



**Mikrobiologische Milchuntersuchung  
Nachweis von Hemmstoffen in Milch  
Referenzverfahren**

**ÖNORM  
DIN 10182-1**

Microbiological analysis of milk – Detection of inhibitory substances in milk – Reference method

**Ident (IDT) mit DIN 10182-1:1981**

Analyse microbiologique du lait – Détection des produits inhibiteurs dans le lait – Méthode de référence

**Die DIN 10182-1 hat den Status einer Österreichischen Norm.**

**Die ÖNORM DIN 10182-1 besteht aus** – diesem nationalen Deckblatt sowie  
– der DIN 10182-1:1981.

### Nationales Vorwort

Anstelle von DIN 10327 ist ÖNORM N 2500 anzuwenden.

Das neugegründete CEN/TC 302 "Milch und Milchprodukte – Probenahme- und Untersuchungsverfahren" hat als einen Punkt seines Arbeitsprogrammes "Antibiotika und Sulfonamide" festgelegt, jedoch wird erst 1995 mit der Vorlage eines ersten Normvorschlages gerechnet. Der FNA 205 "Lebensmitteluntersuchungsverfahren" hat daher beschlossen, bis zum Abschluß der Arbeiten bei CEN diese DIN zur Anwendung in Österreich zu empfehlen.

Nach dieser ÖNORM ist eine Kennzeichnung gemäß § 3 Normengesetz 1971 unzulässig.

Hinweise auf Normen ohne Ausgabedatum beziehen sich auf die jeweils geltende Fassung.

Fortsetzung DIN 10182-1 Seiten 1 bis 4

Fachnormenausschuß  
205  
Lebensmittelunter-  
suchungsverfahren



Mikrobiologische Milchuntersuchung  
**Nachweis von Hemmstoffen in Milch**  
 Referenzverfahren

**DIN**  
**10 182**  
 Teil 1

Microbiological analysis of milk; detection of inhibitory substances in milk; reference method  
 Analyse microbiologique du lait; détection des produits inhibiteurs dans le lait; méthode de référence

### 1 Zweck und Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Referenzverfahren zum Nachweis von Hemmstoffen in Rohmilch, Konsummilch und aus Milchpulver rekonstituierter Milch fest. Der verwendete Testkeim weist eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Penicillinen auf, wobei die Nachweisgrenze einer Natrium- bzw. Kalium-Benzyl-Penicillin-Konzentration von 0,0015 µg/ml ( $\pm 0,0025$  I.E./ml)<sup>1)</sup> entspricht. Eine chemische Konservierung schließt die Anwendung dieser Norm aus.

Anmerkung: Unter Penicillin im Sinne dieser Norm sind alle  $\beta$ -Lactamring-Antibiotika zu verstehen.

### 2 Begriff

Die Probe enthält Hemmstoffe, wenn sie nach dem hier festgelegten Verfahren eine klare Hemmzone hervorruft. Sofern die entsprechende mit Penicillinase ( $\beta$ -Lactamase) versetzte Probe keine oder eine deutlich kleinere Hemmzone hervorruft, enthielt sie Penicillin. Einige halbsynthetische Penicilline, wie z. B. Natriumcloxacillin, werden unter den gegebenen Bedingungen nicht durch Penicillinase inaktiviert und daher nicht als Penicillin erkannt.

### 3 Kurzbeschreibung

Auf die Oberfläche eines mit einer Kultur von *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* beimpften Agar-Nährbodens wird ein mit der zu untersuchenden Probe getränktes Blättchen gelegt. Beim Bebrüten vermehren sich die Mikroorganismen und bewirken eine Trübung des Agar-Nährbodens. Sind in der Probe Substanzen vorhanden, die das Wachstum der Keime verhindern, so bildet sich um das Blättchen eine klare Zone (Hemmzone). Die Größe der Hemmzone hängt u. a. von Konzentration und Art des Hemmstoffes in der Probe ab. Eine Hemmzone spricht dann für das Vorhandensein von Penicillin, wenn sich um das Blättchen, das mit der entsprechenden mit Penicillinase versetzten Probe getränkt wurde, keine oder eine deutlich kleinere Hemmzone zeigt.

### 4 Bezeichnung des Verfahrens

Bezeichnung für den Nachweis von Hemmstoffen in Milch nach dieser Norm (A 1):

Prüfung DIN 10 182 – A1

### 5 Nährböden, Chemikalien und Testorganismus

Chemikalien und Nährbodenbestandteile müssen für bakteriologische Zwecke geeignet sein. Trockennährböden müssen nach der Anweisung des Herstellers zubereitet werden und den Festlegungen dieser Norm entsprechen. Das verwendete Wasser muß entweder in Glas-

geräten destilliert oder entmineralisiert und von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Bestandteile enthalten, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen.

