

Amtsblatt

der Europäischen Gemeinschaften

ISSN 0376-9453

L 93

34. Jahrgang

13. April 1991

Ausgabe
in deutscher Sprache

Rechtsvorschriften

Inhalt

I *Veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte*

.....

II *Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte*

Kommission

91/180/EWG:

- ★ **Entscheidung der Kommission vom 14. Februar 1991 zur Festlegung bestimmter Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch** 1

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 14. Februar 1991

zur Festlegung bestimmter Analyse- und Testverfahren für Rohmilch und wärmebehandelte Milch

(91/180/EWG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN
GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen
Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 85/397/EWG des Rates vom
5. August 1985 zur Regelung gesundheitlicher und tierseu-
chenrechtlicher Fragen im innergemeinschaftlichen Handel
mit wärmebehandelter Milch ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die
Richtlinie 89/662/EWG ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 10
Absatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß Artikel 10 Absatz 2 der Richtlinie 85/397/EWG legt
die Kommission Analysen- und Testverfahren zur Kontrolle
der Einhaltung bestimmter Gesundheitsnormen fest.

Es ist erforderlich, für Rohmilch Verfahren festzulegen, die
insbesondere eine Bestimmung des Keimgehalts, des Zell-
gehalts, des Gefrierpunkts und des Gehalts an Antibiotika
ermöglichen.

Für pasteurisierte Milch sind insbesondere Verfahren fest-
zulegen, mit deren Hilfe die Abwesenheit von Krankheits-
erregern, die Anzahl coliformer Keime, der Keimgehalt, die
Abwesenheit von Phosphatase, das Vorhandensein von
Peroxidase, die Abwesenheit von Antibiotika und der
Gefrierpunkt festgestellt werden können.

Bei sterilisierter und ultrahoherhitzter Milch müssen insbe-
sondere Verfahren zur Festlegung des Keimgehalts und der
Abwesenheit von Antibiotika festgelegt werden.

Aus technischen Gründen sind in einer ersten Stufe Referenz-
verfahren zu Analysen- und Testzwecken festzulegen, die der
Einhaltung bestimmter Normen dienen. Es sind vor allem die
Anwendungsbedingungen der routinemäßig angewandten
Analysen- und Testverfahren zu überprüfen. Bis das
Ergebnis dieser Prüfungen vorliegt, müssen die zuständi-
gen Behörden sicherstellen, daß nur Routineverfahren ange-
wendet werden, die der Einhaltung der in der Richtlinie
85/397/EWG genannten Normen dienen.

Die Festlegung von Referenzverfahren zu Analysen- und
Testzwecken umfaßt die Bestimmung von Analysemethoden
und Kriterien für deren Zuverlässigkeit, damit die
Ergebnisse einheitlich ausgewertet werden können.

Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen
entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinär-
ausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Folgende Analysen- und Testverfahren sind als Referenz-
verfahren für Rohmilch anzuwenden:

- Bestimmung des Gefrierpunkts,
- Bestimmung des Keimgehalts bei 30 °C,
- Bestimmung des Gehalts somatischer Zellen,
- Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden.

⁽¹⁾ ABl. Nr. L 226 vom 24. 8. 1985, S. 13.

⁽²⁾ ABl. Nr. L 395 vom 30. 12. 1989, S. 13.

Artikel 2

Folgende Analysen- und Testverfahren sind als Referenzverfahren für pasteurisierte Milch anzuwenden:

- Bestimmung des Gefrierpunkts,
- Bestimmung der Phosphataseaktivität,
- Bestimmung der Peroxidaseaktivität,
- Bestimmung des Keimgehalts bei 30 °C,
- Bestimmung des Keimgehalts bei 21 °C,
- Bestimmung der coliformen Keime — Koloniezählverfahren bei 30 °C,
- Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden,
- Bestimmung pathogener Keime.

Artikel 3

Folgende Analysen- und Testverfahren sind als Referenzverfahren für ultrahocherhitzte und sterilisierte Milche anzuwenden:

- Bestimmung des Gefrierpunkts,
- Bestimmung des Keimgehalts bei 30 °C,
- Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden.

Artikel 4

Die Durchführung der Referenzverfahren zu Analysen- und Testzwecken, die Beachtung der Kriterien für deren Zuverlässigkeit und das Sammeln von Proben unterliegen den in Anhang I festgelegten Vorschriften.

Artikel 5

Die in den Artikeln 1, 2 und 3 bezeichneten Analysen- und Testverfahren sind in Anhang II beschrieben.

Artikel 6

Diese Entscheidung wird vor dem 31. Dezember 1992 überprüft, um neuesten wissenschaftlich-technischen Erkenntnissen Rechnung zu tragen.

Artikel 7

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 14. Februar 1991

Für die Kommission
Ray MAC SHARRY
Mitglied der Kommission

ANHANG I

INHALT

	Seite
I. Allgemeine Bestimmungen	4
II. Entnahme von Proben roher und hitzebehandelter Milch	6

I. ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN

1. Einleitung

Dieser Teil enthält allgemeine Anforderungen an Reagenzien, Laboreinrichtungen, die Darstellung der Ergebnisse, die Zuverlässigkeit und die Analysenberichte. Diese allgemeinen Bestimmungen sind von den zuständigen Behörden der Mitgliedstaaten und den mit der Milchprobenahme und Probenanalyse betrauten Kontrolllabors einzuhalten.

2. Reagenzien

2.1. Wasser

2.1.1. Sofern nicht ausdrücklich anders spezifiziert, handelt es sich bei dem zu verwendenden Wasser um destilliertes Wasser, entionisiertes Wasser oder entmineralisiertes Wasser von mindestens gleichwertiger Reinheit. Wasser für mikrobiologische Zwecke muß frei von Stoffen sein, die geeignet sind, die Keimentwicklung unter Prüfbedingungen zu beeinträchtigen oder zu beeinflussen.

2.1.2. Sofern nicht näher bestimmt, handelt es sich bei den zu verwendenden „Lösungen“ oder „Verdünnungen“ um „wäßrige Lösungen“ bzw. „Verdünnungen mit Wasser“.

2.2. Chemikalien

Sofern nicht anders spezifiziert, müssen sämtliche verwendeten Chemikalien von anerkannter analysenreiner Qualität sein.

