösung sollte dokumentiert werden. Die Menge von zugefügtem Salz oder Zucker (Gewicht in Gramm, Volumen) muss aufgezeichnet werden. Der endgültige a_w -Wert muss anhand des Ziels verifiziert, aufgezeichnet und vor der Verwendung geprüft werden.

Bei Einstellungen der Bouillon mit schwachen Säuren müssen organische Säuren (z. B. Milchsäure, Essigsäure) verwendet werden und es müssen die Lieferantenherkunft, die Reinheit, die Stoffmengenkonzentration und die Konzentration der Lösung dokumentiert werden. Der endgültige pH-Wert der Lösung muss anhand des Ziels verifiziert, aufgezeichnet und vor der Verwendung geprüft werden.

Die Lagerung der Bouillon nach der Herstellung muss die Zielmerkmale erfüllen und darf zwei Monate nicht überschreiten.

6 Laborausrüstung und Geräte

Es ist eine Standard-Mikrobiologieausrüstung wie in ISO 7218 festgelegt erforderlich. Spezifische Geräte können ebenfalls erforderlich sein, um mikrobielles Wachstum in Bouillon zu überwachen. Diese beinhalten unter anderem folgende Geräte:

- Kühlinkubator, geeignet, um Solltemperaturen von ± 1 °C zu erreichen und zu halten.
- pH-Messgerät und pH-Elektrode, geeignet, um Messungen mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ pH-Einheiten durchzuführen. pH-Messgeräte müssen Messungen mit einer Auflösung von 0,01 pH-Einheiten ausführen können.
- a_w -Messgerät, das die Anforderungen nach ISO 18787 erfüllt.
- Ausrüstung zum Bestimmen der Konzentration der Hemmstoffe.
- Headspace-Gasanalysegerät zur Messung der Gaszusammensetzung (z. B. O₂, CO₂).
- Logger zur Messung der untersuchten Temperaturbedingungen.

- Gerät zur automatisierten Messung der optischen Dichte (OD), geeignet zum Halten von Solltemperaturen auf $\pm 1^\circ\text{C}$, Messen und Auftragen von Änderungen in der OD im Laufe der Zeit zum Erzeugen von Wachstumskurven. Das Gerät muss ein Breitbandfilter (580–630 nm) enthalten, das wenig empfindlich auf Farbbänderung des Wachstumsmediums anspricht, und muss mit einem Schüttelsystem zum Homogenisieren der Proben vor der Trübungsmessung ausgestattet sein. Wenn machbar, werden eine Kondensations- und Verdampfungskontrolle implementiert, um die Umweltbedingungen während der Versuche stabil zu halten.

ANMERKUNG Bei Messungen der optischen Dichte wird der Strahl in der Mitte der Wells fokussiert. Daher ist ein Schütteln besonders für bewegliche Stämme zweckmäßig. Die Homogenisierung vor der Messung wird an die Stammbeweglichkeit angepasst, da ein Schütteln die Zellen zu den Seiten des Wells drücken kann.

7 Versuchsanordnung und Datenerhebung

7.1 Allgemeines

Die Versuchsanordnung muss Versuche in Bouillon zum Bestimmen der Kardinalwerte unter Berücksichtigung aller maßgeblichen Faktoren beinhalten und Challenge-Test-Versuche in der Ziel-Lebensmittelmatrix zur Charakterisierung des Lebensmittel-Korrekturfaktors und zu Validierungszwecken enthalten.

7.2 Herstellung von Kultur und Medium

7.2.1 Wahl und Lagerung des untersuchten Stamms

Jeder Prüfstamm muss biochemisch und/oder serologisch und/oder genetisch ausreichend detailliert charakterisiert werden, um dessen Identität zu bestätigen.

Stämme können stammen aus:

- der Lebensmittelmatrix (isoliert aus Ausgangsstoffen, Inhaltsstoffen und Endprodukten) oder der Herstellungsumgebung oder klinischen Fällen nach Ausbrüchen unter Bezug auf Lebensmittel;
- einer anerkannten Kulturtypsammlung.