#### 5.1 Nährböden

##### 5.1.1 Nährboden für Stammkultur (Schrägagar)

Zusammensetzung:

2 g Hefeextrakt  
 5 g Fleischpepton, tryptisch verdaut  
 1 g Fleischextrakt  
 5 g Natriumchlorid  
 10 bis 15 g Agar, je nach Gelieereigenschaften  
 1000 ml Wasser

Herstellung:

Die einzelnen Bestandteile werden durch Erhitzen und Schütteln vollständig in Wasser gelöst. Der Nährboden wird 15 min lang bei  $(121 \pm 1)$  °C sterilisiert. Er muß nach dem Abkühlen auf etwa 45 °C einen pH-Wert von  $7,4 \pm 0,1$  haben.

##### 5.1.2 Nährboden zum Anzüchten der Gebrauchskultur (Kulturmedium)

Zusammensetzung:

1 g Hefeextrakt  
 2 g Fleischpepton, tryptisch verdaut  
 0,05 g Glucose  
 100 ml Wasser

Herstellung:

Die einzelnen Bestandteile werden durch Erhitzen und Schütteln vollständig in Wasser gelöst. Der Nährboden wird 15 min lang bei  $(121 \pm 1)$  °C sterilisiert. Er muß nach dem Abkühlen auf etwa 20 °C einen pH-Wert von  $8,0 \pm 0,1$  haben.

##### 5.1.3 Nährboden zum Nachweis von Hemmstoffen

Zusammensetzung:

2,5 g Hefeextrakt  
 5 g Caseinpepton, tryptisch verdaut  
 1 g Glucose  
 10 bis 15 g Agar, je nach Gelieereigenschaften  
 1000 ml Wasser

Herstellung:

Die einzelnen Bestandteile werden durch Erhitzen und Schütteln vollständig in Wasser gelöst. Der Nährboden wird 15 min lang bei  $(121 \pm 1)$  °C sterilisiert. Er muß nach dem Abkühlen auf etwa 45 °C einen pH-Wert von  $8,0 \pm 0,1$  haben.

<sup>1)</sup> Es ist z. Z. bei einigen Wirkstoffen noch üblich, die Konzentration statt in µg/ml in Einheiten je ml anzugeben. Gemeint sind damit die Internationalen Einheiten (I.E.) der durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) standardisierten Wertbestimmungen für die Wirkung von Pharmaka und anderen biologisch aktiven Substanzen.

Fortsetzung Seite 2 bis 4

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

## 5.2 Penicillin-Standardlösungen

**5.2.1** In einer verschließbaren, sterilen Flasche wird aus Natrium- oder Kalium-Benzyl-Penicillin und sterilem, destilliertem Wasser eine Penicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 60 µg/ml ( $\approx$  100 I.E./ml)<sup>1)</sup> hergestellt. Die Lösung darf nur am Tage der Herstellung verwendet werden und soll bei etwa 5 °C aufbewahrt werden.

**5.2.2** Aus 1,25 ml der Penicillin-Standardlösung nach Abschnitt 5.2.1 und 1000 ml sterilem, destilliertem Wasser wird eine verdünnte Penicillin-Standardlösung mit einer Konzentration von 0,075 µg/ml ( $\approx$  0,125 I.E./ml)<sup>1)</sup> hergestellt.

**5.2.3** Aus 1 ml der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Abschnitt 5.2.2 und 49 ml hemmstofffreiem Substrat nach Abschnitt 5.4 wird eine Lösung mit einer Penicillin-Konzentration von 0,0015 µg/ml ( $\approx$  0,0025 I.E./ml)<sup>1)</sup> hergestellt.

**5.2.4** Aus 2 ml der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Abschnitt 5.2.2 und 48 ml hemmstofffreiem Substrat nach Abschnitt 5.4 wird eine Lösung mit einer Penicillin-Konzentration von 0,003 µg/ml ( $\approx$  0,005 I.E./ml)<sup>1)</sup> hergestellt.

## 5.3 Penicillinase-Lösung

**5.3.1** Es wird soviel Penicillinase in sterilem, destilliertem Wasser gelöst, daß sich eine Konzentration von 1000 U/ml ergibt<sup>2) 3)</sup>. Diese Lösung, die vorzugsweise in Portionen abgefüllt werden sollte, darf höchstens 4 Wochen lang bei etwa 5 °C aufbewahrt werden.