3. Laboreinrichtung

3.1. Angegebene Laboreinrichtung

Die für die amtlichen Referenzverfahren angegebene Laboreinrichtung umfaßt nur Spezialzubehör sowie Zubehör für eine besondere Verwendung.

3.2. Analysenwaage

Unter Analysenwaage ist eine Waage mit einer Ablesegenauigkeit von 0,1 mg zu verstehen.

4. Auswertung

4.1. Ergebnisse

Sofern nicht näher bestimmt, ist in den Untersuchungsbericht das arithmetische Mittel zweier Analysen aufzunehmen, welche die für das betreffende Verfahren festgelegten Anforderungen an die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit (vgl. 5.1) erfüllen. Sofern diese Verlässlichkeitsbedingungen nicht erfüllt sind, muß die Analyse nach Möglichkeit wiederholt werden, anderenfalls ist das Ergebnis ungültig.

4.2. Angabe in Prozenten

Sofern nicht anders spezifiziert, ist das Ergebnis in Massenanteilen der Probe anzugeben.

5. Zuverlässigkeitsbedingungen: Wiederholbarkeit (r) und Vergleichbarkeit (R)

5.1. Nachfolgend werden die Zuverlässigkeitsbedingungen für die einzelnen Verfahren definiert:

5.1.1. Die *Wiederholbarkeit* gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter denselben Bedingungen (derselbe Untersucher, dieselben Geräte, dasselbe Labor) unmittelbar nacheinander durchgeführt werden, den jeweils festgesetzten Wert (r) nicht überschreitet.

5.1.2. Die *Vergleichbarkeit* gilt als erfüllt, wenn die absolute Differenz zweier Untersuchungen, die nach demselben Verfahren mit identischem Untersuchungsmaterial unter verschiedenen Bedingungen (verschiedene Untersucher, verschiedene Geräte, verschiedene Labors) und/oder zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden, den jeweils festgesetzten Wert (R) nicht überschreitet.

5.1.3. Sofern nicht anders bestimmt, entsprechen die in den Arbeitsvorschriften für die jeweiligen Verfahren angegebenen Anforderungen an die Wiederholbarkeit (r) und die Vergleichbarkeit (R) dem 95%-Vertrauensbereich nach ISO 5725: 2. Ausgabe 1986. Sie errechnen sich aus den Ergebnissen anerkannter Ringversuche zur Bewertung der Verfahren. Allerdings wurden für eine Reihe von Verfahren keine Ringversuche durchgeführt. In solchen Fällen wurden die Werte für die Wiederholbarkeit (r) und die Vergleichbarkeit (R) geschätzt.

5.1.4. Die Ringversuche und Untersuchungen gemäß 5.1.3 sind entsprechend den internationalen Leitlinien zu planen und durchzuführen.

6. Untersuchungsbericht

In dem Untersuchungsbericht sind das verwendete Verfahren sowie die erzielten Ergebnisse anzugeben. Darüber hinaus sind weitere, in der Verfahrensbeschreibung nicht genannte oder zur Wahl gestellte sowie sonstige Einzelheiten anzugeben, die das erzielte Ergebnis beeinflusst haben könnten. Der Untersuchungsbericht enthält sämtliche Angaben, die für eine eindeutige Identifizierung der Probe erforderlich sind.

II. ENTNAHME VON PROBEN ROHER UND HITZEBEHANDELTER MILCH

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das amtliche Referenzverfahren für die Probenahme bei roher und hitzebehandelter Milch. Die Verfahren für die Probenahme, den Transport und die Aufbewahrung von Proben gelten für rohe Anlieferungsmilch sowie für rohe und hitzebehandelte Milch in Lager- und Transportbehältern.

Die Verfahren gemäß den Ziffern 2, 4.4, 5 und 6 gelten für die Probenahme hitzebehandelter Milch, die für den unmittelbaren Genuß bestimmt ist.

2. Allgemeines

Die Entnahme von Proben roher und hitzebehandelter Milch aus Milchkannen, Behältern usw. ist von sachkundigem Personal durchzuführen, das vor dem Einsatz eine geeignete Ausbildung erfahren hat.

Die zuständigen Behörden oder das Untersuchungslabor unterweisen das Probenahmepersonal in Fragen der Probenahmetechnik, damit eine repräsentative und der Charge angemessene Probenahme gewährleistet ist.

Die zuständigen Behörden oder das Untersuchungslabor unterweisen erforderlichenfalls das Probenahmepersonal in Fragen der Kennzeichnung der Proben, damit eine identitätsgerechte Untersuchung jeder Probe gesichert ist.

3. Probenahmegeräte

3.1. Allgemeines

Probenahmegeräte müssen aus rostfreiem Stahl oder einem anderen geeigneten Werkstoff mit ausreichender Festigkeit gefertigt sein und eine Bauweise anweisen, die zweckdienlich ist (Mischen, Entnahme usw.). Rührstäbe und Rührwerke zum Mischen von Flüssigkeiten in Großbehältern sollen großzügig ausgelegt sein, damit eine ausreichende Durchmischung des Erzeugnisses gewährleistet, jedoch kein Ranzigwerden zu befürchten ist. Schöpflöffel müssen einen stabilen Handgriff ausreichender Länge aufweisen, damit aus jeder beliebigen Tiefe des Tanks eine Probe gezogen werden kann. Schöpflöffel müssen ein Nennvolumen von mindestens 50 ml aufweisen.

Probengefäße und -verschlüsse sollen aus Glas, geeignetem Metall oder Kunststoff gefertigt sein.

Die für die Fertigung von Probenahmegeräten (einschließlich Gefäße und Verschlüsse) verwendeten Werkstoffe dürfen keine Veränderung der Probe bewirken, die sich auf die Untersuchungsergebnisse auswirken könnten. Probenahmegeräte und Probenbehälter müssen saubere, trockene, glatte und rißfreie Oberflächen sowie abgerundete Ecken aufweisen.

3.2. Probenahmegeräte für mikrobiologische Zwecke

Probenahmegeräte sowie Gefäße müssen außerdem steril sein.

Werden dieselben Probenahmegeräte für die aufeinanderfolgende Entnahme von Proben verwendet, sind sie gemäß den vom Untersuchungslabor oder der zuständigen Behörde festgelegten Vorschriften oder Anweisungen nach jeder Probenahme zu reinigen und zu sterilisieren, damit die Unversehrtheit aufeinanderfolgender Proben gewährleistet ist.