Die Prüfung der Reinheit des Stamms muss auf nicht selektivem Medium (z. B. TSYEA, Tryptone Soya Yeast Extract Agar) oder einem äquivalenten Nährmedium unter Verwendung einer empfohlenen Inkubationszeit und Temperatur durchgeführt werden. Die Prüfung der Spezifität wird auf selektivem Medium der untersuchten Arten unter Verwendung einer empfohlenen Inkubationszeit und Temperatur durchgeführt.

Stämme werden gefroren gelagert. Leitfäden zur Lagerung von mikrobiellen Stämmen enthält ISO 11133. Alle Kulturen (siehe 7.2.2) müssen aus dem gleichen Gebrauchsröhrchen hergestellt werden. Im Falle einer Kontamination werden Reserveröhrchen verwendet.

Zur Rückverfolgbarkeit muss das Datum des Einfrierens des Stamms aufgezeichnet werden.

Zum Beurteilen von Kardinalwerten müssen Stämme einzeln untersucht werden; Cocktails von Stämmen dürfen nicht auf ihre Kardinalwerte in gemischten Kulturen untersucht werden. Stattdessen muss jeder Stamm unabhängig untersucht werden; anschließend kann beim Durchführen der Vorhersagen der Stamm im ungünstigsten Fall (z. B. niedrigster Wert für $T_{\min}^{\text{C}}$) ein durchschnittliches Verhalten der geprüften Stämme (z. B. unter Verwendung des Durchschnitts der ermittelten $T_{\min}^{\text{C}}$ -Werte in den Vorhersagen) berücksichtigt werden oder es können alle einzelnen Stämme in einem stochastischen Modell unter Berücksichtigung der Verteilungen der Kardinalwerte eingeschlossen werden.

7.2.2 Herstellung und Beimpfung der mikrobiellen Kultur

Zwei aufeinander folgende Subkulturen des ausgewählten Stamms müssen in einem Nährmedium unter Bedingungen hergestellt werden, die ein optimales Wachstum des ausgewählten Stamms ermöglichen. Die zweite

Subkultur muss unter optimalen Bedingungen das Ende der exponentiellen Phase oder den Beginn der stationären Phase erreicht haben, sodass der physiologische Zustand der mikrobiellen Population standardisiert ist. Die Verifizierung der Reinheit muss durch Ausstreichen der Kultur auf einer nicht selektiven Platte erfolgen. Eine Prüfung der Kulturdichte muss anhand der optischen Dichte erfolgen und dies muss durch Ausstreichen zum Bestimmen der mikrobiellen Konzentration in der zweiten Subkultur verifiziert werden. Leitfäden zur Herstellung des Inokulums enthält ISO 20976-1 [1].

Die Stammanpassung während der Herstellung des Inokulums wirkt sich ausschließlich auf die Zeit der lag-Phase aus, was in dieser Norm nicht behandelt ist. Daher sind beim Bestimmen der Kardinalwerte oder der optimalen Wachstumsrate Stammanpassungen nicht erforderlich.

Beim Beimpfen der Lebensmittelmatrix ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Beimpfungsprozess den natürlichen Kontaminationsweg widerspiegelt: innerhalb und/oder auf der Oberfläche des Produkts.

7.2.3 Herstellung der modifizierten Nährbouillon

Die ausgewählte Nährbouillon muss ein optimales Wachstum des ausgewählten Stamms ermöglichen, wenn jeder der Faktoren unverändert bleibt. Wenn ein Faktor zur Kardinalparameterbestimmung untersucht wird, müssen die anderen Faktoren konstant bleiben und müssen gemessen werden.

Faktor Temperatur: Die Temperatur der Bouillon wird nach Sterilisation durch Filtration oder Wärmesterilisation auf die Solltemperatur voreingestellt und vor Beginn des Versuchs aufgezeichnet. Die pH- und a_w -Werte des Mediums werden bei Raumtemperatur vor Beginn des Versuchs gemessen und müssen für alle untersuchten Temperaturniveaus optimal sein.