Anmerkung: Für Penicillinase gibt es keine einheitlichen Festlegungen. Die Grundlage dieses Verfahrens ist, daß 10 U Penicillinase 0,6 µg ( $\approx$  1 I.E.) Penicillin inaktivieren. Bei Penicillinase mit unbekannter Aktivität ist es erforderlich festzustellen, ob diese Voraussetzung gegeben ist. Andernfalls muß die Konzentration der Penicillinase-Lösung entsprechend verändert werden.

**5.3.2** Für die Penicillinase-Kontrolle werden von der nach Abschnitt 8.1 vorbereiteten Probe 10 ml in ein geeignetes steriles Gefäß übergeführt. Anschließend werden 0,4 ml der Penicillinase-Lösung nach Abschnitt 5.3.1 hinzugefügt und gründlich vermischt.

## 5.4 Hemmstofffreies Substrat

Aus Magermilchpulver und sterilem, destilliertem Wasser wird, falls erforderlich mit Hilfe steriler Glasperlen, eine 10%ige<sup>4)</sup> Anschüttelung hergestellt. Das Magermilchpulver muß sich bei vorhergegangenen Untersuchungen nach dieser Norm als hemmstofffrei erwiesen haben.

## 5.5 Testorganismus

*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, Stamm C 953<sup>5)</sup>

### 5.5.1 Aufbewahrung des Teststammes

Der Teststamm wird auf dem Nährboden für die Stammkultur nach Abschnitt 5.1.1 aufbewahrt. Dieser Nährboden wird mit einer Öse der Testkultur beimpft und 48 h lang bei (55 ± 1) °C bebrütet. Nach Verschuß kann diese Kultur bis zu einem Monat lang bei etwa 5 °C aufbewahrt werden. Längere Aufbewahrung ist durch Lyophilisieren oder durch Lagern in flüssigem Stickstoff möglich.

### 5.5.2 Anzüchten der Gebrauchskultur

**5.5.2.1** 10 ml des Nährbodens zum Anzüchten der Gebrauchskultur nach Abschnitt 5.1.2 werden unter aseptischen Bedingungen in einen sterilen 150-ml-Erlenmeyer-Kolben gebracht.

**5.5.2.2** Der Nährboden wird mit einer Öse der Testkultur nach Abschnitt 5.5.1 beimpft und 16 bis 18 h lang bei

(55 ± 1) °C bebrütet. Spätestens 18 h nach Ende der Bebrütung werden 0,1 ml dieser flüssigen Kultur mit 10 ml frischen Nährbodens vermischt und erneut 16 bis 18 h lang bei (55 ± 1) °C bebrütet.

**5.5.2.3** Wahlweise kann der Nährboden nach Abschnitt 5.5.2.1 auch sofort mit 0,1 ml einer flüssigen Kultur nach Abschnitt 5.5.2.2 beimpft werden, sofern sichergestellt ist, daß diese nicht älter als 36 h ist und bei etwa 5 °C aufbewahrt wurde.

Anmerkung: Die flüssige Kultur nach Abschnitt 5.5.2.2 sollte nach einer Bebrütung von 48 h bei (55 ± 1) °C eine Keimzahl zwischen 5 und  $10 \times 10^7$ /ml aufweisen. Die Kultur sollte gleichmäßig getrübt sein. Bei Vorliegen von Flocken oder Sediment muß erneut eine flüssige Kultur von der Stammkultur angezüchtet werden.

### 5.5.3 Herstellung des Testsystems

**5.5.3.1** Zu 5 Teilen des auf (55 ± 1) °C abgekühlten Nährbodens zum Nachweis von Hemmstoffen nach Abschnitt 5.1.3 wird 1 Teil der frisch hergestellten flüssigen Kultur nach Abschnitt 5.5.2.2 hinzugefügt und in einer Flasche sorgfältig gemischt.

**5.5.3.2** In sterile, auf 55 °C erwärmte Petrischalen wird das Testmedium nach Abschnitt 5.5.3.1 in einer Schichtdicke von 0,8 bis 1,0 mm gegossen. Um eine Schichtdicke von 0,8 mm zu erhalten, sind bei Petrischalen mit einem inneren Durchmesser von 90 mm 5 ml Testmedium erforderlich.

**5.5.3.3** Zur Verfestigung des Agars werden die Petrischalen auf eine kalte, nivellierte Fläche gestellt. Nach Erstarren des Nährbodens werden die Petrischalen geschlossen und umgedreht, um die Kondensation auf der Oberfläche des Agars gering zu halten.