4. Probenahmetechnik

4.1. Allgemeines

Ungeachtet der Art der anstehenden Untersuchungen ist die Milch vor der Probenahme entweder von Hand oder maschinell gründlich zu durchmischen. Die Probe ist unmittelbar nach dem Durchmischen zu entnehmen, solange die Milch noch in Bewegung ist.

Werden aus Tanks mehrere Milchproben gleichzeitig für verschiedene Untersuchungen gezogen, so ist zuerst die Probe für mikrobiologische Zwecke zu entnehmen.

Das Probenvolumen muß für den Untersuchungszweck ausreichen. Der Nenninhalt der verwendeten Probengefäße ist so zu wählen, daß diese von der Probe nahezu vollständig gefüllt werden, damit eine geeignete Durchmischung des Inhalts vor der Untersuchung möglich ist, ohne daß die Gefahr besteht, daß die Proben während des Transports anbuttern.

4.2. *Probenahme von Hand*

4.2.1. Probenahme aus Milchkübeln und -kannen

Um eine schnelle Durchmischung zu erzielen, wird ein Rührstab im Kübel bzw. in der Kanne auf- und abbewegt, wobei darauf zu achten ist, daß die Milch ausreichend durchmischt wird und nicht am Kannenhals anrahmt. Anschließend wird gemäß Ziffer 4.2.4 eine für die gesamte Partie repräsentative Probe entnommen.

4.2.2. Probenahme aus Hoftanks oder Fässern mit Kühleinrichtung

Die Milch wird solange maschinell oder von Hand gerührt, bis sie ausreichend homogenisiert ist.

Falls das Volumen der Milchprobe weniger als 15 % des Tankinhalts ausmacht, ist die Milch von Hand zu rühren.

4.2.3. Probenahme aus einer Waagschale

Die Milch muß beim Eingießen in eine Waagschale unbedingt ausreichend durchmischt sein. Um eine gleichmäßige Verteilung des Fetts zu gewährleisten, kann ein zusätzliches Rühren von Hand oder maschinell erforderlich sein. Übersteigt das Volumen der zur Probeentnahme anstehenden Warensendung das Fassungsvermögen der Waagschale, so ist gemäß Ziffer 4.2.4 eine für die ganze Sendung repräsentative Probe zu entnehmen.

4.2.4. Sammelproblem

Ist die zur Probenahme anstehende Milch auf mehrere Tanks aufgeteilt, wird aus jedem Tank eine repräsentative Menge entnommen und die Menge jeder einzelnen Probe protokolliert. Sofern die Proben aus jedem Tank nicht einzeln untersucht werden, sind diese repräsentativen Proben im Verhältnis zu ihrem Anteil am Inhalt des Tanks, aus dem sie entnommen wurden, miteinander zu vermischen. Nach dem Durchmischen wird von dieser Sammelmilchprobe die Probenahme durchgeführt.

4.2.5. Probeentnahme aus Großbehältern — Lagertanks, Tankwagen (Schiene und Straße)

4.2.5.1. Vor der Probenahme wird die Milch nach einem geeigneten Verfahren durchmischt.

Bei Großbehältern, Lagertanks und Tankwagen sollte der Inhalt maschinell (vgl. 4.2.5.2) durchgerührt werden.

Das Durchmischen der Milch soll der Standzeit entsprechend gründlich durchgeführt werden. Das verwendete Rührverfahren muß unter allen Umständen für die Zwecke der anstehenden Untersuchungen erprobt sein. Die gründliche Durchmischung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse von Proben aus verschiedenen Teillieferungen oder von Proben, die in bestimmten Abständen bei der Tankentladung aus dem Auslaufhahn gezogen werden. Ein Verfahren zum Rühren von Milch gilt dann als effizient, wenn die Differenz des Fettgehalts von zwei unter denselben Bedingungen gezogenen Proben weniger als 0,1 % beträgt.

Bei Großbehältern mit Bodenauslaufhahn kann es vorkommen, daß sich am Auslaß eine geringe Milchmenge befindet, die auch nach dem Durchmischen für die Gesamtlieferung nicht repräsentativ ist. In solchen Fällen werden Proben vorzugsweise durch ein Mannloch entnommen. Werden Proben am Auslaufhahn entnommen, so ist zunächst eine ausreichende Milchmenge abzulassen, damit gewährleistet ist, daß die Proben für die Gesamtlieferung repräsentativ sind.

4.2.5.2. Für das Durchmischen des Inhalts von Großbehältern oder von Lagertanks und Tankwagen können verwendet werden:

- Einbaurührwerke mit Elektromotor;
- Propeller- oder Schaufelrührwerke mit Elektromotor, die durch das Mannloch in die Milch eingeführt werden;
- im Fall von Tankwagen (Schiene oder Straße) durch Umwälzen der Milch mit Hilfe des in das Mannloch eingeführten und an die Förderpumpe des Tankwagens angeschlossenen Umpumpschlauchs;
- saubere gefilterte Druckluft; in diesem Fall soll beim Einblasen mit geringstmöglichem Luftdruck und -volumen gearbeitet werden, um ein Ranzigwerden zu vermeiden.

4.3. *Automatische oder halbautomatische Probenahme*

Automatische oder halbautomatische Probenahmegeräte zur Gewinnung von Proben roher Anlieferungsmilch können entsprechend den vom Untersuchungslabor oder der zuständigen Behörde festgelegten Vorschriften verwendet werden.

Derartige Ausrüstungen sollen vor und während ihrer Verwendung regelmäßig geeigneten Prüfungen unterzogen werden, wie sie die zuständige Behörde vorschreibt. Die Probenahmeverfahren müssen in folgender Hinsicht auf ihre Eignung hin geprüft werden:

- Mindestprobenvolumen für eine einwandfreie Probenahme;
- Verschleppungsfehler (bezogen auf das Mindestprobenvolumen);
- Eignung zur Gewinnung einer repräsentativen Probe der Charge nach gründlicher Durchmischung.

Für den Fall der Verwendung automatischer oder halbautomatischer Probenahmegeräte können die zuständigen einzelstaatlichen Behörden folgendes vorschreiben:

- Mindestmilchmenge, von der Proben entnommen werden müssen;
- Mindestprobenvolumen;
- höchstzulässige „carry over“ (Verschleppung);
- auszuführende Untersuchungen bzw. zu treffende Vorkehrungen.