Faktor a_w : Zum Einstellen des a_w -Werts des Mediums kann Natriumchlorid, Zucker (z. B. Glucose, Fructose) oder Glycerin verwendet werden. Anhang B enthält a_w -Messungen, die für verschiedene Natriumchloridniveaus ermittelt wurden. Bouillon-Chargen werden mit einem Konzentrationsbereich des hinzugefügten Feuchthaltemittels hergestellt. a_w -Sollniveaus werden vor der Wärmesterilisation oder Filtration eingestellt und nach der Sterilisation gemessen und die Menge des hinzugefügten Feuchthaltemittels und das a_w -Niveau werden aufgezeichnet. Der pH-Wert der Medien und die Temperatur müssen für alle untersuchten a_w -Niveaus gleich sein. Vor dem Beginn wird der pH-Wert bei Raumtemperatur gemessen und bei Bedarf eingestellt. Die pH-Werte des Mediums und die Inkubationstemperatur müssen für alle a_w -Niveaus für den untersuchten Stamm optimal oder nahezu optimal sein.

Faktor pH: Salzsäure oder Schwefelsäure und Natriumhydroxid müssen als starke Säuren und Base zum Einstellen des pH-Werts des Mediums verwendet werden. Schwefelsäure wird bevorzugt, wenn hohe Konzentrationen von Chlorid (Cl^-) das mikrobielle Wachstum beeinflussen können. Das hinzugefügte Volumen der Säure darf 5 % des Ausgangsvolumens nicht überschreiten, um die Nährstoffzusammensetzung des Nährmediums zu erhalten. Bouillon-Chargen werden mit einem Konzentrationsbereich der hinzugefügten Säure hergestellt. pH-Sollniveaus werden vor der Sterilisation durch Filtration eingestellt und nach der Sterilisation gemessen und die Menge der hinzugefügten Säure und das pH-Niveau werden aufgezeichnet. Der pH-Wert wird gegebenenfalls erneut auf den pH-Sollwert nach der Sterilisation durch Autoklavieren eingestellt, da Cl^- -Ionen den pH-Wert des Mediums verändern können. Der a_w -Wert der angesäuerten Bouillon darf nicht modifiziert werden und wird bei Raumtemperatur gemessen und aufgezeichnet. Zum Einstellen des pH-Werts können 5-M-, 3-M- und 1-M-Lösungen von Salzsäure verwendet werden. Die pH-Sonde für pH-Messungen muss entsprechend dem Versuchsbereich kalibriert werden. Üblicherweise werden Kalibrierpuffer von pH 4,0 und pH 7,0 bei 20 °C bis 22 °C verwendet, um einen Versuchsbereich von 4,0 bis 7,0 abzudecken. Die a_w -Werte des Mediums und die Inkubationstemperatur müssen für alle pH-Niveaus für den untersuchten Stamm optimal oder nahezu optimal sein.

Faktor schwache organische Säure: Die Konzentration der undissoziierten Form der schwachen Säure hängt vom pH-Wert ab. Das Verhältnis zwischen den dissoziierten und undissoziierten Formen kann unter Verwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung [Gleichung (20)] [37] berechnet werden.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right) \quad (20)$$

Dabei ist

[A⁻] die dissoziierte Form der organischen Säure;

[HA] die undissoziierte Form der organischen Säure.

Die Auswirkung einer schwachen organischen Säure auf das mikrobielle Wachstum muss bei einem pH-Sollwert für alle geprüften Konzentrationen der undissoziierten schwachen Säure untersucht werden. Der gewählte pH-Sollwert muss innerhalb des Wachstumsbereichs der untersuchten Arten liegen und muss nahe genug beim pK_a-Wert der schwachen Säure liegen, um die elektrisch neutrale undissoziierte Form zu beobachten. Starke Säuren werden zum Einstellen des pH-Werts der Bouillon verwendet und der gewählte pH-Sollwert muss für alle untersuchten Niveaus der schwachen Säure gleich sein. Stammlösungen der schwachen organischen Säure werden in destilliertem Wasser hergestellt und der Bouillon hinzugefügt, um die erwartete Konzentration der undissoziierten Form der schwachen Säure zu erhalten. Sollniveaus der schwachen organischen Säure werden vor der Wärmesterilisation oder Filtration eingestellt und die Menge von hinzugefügter schwacher Säure und das pH-Niveau werden aufgezeichnet. Die a_w-Werte des Mediums und die Inkubationstemperatur müssen für alle Niveaus der schwachen Säure unter Berücksichtigung des untersuchten Stamms optimal oder nahezu optimal sein.