**5.5.3.4** Die so hergestellten Testplatten werden vorzugsweise am Tage der Herstellung verwendet. Sie können bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden, wenn sie sofort nach der Herstellung in einem verschlossenen Kunststoffbeutel bei etwa 5 °C aufbewahrt werden.

**5.5.3.5** Zur identitätsgerechten Untersuchung der Proben werden auf dem Boden der Testplatten Quadrate mit einer Seitenlänge von etwa 25 mm gezeichnet und mit laufenden Nummern versehen.

## 6 Geräte und Hilfsmittel

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

**6.1** Dampf-Sterilisator (Autoklav), einstellbar auf (121 ± 1) °C, z. B. Dampf-Sterilisator nach DIN 58946 Teil 2

<sup>1)</sup> Siehe Seite 1

<sup>2)</sup> Auf Empfehlung der International Union of Biochemistry (IUB)-Commission of Enzymes (CE) von 1972 wird die Enzymaktivität z. Z. noch in Internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U ist die Enzymaktivität, die bei einer Temperatur von 25 °C unter optimalen Bedingungen eine Substratmenge von 1 µmol je min umsetzt. Siehe dazu auch DIN 58937 Teil 5, Ausgabe Januar 1975, Abschnitt 6.6.

<sup>3)</sup> Eine 30fach höhere Penicillinase-Konzentration ermöglicht auch eine starke Inaktivierung von halbsynthetischen Penicillinen, wie Natriumcloxacillin.

<sup>4)</sup> Massengehalt

<sup>5)</sup> Erhältlich beim Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztliche Fakultät, Schellingstraße 10/III, 8000 München 40.

- 6.2** Dampftopf, sofern der Dampf-Sterilisator nicht als Dampftopf verwendet werden kann
- 6.3** Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf mindestens 180 °C
- 6.4** Brutschrank, einstellbar auf (55 ± 1) °C, z. B. nach DIN 58945 Teil 1
- 6.5** pH-Meßeinrichtung mit Temperaturkompensation
- 6.6** Wasserbad, einstellbar auf etwa 45 °C
- 6.7** Blättchen, Durchmesser 12 bis 13 mm, aus Filtrierpapier mit gleichbleibenden Eigenschaften. Die Saugfähigkeit der einzelnen Blättchen muß gleich sein (etwa 130 mg). Um sicherzustellen, daß die Blättchen keine Hemmstoffe abgeben, muß von jeder Charge eine Prüfung mit sterilem Wasser durchgeführt werden. Geeignet sind Blättchen aus reiner Zellulose (über 98 %  $\alpha$ -Zellulose). Der Aschegehalt soll unter 0,006 % liegen, der Kupfergehalt unter 1 mg/kg, der Eisengehalt unter 2 mg/kg. Geeignete Blättchen sind 0,88 mm dick, die flächenbezogene Masse beträgt etwa 44 g/m<sup>2</sup>.
- 6.8** Erlenmeyer-Kolben, Nennvolumen 150 ml, z. B. nach DIN 12385
- 6.9** Kulturröhrchen, ausgestattet mit geeignetem Stopfen oder Verschuß
- 6.10** Petrischalen, Durchmesser etwa 90 mm, z. B. nach DIN 12339
- 6.11** Platindraht-Öse
- 6.12** Pipetten, z. B. nach DIN 12690
- 6.13** Pinzetten

## 7 Probenahme

Nach DIN 10327

## 8 Durchführung

### 8.1 Vorbereitung der Probe

**8.1.1** Flüssige Milchproben sollen so bald wie möglich, spätestens jedoch innerhalb von 24 h untersucht werden. Die Proben dürfen für diese Zeit bei höchstens 5 °C aufbewahrt werden. Wenn die Proben nicht innerhalb dieser Zeit untersucht werden können, müssen sie bei Temperaturen zwischen -30 °C und -15 °C gelagert werden, um die Inaktivierung von Hemmstoffen so gering wie möglich zu halten. Derartig gelagerte Proben werden im Wasserbad bei etwa 45 °C aufgetaut und gründlich durchmischt.

**8.1.2** Bei Milchpulver-Proben wird eine 10%ige<sup>4)</sup> Anschüttelung in sterilem, destilliertem Wasser hergestellt, falls erforderlich mit Hilfe steriler Glasperlen.