4.4. *Entnahme von Proben hitzebehandelter Milch für den unmittelbaren Genuß in Einzelhandelspackungen*

Als Proben hitzebehandelter Milch für den unmittelbaren Genuß in Einzelhandelspackungen werden die ganzen versiegelten Packungen herangezogen. Nach Möglichkeit sind die Proben unmittelbar nach der Verarbeitung aus der Verpackungsanlage bzw. dem Kühllager im Bearbeitungsbetrieb zu entnehmen, bei pasteurisierter Milch am Tag der Verarbeitung.

Es werden von jeder Kategorie hitzebehandelter Milch (pasteurisierte, ultrahocherhitzte und sterilisierte Milch) Proben in einem Umfang entnommen, der den durchzuführenden Untersuchungen sowie den vom Untersuchungslabor oder einer anderen zuständigen Behörde festgelegten Vorschriften entspricht.

5. **Kennzeichnung der Probe**

Die Probe wird entsprechend den Vorschriften der zuständigen Behörde oder des Untersuchungslabors zur Gewährleistung der identitätsgerechten Untersuchung der Probe (vgl. 2) mit einer Kennzeichnungsnummer versehen, damit jede Verwechslung ausgeschlossen ist.

6. **Transport und Aufbewahrung von Proben**

Die Vorschriften für die Bedingungen der Beförderung, Lagerung sowie den Zeitabstand zwischen Probenahme und Milchanalyse werden vom Prüflabor für die einzelnen Milcharten und zu verwendenden Analyseverfahren ausgearbeitet. Diese Vorschriften werden im Einvernehmen mit der zuständigen einzelstaatlichen Behörde festgelegt.

Diese Vorschriften sollen folgende Einzelheiten umfassen:

- Bei Transport und Lagerung sind Vorkehrungen gegen Fremdgeruch und direkte Sonnenbestrahlung zu treffen. Bei Verwendung eines durchsichtigen Probengefäßes ist dieses im Dunkeln aufzubewahren.
- Rohmilchproben für mikrobiologische Analysen sind bei einer Temperatur von 0 °C bis 4 °C zu befördern und aufzubewahren. Zwischen Probenahme und Analyse soll möglichst wenig Zeit vergehen, allenfalls 36 Stunden. Die zuständige Behörde kann zulassen, daß die Proben bei einer Temperatur von 0 °C bis 6 °C höchstens 24 Stunden lang aufbewahrt werden.
- Proben pasteurisierter Milch für mikrobiologische Analysen sind bei einer Temperatur von 0 °C bis 4 °C zu befördern und aufzubewahren. Zwischen Probenahme und Analyse soll möglichst wenig Zeit vergehen, allenfalls 24 Stunden.
- Proben anderer Milch als Rohmilch und pasteurisierter Milch für mikrobiologische Analysen sind im Labor gekühlt aufzubewahren. Zwischen Probenahme und Analyse soll möglichst wenig Zeit vergehen.

Besondere Vorkehrungen bei bestimmten Analysen sind unter den entsprechenden Arbeitsvorschriften spezifiziert.

ANHANG II

INHALT

	<i>Seite</i>
I. Bestimmung des Gefrierpunkts	10
II. Bestimmung der Phosphataseaktivität	16
III. Bestimmung der Peroxidaseaktivität	19
IV. Bestimmung des Keimgehalts bei 30 °C	20
V. Bestimmung des Keimgehalts bei 21 °C	25
VI. Bestimmung der coliformen Keime — Koloniezählverfahren bei 30 °C	29
VII. Bestimmung des Gehalts an somatischen Zellen	33
VIII. Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden	39
IX. Bestimmung pathogener Keime	48

I. BESTIMMUNG DES GEFRIERPUNKTS

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung des Gefrierpunkts roher, pasteurisierter, ultrahoherhitzter und sterilisierter Vollmilch, teilentrahmter Milch und Magermilch mit Hilfe eines Meßgeräts (Thermistor-Kryoskop) mit thermostatgesteuertem und elektrisch gekühltem Bad sowie einer Thermistorsonde anstelle eines Quecksilberthermometers.

Es gibt zwei Meßgerättypen. Beim ersten handelt es sich um ein Instrument, das den Plateauwert der Gefrierpunktkurve als Gefrierpunktmaximum abliest, wohingegen das zweite aus Wirtschaftlichkeitsgründen die Ablesung nach Ablauf einer bestimmten Zeit nach Einsetzen des Gefrierens vornimmt. Da sich die Gefrierpunktkurven der einzelnen Milcharten sowie diejenigen von Milch und Standardlösungen unterscheiden können, ist bei diesem Referenzverfahren ein Plateauwert-Suchgerät zu verwenden. Festzeitgeräte können für routinemäßige Reihenuntersuchungen verwendet werden.

Der Gefrierpunkt kann zur Bestimmung des Fremdwassergehalts der Milch verwendet werden, sofern der Säuregrad der Probe den Wert 0,18 g Milchsäure/100 ml nicht überschreitet (vgl. 7.4).

2. Begriffsbestimmung

Gefrierpunkt der Milch: Darunter ist der gemäß den beschriebenen Verfahren gemessene Wert in Grad Celsius (°C) zu verstehen.

3. Kurzbeschreibung

Eine Milchprobeneinwaage wird bis unter den Gefrierpunkt auf die geeignete Temperatur unterkühlt, für die das Instrument ausgelegt ist, wobei das Gefrieren durch mechanische Vibration ausgelöst wird. Dadurch steigt die Temperatur rasch auf einen Plateauwert an, der dem Gefrierpunkt der Probe entspricht.

Das Gerät wird einjustiert, indem es unter den gleichen Bedingungen wie für Milchproben auf die richtige Ablesung für 2 Standardlösungen eingestellt wird. Unter diesen Voraussetzungen entspricht der Plateauwert dem Gefrierpunkt für Milch in °C.

4. Geräte und Hilfsmittel

Übliches Laborzubehör, insbesondere:

4.1. Thermistor-Kryoskop

Das Thermistor-Kryoskop besteht aus einer thermostatisch gesteuerten Kühleinrichtung, einer Thermistorsonde (Halbleiterwiderstandsthermometer) mit zugehörigem Schaltkreis und einem Galvanometer oder anderem Anzeigegerät, einem Probenrührer und einer Vorrichtung zum Auslösen des Gefrierens sowie Proberöhrchen.