ANMERKUNG Es wird erwartet, dass die Wahl des Feuchthaltemittels das Wachstum und a_{wmin} beeinflusst. Ebenso könnte die Wahl der Säure zum Senken des pH-Werts den pHmin-Wert von einigen Mikroorganismen (z. B. Alicyclobacillus) beeinflussen. Die Auswahl des Feuchthaltemittels und der schwachen organischen Säure hängt von der untersuchten Art und vom Ziellebensmittel für die Vorhersage des mikrobiellen Wachstums ab.

7.3 Niveaus nach Faktor zum Schätzen von Kardinalparametern

7.3.1 Allgemeines

Das binäre Verdünnungsverfahren auf Basis der optischen Dichte (indirektes Verfahren) ist das Verfahren der Wahl zum Bestimmen von maximalen spezifischen Wachstumsraten in Nährbouillon mit einem hohen Durchsatz zum Bestimmen der Kardinalparameter. Wenn indirekte Verfahren in der Bouillon nicht verwendet werden können (z. B. zum Messen von maximalen spezifischen Wachstumsraten unter extremen Bedingungen an den Wachstumsgrenzen), wird ein direktes Ausstreichen empfohlen. Wenn maximale spezifische Wachstumsraten durch beide Verfahren zum Schätzen der Kardinalparameter ermittelt werden, können Ergebnisse kombiniert werden.

Literaturquellen oder andere Datenquellen müssen untersucht werden, um den Wachstumsbereich des Prüfstamms zu recherchieren. Diese Information liefert einen groben Anhaltspunkt für das Wachstumsminimum und das Wachstumsmaximum für einen Faktor und ermöglicht das Verfolgen eines strategischen Probenahmeansatzes zum erwarteten Wachstumsminimum, Wachstumsmaximum und Wachstumsoptimum.

ANMERKUNG Im Umfang der Untersuchung können ein oder mehrere Faktoren eingeschlossen sein (z. B. nur die Temperatur oder die Temperatur und der pH-Wert).

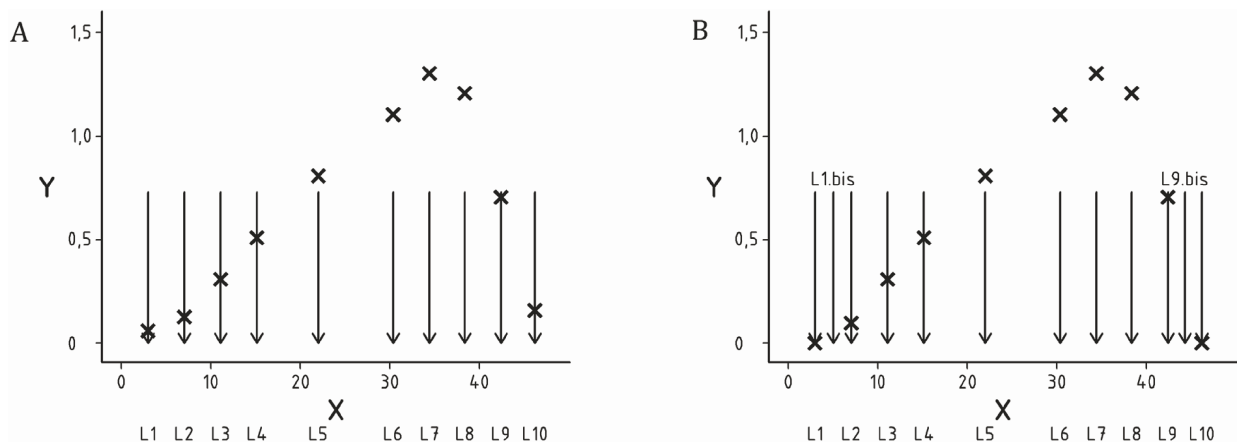
7.3.2 Temperatur

Für den Faktor Temperatur werden zehn Niveaus gewählt (siehe Bild 2), nämlich vier Niveaus (L1, L2, L3, L4) um das erwartete Wachstumsminimum, drei Niveaus (L8, L9, L10) um das erwartete Wachstumsmaximum, zwei Niveaus (L6, L7) um das erwartete Wachstumsoptimum und ein Niveau (L5) zwischen Niveau L4 und L6 (siehe Bild 2, Unterschied zwischen Temperaturwerten an den Wachstumsgrenzen größer gleich 4 °C für die erste Wiederholung).