### 8.2 Hemmstoffnachweis

**8.2.1** Ein Blättchen nach Abschnitt 6.7 wird mit Hilfe einer sauberen, trockenen Pinzette in die Probe getaucht. Milchüberschuß wird durch Abstreifen des Blättchens an der Probenflasche entfernt. Das Blättchen wird auf die Oberfläche des Agars nach Abschnitt 5.5.3.3 in das Zentrum eines markierten Quadrates gelegt und leicht mit der Pinzette angedrückt.

**8.2.2** Die im Abschnitt 8.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden mit einem anderen Blättchen in gleicher Weise durchgeführt.

**8.2.3** Die im Abschnitt 8.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden dreimal mit der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Abschnitt 5.2.3 (0,0015 µg/ml  $\cong$  0,0025 I.E./ml) in gleicher Weise durchgeführt.

**8.2.4** Die im Abschnitt 8.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden zweimal mit der verdünnten Penicillin-Standardlösung nach Abschnitt 5.2.4 (0,003 µg/ml  $\cong$  0,005 I.E./ml) in gleicher Weise durchgeführt.

**8.2.5** Die im Abschnitt 8.2.1 festgelegten Arbeitsgänge werden zweimal mit der Penicillinase-Kontrolle nach Abschnitt 5.3.2 in gleicher Weise durchgeführt.

**8.2.6** Alle 9 Blättchen werden in zufälliger Reihenfolge auf dem Agar verteilt. Die Lage der Blättchen ist zu protokollieren. Die Platten werden umgedreht und 2,5 bis 5 h lang bei (55 ± 1) °C bebrütet.

**8.2.7** Nach Bebrütung werden die Platten auf klare Hemmzonen um die Blättchen untersucht.

**8.2.8** Die durchschnittlichen Breiten der Hemmzonen um Proben, Penicillin-Kontrollen und Penicillinase-Kontrollen werden bestimmt.

## 9 Auswertung

**9.1** Die Hemmzonen um die Penicillin-Kontrollen nach Abschnitt 8.2.3 sollten gerade noch wahrnehmbar sein. Die Hemmzonen um die Penicillin-Kontrollen nach Abschnitt 8.2.4 sollten etwas größer sein.

**9.2** Hemmzonen, die 1 mm und schmaler sind, können auch von originären, in der Probe vorhandenen Substanzen gebildet werden.

**9.3** Wenn sich um die Blättchen mit den Penicillinase-Kontrollen nach Abschnitt 8.2.5 keine Hemmzonen, jedoch um die Blättchen mit den Proben nach Abschnitt 8.2.1 und Abschnitt 8.2.2 Hemmzonen, die größer als 1 mm sind, bilden, so entspricht die Konzentration der in der Probe enthaltenen Hemmstoffe einer Natrium- bzw. Kalium-Benzyl-Penicillin-Konzentration von mindestens 0,0015 µg/ml ( $\cong$  0,0025 I.E./ml).

**9.4** Wenn die mittlere Breite der Hemmzonen um die Penicillinase-Kontrollen gleich der der Proben ist, so enthalten diese Hemmstoffe, die mit der in diesem Verfahren festgelegten Penicillinase-Konzentration nicht identifiziert werden können.

**9.5** Wenn die Hemmzonen um die Penicillinase-Kontrollen eine kleinere mittlere Breite aufweisen als die um die Proben, so enthalten diese Penicillin zusammen mit anderen Hemmstoffen oder halbsynthetische Penicilline, die mit der in diesem Verfahren festgelegten Penicillinase-Konzentration nicht identifiziert werden können.

## 10 Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind unter Hinweis auf diese Norm mindestens anzugeben

- Art und Bezeichnung der Probe
- Art und Datum der Probenahme
- Eingangs- und Untersuchungsdatum
- Untersuchungsergebnisse (siehe Abschnitt 9)
- Gegebenenfalls Abweichungen von den Festlegungen dieser Norm.

<sup>4)</sup> Massengehalt

**Zitierte Normen**

DIN 10 327	Milch und Milchprodukte; Probenahmetechnik
DIN 12 339	Laborgeräte aus Glas; Petri-Schalen
DIN 12 385	Laborgeräte aus Glas; Erlenmeyerkolben, weithalsig
DIN 12 690	Laborgeräte aus Glas; Vollpipette mit einer Marke; Klasse A und Klasse B
DIN 58 937 Teil 5	Allgemeine Laboratoriumsmedizin; Regeln für die Ergebnismitteilung
DIN 58 945 Teil 1	Brutschränke für mikrobiologische Zwecke; Begriffe, Anforderungen, Anwendung
DIN 58 946 Teil 2	Sterilisation; Dampf-Sterilisatoren, Anforderungen