4.1.1. Kühlbad

Es können zwei Arten von Kühlbädern verwendet werden.

4.1.1.1. Immersionsbad

Dabei handelt es sich um ein gut isoliertes Bad mit einer Kältemischung, die durchgerührt wird, damit der Temperaturunterschied zwischen zwei Punkten in der Flüssigkeit höchstens 0,2 °C beträgt. Die Temperatur der Kältemischung darf von dem vom Hersteller angegebenen Nennwert um höchstens $\pm 0,5$ °C abweichen.

Die Kältemischung des Kühlbades muß unbedingt konstant gehalten werden. Die gesamte Fläche des Proberohrs unter der Volumenmarke muß von der Kältemischung bedeckt sein.

4.1.1.2. Zirkulationsbad

Bei diesem Gerät zirkuliert eine geeignete Kältemischung ständig um das Proberöhrchen. Die Temperatur der Kältemischung darf von dem vom Hersteller angegebenen Wert um höchstens $\pm 0,5$ °C abweichen.

Als Kältemischung eignet sich eine wäßrige 1,2-Ethandiol-(Ethylenglykol)-Lösung, mit einem Volumenanteil von 33 %.

4.1.2. Thermistor mit zugehörigem Schaltkreis

Der Thermistor besteht aus einem Glasmaßfühler mit einem Durchmesser von höchstens 1,80 ± 0,2 mm und mit einem Kugeldurchmesser von höchstens 0,31 mm. Der Thermistor soll über eine Verzögerungszeitkonstante von weniger als 2 Sekunden und einen hohen β -Wert (vgl. Anmerkung) verfügen. Der Meßfühler soll hinsichtlich Arbeitsspannung, Strom und Verlustfaktor so ausgelegt sein, daß die Thermistortemperatur bei -0,512 °C um höchstens 0,0005 °C über die Umgebungstemperatur ansteigt. Die höchstzulässige Toleranz des Widerstands soll ± 5% betragen.

Befindet sich der Meßfühler im Kryoskop in Arbeitslage, so muß sich die Spitze der Glaskugel in der Achse des Probengefäßes und auf Höhe 44,6 ± 0,1 mm unter dem oberen Ende des Rohrs (vgl. Abbildung auf Seite 15) befinden. Zur Einstellung des Meßfühlers in diese Lage ist eine Lehre zu verwenden.

Anmerkung:

Der β -Wert ist ein Maß für das Widerstands-Temperaturverhalten des Thermistors entsprechend der Formel:

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \frac{\beta}{T^2},$$

hierin bedeuten:

T = Temperatur in K,

R = Widerstand in Ohm bei der Temperatur T,

$$-\frac{dR}{dT} \times \frac{1}{R} = \text{Temperaturkoeffizient},$$

β = werkstoffabhängige Konstante; in der Praxis wird allgemein ein Wert von über 3 000 empfohlen.

4.1.3. Meß- und Ableseeinrichtung

4.1.3.1. Meßprinzip

Das verwendete Gerät soll den ersten Plateauwert der Gefrierpunktkurve ermitteln. Als Plateauwert gilt der Teil der Kurve, bei der die Temperatur in den Grenzen von ± 0,002 °C mindestens 20 Sekunden lang konstant bleibt.

4.1.3.2. Manuelle Arbeitsweise

Der Thermistorwiderstand wird durch Abgleich einer Wheatstone-Brücke oder einem ähnlichen Gerät geeicht; dabei sind die qualitätsbeständigsten Widerstände mit einer Toleranz von höchstens ± 10% und einem Temperaturkoeffizienten von höchstens 2×10^{-5} °C zu verwenden.

Der variable Abgleichswiderstand darf über den gesamten Bereich um höchstens 0,3% des Höchstwerts von der Linearität abweichen.

Zur Einjustierung müssen Vorrichtungen zur Einstellung der Widerstände vorhanden sein.

Die Meßskala soll in Grade von höchstens 0,001 °C eingeteilt sein.

4.1.3.3. Automatische Arbeitsweise

Die Ableseeinrichtung soll über einen Meßbereich von 0 bis -1 °C eine Ablesegenauigkeit von mindestens 0,001 °C gestatten.

Die Meßgenauigkeit der Ableseeinrichtung und des zugehörigen Schaltkreises soll so hoch sein, daß bei aufeinanderfolgenden Messungen derselben Temperatur auftretende Schwankungen höchstens 0,001 °C betragen.

Der Meßkreis muß eine solche Linearität aufweisen, daß sich bei fachgerechtem Einsatz des Geräts an keiner Stelle des Meßbereichs von -0,400 bis -0,600 °C ein Fehler von über ± 0,001 °C ergibt.

4.1.4. Probenrührer

Zum Umrühren der Probeneinwaage ist ein Draht aus einem milchneutralen Metall mit einem Durchmesser von 1 bis 1,5 mm zu verwenden.

Der Probenrührer soll hinsichtlich seiner Auslenkung einjustiert und so eingebaut werden, daß sein unteres Ende mit der Spitze der Thermistorsonde gleichauf liegt. Eine Abweichung von etwa 1,5 mm darüber oder darunter ist zulässig.

Der Probenrührer soll in horizontale Schwingung mit ausreichender, vom Hersteller anzugebender Amplitude (mindestens ± 1,5 mm) versetzt werden, damit die Temperatur in der Probeneinwaage während der Bestimmung konstant bleibt. Bei normalem Rührbetrieb darf der Probenrührer niemals an die Thermistorsonde oder die Gefäßwandung anstoßen.