Mindestens zwei unabhängige biologische Wiederholungen müssen durchgeführt werden; vorzugsweise werden drei Wiederholungen durchgeführt.

Wenn die erste Wiederholung von jedem Temperaturniveau in einer gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsrate resultiert (gemessener Wert ungleich Null), müssen die gleichen in Bild 2 vorgeschlagenen

Niveaus für die zweite und dritte Wiederholung verwendet werden. Biologische Wiederholungen sind technischen Wiederholungen vorzuziehen.



Legende

X Temperatur

Y $\mu_{\max}$

Bild 2 — Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für Temperatur in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die zehn Niveaus (L1 bis L10) ermittelt werden (2-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 und/oder L10 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (2-B)

Wenn das Ergebnis der ersten Wiederholung um das Wachstumsminimum (L1, Bild 2-B) oder das Wachstumsmaximum (L10, Bild 2-B) eine gemessene maximale spezifische Wachstumsrate von Null ist, muss ein neues Temperaturniveau (L1.bis und/oder L9.bis, Bild 2-B) gewählt werden, um sicherzustellen, dass die zehn Niveaus alle gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsraten aufweisen, bevor mit der zweiten und dritten Wiederholung fortgesetzt wird, wobei die zweite Versuchsanordnung (Bild 2-B) verwendet werden muss.

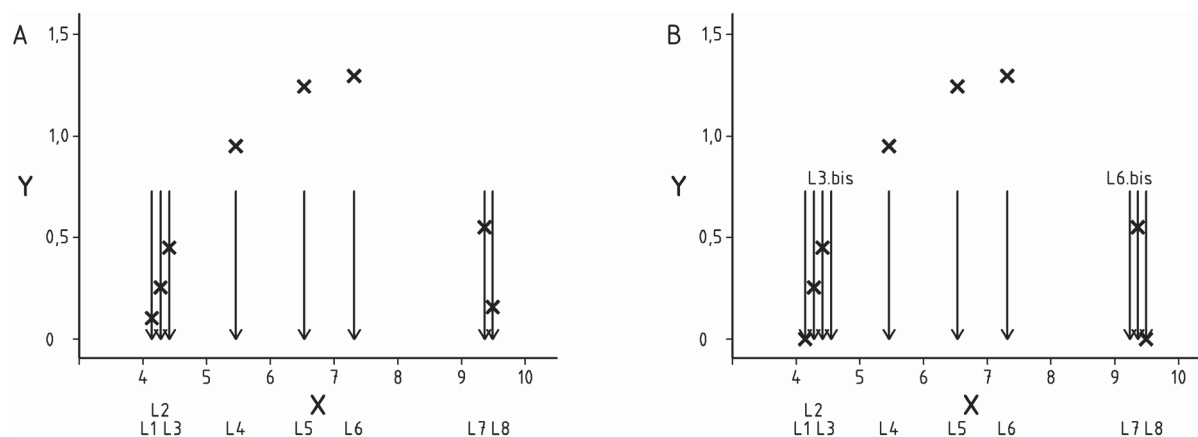
Wenn sich ein Niveau nahe dem Wachstumsminimum oder Wachstumsmaximum befindet, ist die maximale spezifische Wachstumsrate nahe Null und die zweite oder dritte Wiederholung kann eine gemessene maximale spezifische Wachstumsrate von Null liefern. Diese Nullwertmessungen müssen in der weiteren Analyse der Kardinalparameterschätzung (Abschnitt 8) enthalten sein, da dieser Unterschied zwischen gemessenen Werten die mit den maximalen spezifischen Wachstumsraten verknüpfte Variabilität darstellt.

Da die pH- und a_w -Werte der Medien optimal für alle untersuchten Temperaturniveaus sind, kann μ_{opt} in Bouillon ebenfalls unter Verwendung dieser Versuchsanordnung geschätzt werden.

