

Mikrobiologische Milchuntersuchung
Bestimmung der Keimzahl
 Teil 5: Spatelverfahren

DIN
10192-5

ICS 07.100.30; 67.100.10

Deskriptoren: Lebensmittelprüfung, Milchuntersuchung, mikrobiologische Analyse, Keimzahlbestimmung, Spatelverfahren

Microbiological analysis of milk — Colony count — Part 5: Spatula method

Analyse microbiologique du lait — Comptage des colonies — Partie 5: Méthode avec spatule

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß "Mikrobiologische Milchuntersuchung", erarbeitet.

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm legt ein Routineverfahren zur Bestimmung der Keimzahl von Milch und Milchprodukten, Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Milchbasis sowie Speiseeis mittels Oberflächenverfahrens (Spatelverfahren) fest (siehe Anhang A). Vergleichsuntersuchungen haben eine gute Übereinstimmung mit den nach dem Referenzverfahren (DIN 10192-1) ermittelten Ergebnissen gezeigt.

2 Normative Verweisungen

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

DIN 10191-1

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Verfahren für Milch und flüssige Milcherzeugnisse

DIN 10191-2

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Verfahren für Milchpulver, Molkenpulver und Lactose

DIN 10191-3

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Verfahren für Milchfetterzeugnisse

DIN 10191-4

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Verfahren für Käse und Erzeugnisse aus Käse

DIN 10191-5

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Verfahren für Speiseeis und Speiseeispulver

E DIN 10191-6

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Vorbereitung der Proben — Teil 6: Verfahren für Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Milchbasis

DIN 10192-1

Mikrobiologische Milchuntersuchung — Bestimmung der Keimzahl — Referenzverfahren

DIN 10327

Milch und Milchprodukte — Probenahmetechnik

DIN 12339

Laborgeräte aus Glas — Petrischalen

DIN 12695

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

DIN 58945-1

Brutschränke für mikrobiologische Zwecke — Begriffe, Anforderungen, Anwendung

DIN 58946-2

Sterilisation — Dampf-Sterilisatoren — Groß-Sterilisatoren, Anforderungen

3 Begriff

Für die Anwendung dieser Norm gilt die folgende Definition:

3.1 Keimzahl

Unter Keimzahl wird die Anzahl koloniebildender Einheiten verstanden, die unter den in dieser Norm festgelegten Bedingungen makroskopisch zählbare Kolonien bilden (aus: DIN 10192-1 : 1984-04).

Fortsetzung Seite 2 bis 4

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

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

Von der flüssigen bzw. in den flüssigen Zustand versetzten Probe werden dezimale Verdünnungen hergestellt. Auf Agarplatten mit einem nicht selektiven Nährboden werden Teilmengen von jeweils 0,1 ml der Probe, der Anschüttelung oder der weiteren Verdünnungen ausgespatelt und 48 bzw. 72 h bei 30 °C bebrütet. Die Kolonien werden gezählt (Koloniezahl) und auf die Anzahl der koloniebildenden Einheiten je ml oder g der Probe umgerechnet (Keimzahl).

5 Nährboden und Chemikalien

Chemikalien und Nährbodenbestandteile müssen für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Trockennährböden müssen nach den Anweisungen des Herstellers zubereitet und verwendet werden. Das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und mindestens von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Bestandteile enthalten, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen.

5.1 Nährboden

Hefeextrakt-Trypton-Glucose-Agar mit Magermilchzusatz¹⁾

5.1.1 Zusammensetzung

- 2,5 g Hefeextrakt
- 5,0 g Casein, tryptisch verdaut (Trypton)
- 1,0 g Glucose
- 10 bis 15 g Agar, je nach Geliereigenschaft
- 1,0 g Magermilchpulver¹⁾, hemmstofffrei
- 1000 ml Wasser

ANMERKUNG: Bei der Verwendung eines Fertignährbodens ist darauf zu achten, daß dieser Magermilchpulver enthält. Falls ein Fertignährboden ohne Magermilchpulver verwendet wird (Hefeextrakt-Trypton-Glucose-Agar oder Plate-count-Agar), ist entsprechend Magermilchpulver zuzusetzen.¹⁾

5.1.2 Herstellung

Die Nährbodenbestandteile oder der Trockennährboden werden in Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxyd-Lösung, $w \approx 5\%$ ²⁾ oder Salzsäure, $w \approx 5\%$ so eingestellt, daß er nach dem Sterilisieren bei $\text{pH} = (7,0 \pm 0,1)$ liegt, bezogen auf eine Temperatur von etwa 45 °C. Der Nährboden wird in Kulturröhrchen oder -flaschen übergeführt und 15 min bei $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ sterilisiert.

Wenn der Nährboden nicht unmittelbar nach der Herstellung verwendet wird, wird er im Dunkeln und bei einer Temperatur zwischen 0 und 5 °C nicht länger als 3 Monate aufbewahrt.

5.1.3 Herstellung der Agarplatten

Teilvolumina von etwa 15 ml des Nährbodens werden in sterile Petrischalen nach 6.12 übergeführt und zum Verfestigen stehengelassen. Die fertigen Agarplatten sind bei einer Temperatur zwischen 0 und 5 °C aufzubewahren. Bei derartiger Lagerung sind die Agarplatten bis zu 7 Tage verwendbar. Unmittelbar vor der Verwendung werden die Agarplatten getrocknet.

ANMERKUNG: Dies kann für etwa 30 min bei zugswise 50 °C in einem Brutschrank erfolgen. Die Platten werden dafür mit der Agaroberfläche nach unten, schräg auf dem abgenommenen Deckel liegend gelagert.

5.2 Verdünnungsflüssigkeit

Als Verdünnungsflüssigkeit wird viertelstarke Ringer-Lösung oder Kochsalz-Pepton-Lösung nach DIN 10191-1 verwendet, sofern nach DIN 10191-4 und E DIN 10191-6 für bestimmte Produkte keine anderen Festlegungen getroffen sind.

6 Geräte und Hilfsmittel

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

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

6.1 Dampf-Sterilisator (Autoklav), einstellbar auf $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$, z. B. Dampf-Sterilisator nach DIN 58946-2

6.2 Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf mindestens 180°C

6.3 Dampftopf, sofern der Dampf-Sterilisator nicht als Dampftopf verwendet werden kann

6.4 Brutschrank, einstellbar auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$, z. B. Brutschrank nach DIN 58945-1

6.5 pH-Meßeinrichtung mit Temperaturkompensation

6.6 Wasserbad, einstellbar auf $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$

6.7 Lupe, 2- bis 4fache Vergrößerung

6.8 Lupe, mindestens 8fache Vergrößerung

6.9 Kulturröhrchen, Länge etwa 150 mm, Durchmesser etwa 15 mm, oder Flaschen mit einem Nennvolumen von 150 bis 250 ml, ausgestattet mit Stopfen oder anderem Verschuß

6.10 1-ml-Meßpipette, z. B. Meßpipette nach DIN 12695

6.11 Spatel; die Schnittkanten an den Enden müssen geglättet sein

6.12 Petrischalen, Durchmesser etwa 90 mm, z. B. Petrischalen nach DIN 12339

Wahlweise:

6.13 Gerät zum mechanischen Mischen von Flüssigkeiten in Kulturröhrchen, z. B. ein Reagenzglasschüttelgerät

¹⁾ Bei der Untersuchung von Speiseeis entfällt der Magermilchpulver-Zusatz.

²⁾ Massenanteil