- 4.1.5. **Einrichtung zum Auslösen des Gefrierens**
Dabei kann es sich um eine Einrichtung handeln, bei deren Betrieb das Gefrieren der Probe sofort ausgelöst wird, so daß die Temperatur der Probeneinwaage bis auf den Gefrierpunkt ansteigt. Dazu kann der Probenrührer verwendet werden; ein Verfahren besteht darin, die Schwingungsamplitude für ein bis zwei Sekunden so zu erhöhen, daß der Rührer an der Wandung des Probengefäßes anschlägt.
- 4.1.6. **Probenröhrchen**
Die Probenröhrchen (vgl. Abbildung auf Seite 15) müssen aus Glas bestehen, eine Höhe von $50,8 \pm 0,1$ mm, einen Außendurchmesser von $16,0 \pm 0,1$ mm und einen Innendurchmesser von $13,5 \pm 0,1$ mm aufweisen. Die Wandstärke der Röhrchen darf um höchstens 0,1 mm schwanken.
Die Röhrchen müssen in einer Höhe von 29,8 mm unter dem oberen Ende (21 mm über dem Boden der Röhrchen) eine Volumenmarke für ein Probenvolumen von $2,5 \pm 0,1$ ml aufweisen.
- 4.1.7. **Stromanschluß**
Die Anschlußspannung muß entweder innerhalb oder außerhalb des Geräts so stabilisiert werden, daß bei Schwankungen der Anschlußspannung um $\pm 6\%$ die Schwankung höchstens $\pm 1\%$ der Nennspannung beträgt.
- 4.2. **Analysenwaage**
- 4.3. **Meßbecher mit Eichstrich**, 1 000 ml Nenninhalt, Kategorie A.
- 4.4. **Wärmeschrank**, gut durchlüftet, für eine konstante Temperatur von 130 ± 1 °C
oder
Elektroofen, durchlüftet, für eine konstante Temperatur von 300 ± 25 °C.
- 4.5. **Exsikkator**
5. **Reagenzien**
- 5.1. *In einer Apparatur aus Borsilikatglas destilliertes Wasser*, kurz vor Gebrauch abgekocht und in einem Gefäß mit CO₂-Absorptionsrohr auf 20 ± 2 °C abgekühlt.
- 5.2. **Natriumchlorid**, analysenrein, fein gemahlen, entweder 5 Stunden im Ofen bei 300 ± 25 °C oder 24 Stunden im Wärmeschrank bei 130 ± 1 °C getrocknet und in einem funktionstüchtigen Exsikkator auf Raumtemperatur gekühlt.
- 5.3. **Ansetzen der Standardlösung**
Die entsprechende Menge (vgl. nachstehende Tabelle) getrocknetes Natriumchlorid (vgl. 5.2) wird in ein Wäageglas eingewogen, in destilliertem Wasser (vgl. 5.1) gelöst, restlos in einen 1 000-ml-Meßkolben mit 1 000-ml-Eichstrich übergeführt und mit Wasser bei 20 ± 2 °C bis zum Eichstrich aufgefüllt.
Die Lösungen sind in gut verschließbaren Polyethylenflaschen mit einem Nennvolumen von höchstens 250 ml bei 5 °C höchstens zwei Monate aufzubewahren.

Gefrierpunkt von Natriumchloridlösungen bei 20 °C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Vor Verwendung einer Standardlösung wird das Gefäß zunächst vorsichtig gestürzt und mehrmals umgeschwenkt, damit der Inhalt gründlich durchmischt wird. Eine Standardlösung darf niemals so geschüttelt werden, daß sie Luft aufnimmt.

Proben einer Standardlösung müssen durch Ausgießen aus der Flasche in ein sauberes, trockenes Becherglas entnommen werden; Pipetten dürfen für diesen Zweck nicht verwendet werden.

Lösungen aus zu weniger als einem Viertel gefüllten Flaschen sowie Lösungen, die nicht mit einem Fungizid (z. B. Thiomersal-Lösung 10 g/l) behandelt wurden und älter als zwei Monate sind, dürfen nicht verwendet werden.

6. Einjustierung des Thermistor-Kryoskops

Das Thermistor-Kryoskop muß so eingesetzt werden, daß die Temperatur der Umgebungsluft höchstens 1 °C von der Temperatur, bei der die Einjustierung durchgeführt wurde, abweicht. Das Kryoskop darf keiner direkten Sonnenbestrahlung, Zugluft oder Raumtemperaturen von über 26—27 °C ausgesetzt werden.

Das Kryoskop ist entsprechend den Herstelleranweisungen in Betriebsbereitschaft zu setzen und mindestens zwölf Stunden vor dem Einjustieren einzuschalten. Einstellung des Meßfühlers, Schwingungsamplitude des Probenrührers und Temperatur der Kühlmischung sind zu prüfen.

Es sind zwei Standardlösungen (vgl. Tabelle auf Seite 12) auszuwählen, deren Gefrierpunkt knapp unter bzw. knapp über dem Erwartungswert des Gefrierpunkts der zu untersuchenden Milchprobe liegt. Die Gefrierpunktdifferenz der beiden Lösungen sollte nach Möglichkeit den Wert -0,100 °C nicht übersteigen.

(Bei einigen Ausführungen gängiger Thermistor-Kryoskope ist der mit dem Thermistor verschaltete Schaltkreis für einen Abgleich auf einen bestimmten Gefrierpunktwert des Gerätemeßbereichs ausgelegt. In diesem Fall wird das Einjustieren dadurch erleichtert, daß eine Standardlösung mit diesem Gefrierpunkt als eine der Eichlösungen verwendet wird; der Hersteller sollte diesen Wert angeben.)

2,5 ± 0,1 ml der Standardlösung werden in ein sauberes, trockenes Probenröhrchen einpipettiert und mit dem Kryoskop gemessen.

Anmerkung:

Die beim Einjustieren verwendeten Proberöhrchen müssen aus demselben Glas gefertigt sein und zur selben Zeit mit entmineralisiertem Wasser gewaschen und gespült werden, wie die zur Untersuchung der Milchproben verwendeten Röhrchen. Die Temperatur der Standardlösungen muß etwa die gleiche sein wie die der Milchproben.

Das Kryoskop wird entsprechend den Herstelleranweisungen solange nachgeeicht, bis es den Gefrierpunkt der Standardlösung korrekt anzeigt. Dieses Verfahren ist mit der anderen Standardlösung zu wiederholen und abwechselnd solange durchzuführen, bis aufeinanderfolgende Ableesungen für jede Lösung ohne vorherige Anpassungen der Eichmessungen den korrekten Wert des Gefrierpunkts jeder Lösung ergeben. Das Kryoskop ist dann betriebsbereit und zeigt den Gefrierpunkt der Milchprobe sofort an, ohne daß eine Korrektur notwendig ist.