Wenn die Eingangstemperatur von dem das Wachstum unterstützenden Minimum bis zu einer Referenztemperatur, die unterhalb der optimalen Temperatur liegt, reicht, muss Gleichung (3) verwendet werden und die Niveaus L6 bis L10 sind nicht erforderlich.

7.3.3 pH

Für den Faktor pH werden acht Niveaus gewählt, wenn die Kardinalparameter $\text{pH}_{\min}$, $\text{pH}_{\max}$ und pH_{opt} unter Verwendung von Gleichung (3) bestimmt werden, nämlich drei Niveaus (L1, L2, L3) um das erwartete Wachstumsminimum, zwei Niveaus (L7, L8) um das erwartete Wachstumsmaximum, zwei Niveaus (L5, L6) um das erwartete Wachstumsoptimum und ein Niveau (L4) zwischen L3 und L5 (siehe Bild 3).



Legende

X pH

Y $\mu_{\max}$

Bild 3 — Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für pH in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die acht Niveaus (L1 bis L8) ermittelt werden (3-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 und/oder L8 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (3-B)

Drei unabhängige biologische Wiederholungen müssen durchgeführt werden.

Wenn die erste Wiederholung von jedem pH-Niveau in einer gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsrate resultiert (gemessener Wert ungleich Null), müssen die gleichen Niveaus für die zweite und dritte Wiederholung entsprechend der in Bild 3-A dargestellten Versuchsanordnung verwendet werden. Biologische Wiederholungen sind technischen Wiederholungen vorzuziehen.

Wenn das Ergebnis der ersten Wiederholung um das Wachstumsminimum (L1, Bild 3-B) oder das Wachstumsmaximum (L8, Bild 3-B) eine gemessene maximale spezifische Wachstumsrate von Null ist, muss ein neues pH-Niveau (L3.bis und/oder L6.bis, Bild 3-B) gewählt werden, um sicherzustellen, dass die acht Niveaus alle gemessenen Wachstumsraten aufweisen, bevor mit der zweiten und dritten Wiederholung fortgesetzt wird, wobei die zweite Versuchsanordnung (Bild 3-B) verwendet werden muss.

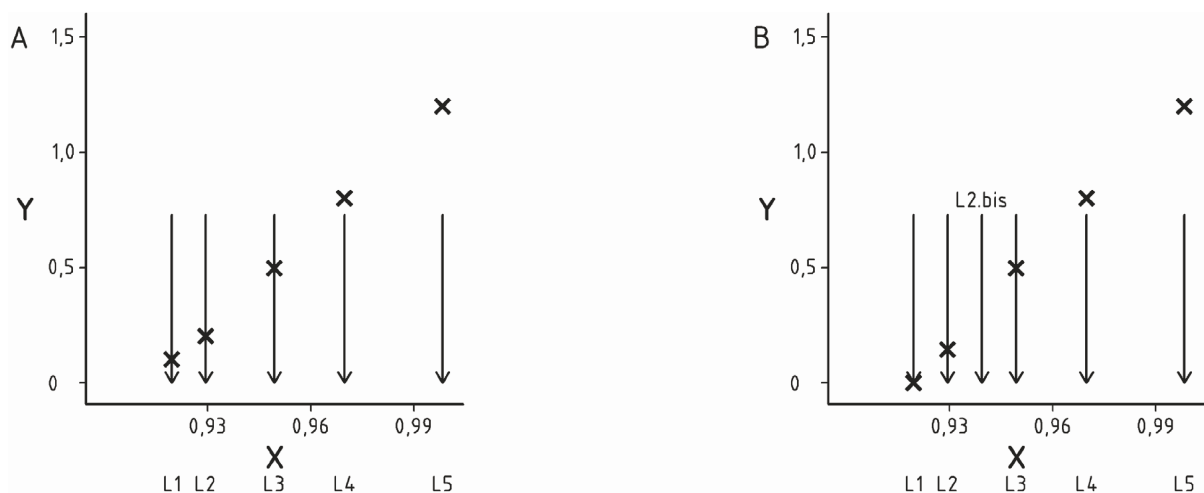
Aufgrund der Genauigkeit von pH-Messungen wird kein zusätzliches Niveau zwischen L1 und L2 oder zwischen L7 und L8 gewählt.