7. Vorbereitung der Probe für die Untersuchung

- 7.1. Falls erforderlich, werden Proben bei einer Temperatur zwischen 0 und 5 °C aufbewahrt.
- 7.2. Mit dem bloßen Auge erkennbare Fremdkörper bzw. festes Butterfett werden aus der Probe erforderlichenfalls durch Abfiltrieren in ein sauberes, trockenes Gefäß entfernt, und die Probe wird vorsichtig durchmischt. Das verwendete Filter soll milchneutral sein und bei Laboratemperatur eingesetzt werden können.
- 7.3. Die Milch kann bei Lagertemperatur (zwischen 0 und 5 °C) untersucht werden oder wird unmittelbar vor Beginn der Untersuchung auf Laboratemperatur angewärmt. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß Standardlösungen und Milchproben bei der Aufarbeitung dieselbe Temperatur haben.
- 7.4. Bei der Gefrierpunktuntersuchung ist gleichzeitig der titrierbare Säuregrad der Milch so genau wie möglich zu bestimmen. Proben mit einem Säuregrad von mehr als 0,18 g Milchsäure je 100 ml Milch können nicht untersucht werden.
- 7.5. Ultrahocherhitzte und sterilisierte Milch vor der Untersuchung mindestens 20 Minuten in einem offenen Behälter stehen lassen.

8. Verfahren**8.1. Betriebsbereitschaftskontrolle**

Es wird geprüft, ob das Kühlmittel den vom Hersteller vorgeschriebenen Pegel erreicht, die entsprechende Temperatur aufweist und ob der Meßfühler sich gegebenenfalls in dem leeren Proberohr im Probenschacht befindet. Das Thermometer wird eingeschaltet, um zu prüfen, ob das Kühlmittel vorschriftsmäßig gerührt bzw. umgewälzt wird. Zwölf Stunden nach dem Einschalten des Thermometers wird die Temperatur des Kühlmittels sowie die Einstellung und die Schwingungsamplitude des Rührers geprüft.

8.2. Regelmäßige Überprüfung der Justierung

Vor jeder Untersuchung wird der Gefrierpunkt einer Standardnatriumchloridlösung (z. B. die Lösung mit einem Gefrierpunkt von $-0,512\text{ }^{\circ}\text{C}$) so lange gemessen, bis die Werte zweier aufeinanderfolgender Bestimmungen höchstens $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$ voneinander abweichen. Weichen diese Werte vom Gefrierpunkt der Standardlösung im Mittel um mehr als $0,002\text{ }^{\circ}\text{C}$ ab, so ist das Kryoskop gemäß Ziffer 6 nachzueichen.

Befindet sich das Kryoskop im Dauereinsatz, sind die regelmäßigen Überprüfungen mindestens einmal pro Stunde durchzuführen. Dabei ist nach Herstelleranweisung zu verfahren.

8.3. Bestimmung des Gefrierpunkts von Milch

Das Gefäß mit der Milchprobe wird mehrmals vorsichtig gestürzt und umgeschwenkt, damit der Inhalt gut durchmischt wird. Die Probe darf niemals so heftig geschüttelt werden, daß sie Luft aufnimmt.

$2,5 \pm 0,1$ ml Milch werden in ein sauberes, trockenes Probenröhrchen einpipettiert und ein etwaiger Überschuß abpipettiert. Meßsonde und Probenrührer müssen unbedingt sauber und trocken sein und bei Bedarf mit einem sauberen, weichen und nichtfusselnden Tuch sorgfältig von unten nach oben abgewischt werden.

Das Probenrohr wird in das nach Herstelleranweisungen justierte Kryoskop eingeführt. Die Milch wird gekühlt und das Gefrieren bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur mit einer Toleranz von $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgelöst.

(Bei manchen automatischen Geräten ist diese Temperatur auf der Digitalanzeige ablesbar; bei manuellen Geräten wird die erforderliche Präzision dadurch erzielt, daß das Gefrieren genau dann ausgelöst wird, wenn der Zeiger des Galvanometers oder der Haarstrich (Anriß) genau auf die entsprechende Markierung zu liegen kommt.)

Wird das Gefrieren aus irgendeinem Grund vor oder nach Erreichen des betreffenden Temperaturbereichs ausgelöst, wird die Untersuchung abgebrochen und mit einer anderen Milchproben-einwaage wiederholt. Gefriert die Doppelprobe ebenfalls vor Erreichen der bestimmten Temperatur, so wird eine weitere Milchprobeneinwaage auf $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ angewärmt und fünf Minuten lang auf dieser Temperatur gehalten, damit kristallines Fett schmelzen kann.

Anschließend wird wieder auf die Analysentemperatur abgekühlt und sofort untersucht. Nach Auslösen des Gefrierens steigt die Temperatur der Milch rasch auf einen sich dann offenbar eine Zeitlang einstellenden Wert an, um anschließend wieder abzufallen. Die in dieser Phase erreichte Höchsttemperatur entspricht dem Gefrierpunkt und wird protokolliert.

Anmerkung:

Die Dauer der Temperaturkonstanz sowie die Spanne zwischen dem Auslösen des Gefrierens und dem Erreichen der Höchsttemperatur schwankt von Probe zu Probe und ist bei Wasser und der Natriumchlorid-Standardlösung erheblich kürzer als bei Milch. Es kommt unbedingt darauf an, die Höchsttemperatur zu protokollieren.

Wenn die Messung störungsfrei zu Ende geführt worden ist, wird das Probenröhrchen entfernt; anschließend werden Thermistorsonde und Probenrührer mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem sauberen, weichen und nichtfusselnden Tuch von unten nach oben abgewischt. Danach wird mit der zweiten Probe der gleichen Milch eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Ist die Differenz der ermittelten Gefrierpunkte größer als der Wert der Wiederholbarkeit ($0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$), so ist eine Doppelbestimmung mit einer anderen Einwaage der Probe durchzuführen. Betragen die Ergebnisse beider Bestimmungen höchstens $0,004\text{ }^{\circ}\text{C}$, so werden die Ergebnisse protokolliert und zum Endergebnis verrechnet.

8.4. Kühlen der Thermistorsonde

Nach Gebrauch des Geräts wird ein leeres Proberöhrchen in den Probenschacht eingeführt und die Betriebstemperatur gesenkt, um die Thermistorsonde zu kühlen.

(Bei Thermometern bestimmter Bauweisen ist dies nicht möglich; in solchen Fällen muß die Sonde vor der Messung unbedingt entsprechend gekühlt werden, z. B. mit Hilfe bestimmter Blinduntersuchungen, bis übereinstimmende Werte erreicht werden.)