Wenn der Kardinalparameter $\text{pH}_{\max}$ nicht erforderlich ist, wird Gleichung (4) verwendet und anschließend sind die Niveaus L7 und L8 nicht in der Versuchsanordnung enthalten.

Wenn die in der ersten Wiederholung ermittelten maximalen spezifischen Wachstumsraten ein Plateau bei einem höheren pH-Wert aufweisen (drei aufeinander folgende Werte), wird Gleichung (4) verwendet und die Niveaus L7 und L8 sind nicht erforderlich.

7.3.4 Wasseraktivität

Für den Faktor a_w werden fünf Niveaus gewählt, nämlich zwei Niveaus (L1, L2) um das erwartete Wachstumsminimum, ein Niveau (L5) beim a_w -Wert der nicht modifizierten Bouillon und zwei Niveaus (L3, L4) zwischen L2 und L5 (siehe Bild 4).



Legende

X a_w

Y μ_{max}

Bild 4 — Versuchsanordnung für die Bestimmung von Kardinalwerten für die Wasseraktivität in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die fünf Niveaus (L1 bis L5) ermittelt werden (4-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L1 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (4-B)

Wenn der Kardinalparameter $a_{w_{max}}$ unter Verwendung von Gleichung (6) bestimmt wird, ist ein zusätzliches Niveau (L6) erforderlich.

Drei unabhängige biologische Wiederholungen müssen durchgeführt werden.

Wenn die erste Wiederholung von jedem a_w -Niveau in einer gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsrate resultiert (gemessener Wert ungleich Null), müssen die gleichen Niveaus für die zweite und dritte Wiederholung verwendet werden (Bild 4-A). Biologische Wiederholungen sind technischen Wiederholungen vorzuziehen.

Wenn das Ergebnis der ersten Wiederholung um das Wachstumsminimum (L1, Bild 4-B) eine gemessene maximale spezifische Wachstumsrate von Null ist, muss ein neues a_w -Niveau (L2.bis, Bild 4-B) gewählt werden, um sicherzustellen, dass die fünf Niveaus alle gemessenen Wachstumsraten aufweisen, bevor mit der zweiten und dritten Wiederholung fortgesetzt wird, wobei die zweite Versuchsanordnung (Bild 4-B) verwendet werden muss.

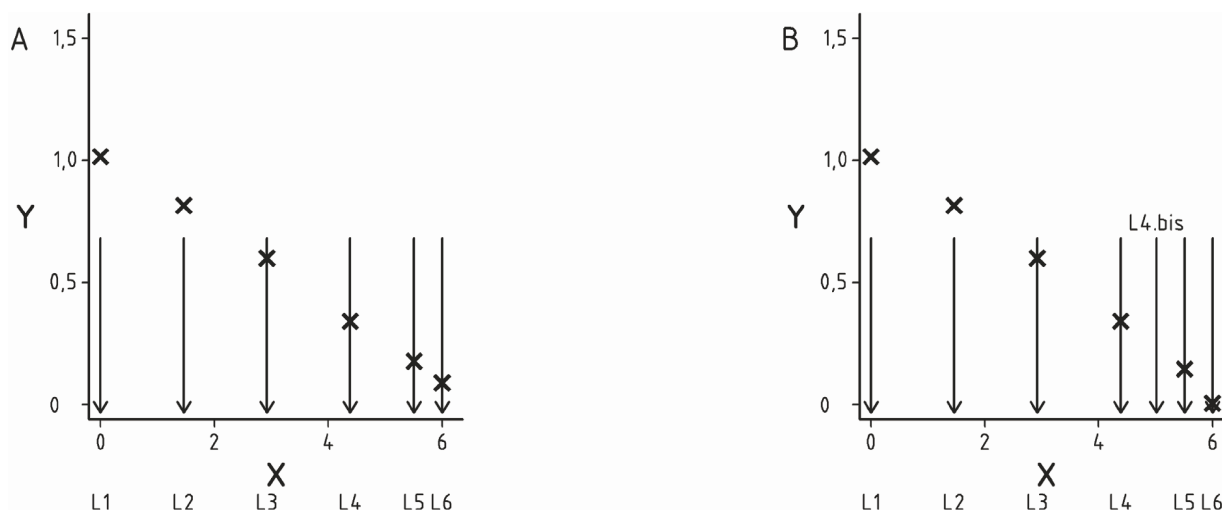
Kein zusätzliches Niveau wird zwischen L1 und L2 aufgrund der Genauigkeit von a_w -Messungen gewählt.

Wenn der Kardinalparameter $a_{w_{max}}$ unter Verwendung von Gleichung (5) bestimmt wird, muss das Niveau L6 enthalten sein und L5 darf auf einen niedrigeren Wert festgelegt werden.

7.3.5 Hemmverbindungen

Bei Hemmverbindungen darf ausschließlich die antimikrobielle aktive Form berücksichtigt werden, falls bekannt. Zum Beispiel darf bei organischen Säuren ausschließlich die Konzentration der undissoziierten Form berücksichtigt werden (siehe 7.2.3). Eine direkte oder eine indirekte Messung der aktiven muss verfügbar sein, um die minimale Hemmkonzentration zu beurteilen.

Sechs Konzentrationsniveaus werden gewählt, nämlich ein Niveau (L1) in der Bouillon ohne Zugabe der Hemmverbindung, zwei Niveaus (L5, L6) um die erwartete minimale Hemmkonzentration und drei Niveaus (L2, L3, L4) zwischen L1 und L5 (siehe Bild 5).



Legende

X HLa

Y $\mu_{\max}$

Bild 5 — Versuchsanordnung für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) in der ersten Wiederholung, wenn maximale spezifische Wachstumsraten für die sechs Niveaus (L1 bis L6) ermittelt werden (5-A) oder wenn die maximale spezifische Wachstumsrate von Null bei L6 in der ersten Wiederholung ermittelt wird (5-B)

Drei unabhängige biologische Wiederholungen müssen durchgeführt werden.

Wenn die erste Wiederholung von jedem Hemmverbindungs-niveau in einer gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsrate resultiert (gemessener Wert ungleich Null), müssen die gleichen Niveaus für die zweite und dritte Wiederholung verwendet werden, wobei die zweite Versuchsanordnung (Bild 5-A) verwendet werden muss.

Biologische Wiederholungen sind technischen Wiederholungen vorzuziehen.

Wenn das Ergebnis der ersten Wiederholung um das Wachstumsminimum (L6, Bild 5-B) eine gemessene maximale spezifische Wachstumsrate von Null ist, muss ein niedrigeres Niveau (L4.bis, Bild 5-B) gewählt werden, um sicherzustellen, dass die sechs Niveaus alle gemessenen Wachstumsraten aufweisen, bevor mit der zweiten und dritten Wiederholung fortgesetzt werden. Ein zusätzliches neues Niveau muss auf der Grundlage der Genauigkeit der aktiven Form der Hemmverbindungsmessung gewählt werden und für einige Verbindungen ist das Niveau L5.bis geeignet.

7.4 Versuchsanordnung zum Schätzen der maximalen spezifischen Wachstumsrate mit dem binären Verdünnungsverfahren auf OD-Basis

Die in 7.2.2 erhaltene Kultur wird verdünnt, um eine Ausgangskonzentration zum Anstreben von $5 \log_{10}$ KBE/ml (Suspension D1) zu erhalten. Reihen von zweifachen Verdünnungen werden anschließend aus der Suspension D1 hergestellt. Das Verdünnungsmedium muss identisch mit dem Prüfmedium sein (d. h. mit dem angestrebten pH- oder a_w -Wert). Nicht beimpfte Wells dienen zur Kontrolle (wenigstens eins je Niveau des Faktors).

Eine Voruntersuchung muss durchgeführt werden, um den geeigneten Schwellenwert (N_d) zur Verwendung für die Berechnung der Erfassungszeiten (t_d) zu bestimmen. Der Schwellenwert muss Niveaus im linearen Teil der OD-Kurve oder einen OD-Wert von 0,05 bis 0,1 oberhalb des Hintergrund-OD-Werts des Mediums anstreben. [8] Für alle Verdünnungen je Niveau muss der gleiche OD-Schwellenwert verwendet werden.