9. Auswertung

9.1. Berechnung

Wird der Eichwert beim Nachjustieren bestätigt, so wird der Mittelwert aus den akzeptablen Meßwerten und Doppelbestimmungen berechnet und auf drei Stellen hinter dem Komma gerundet.

Ist die Summe aus Meßwert und Doppelbestimmung eine ungerade Zahl, so wird der Mittelwert nach folgendem Beispiel auf die nächste gerade Zahl gerundet:

Gefrierpunkt (°C)

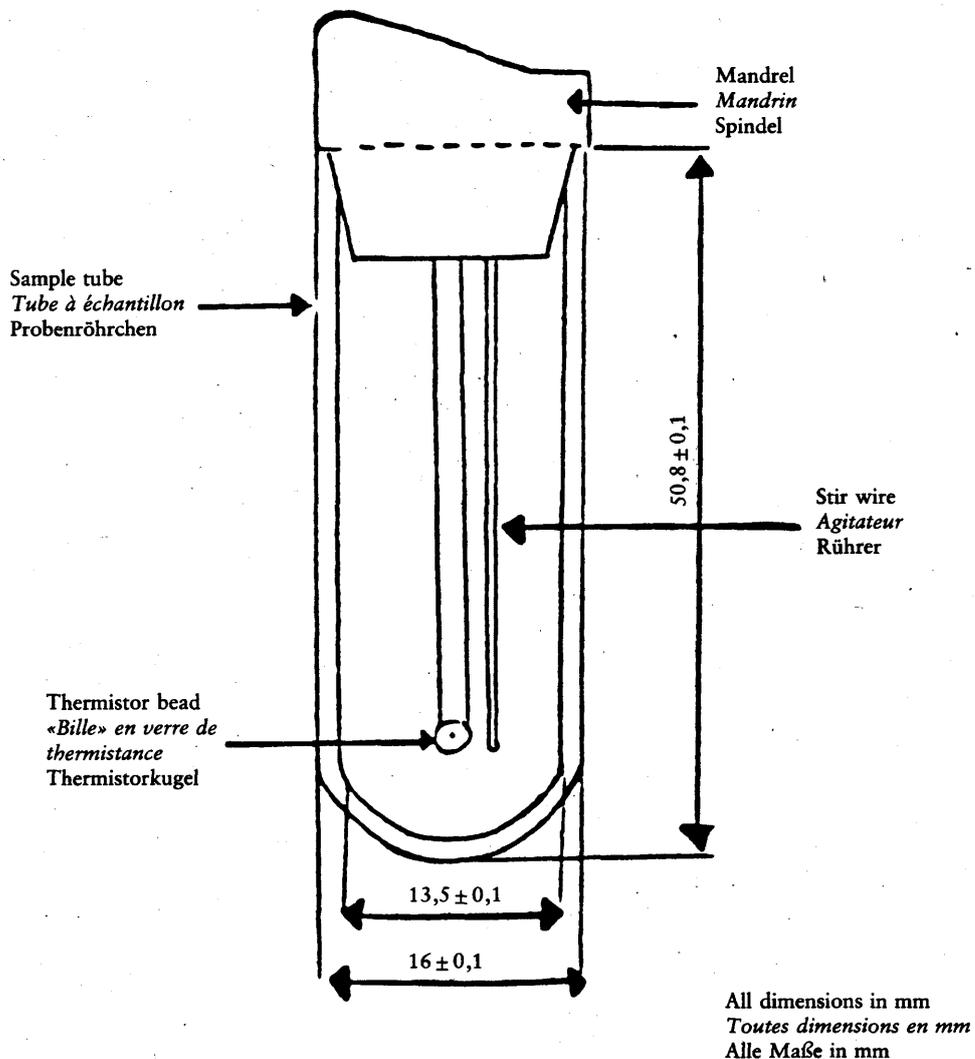
Doppelbestimmungen		Mittelwert
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

9.2. Zuverlässigkeit

9.2.1. Wiederholbarkeit (r): 0,004 °C.

9.2.2. Vergleichbarkeit (R): 0,006 °C.

Schema des Thermistor-Kryoskops (vgl. 4.1) (mit Thermistorkugel und Probenrührer in richtiger Lage)



II. BESTIMMUNG DER PHOSPHATASEAKTIVITÄT

1. **Umfang und Anwendungsbereich**

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung der Phosphataseaktivität pasteurisierter Milch.

2. **Begriffsbestimmung**

2.1. Die *Phosphataseaktivität* ist ein Maß für die in dem Erzeugnis vorkommende Menge aktiver alkalischer Phosphatase, ausgedrückt als die Menge Phenol in Mikrogramm, die unter Verfahrensbedingungen von 1 ml pasteurisierter Milch freigesetzt wird.

2.2. Milch mit einer Phosphataseaktivität von unter 4 µg/ml gilt als phosphatasenegativ.

3. **Kurzbeschreibung**

Die Phosphataseaktivität wird bewertet anhand der beim Versetzen der Probe mit Dinatriumphosphat freigesetzten Phenolmenge. Das freigesetzte Phenol reagiert mit Dibromchinonchlorimid zu Dibromindophenol (bläulich), das kolorimetrisch bei 610 nm gemessen wird. Anschließend erfolgt ein Vergleich mit einer Probe, deren Phosphataseenzym zerstört wurde.

4. **Reagenzien**4.1. *Bariumborathydroxid-Pufferlösung*

4.1.1. 50,0 g Bariumhydroxid ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) werden in Wasser gelöst und zu 1 000 ml aufgefüllt.

4.1.2. 22,0 g Borsäure (H_3BO_3) werden in Wasser aufgelöst und zu 1 000 ml aufgefüllt.

4.1.3. Von jeder Lösung werden 500 ml auf 50 °C angewärmt, durchmischt, gerührt und rasch auf 20 °C rückgekühlt; gegebenenfalls wird der pH-Wert durch Zugabe einer Lösung nach 4.1.1 oder 4.1.2 auf $10,6 \pm 0,1$ eingestellt. Dann wird filtriert. Die Lösung wird in einem dicht verschlossenen Gefäß aufbewahrt.

4.1.4. Die Lösung wird vor ihrer Verwendung mit einem gleichen Teil Wasser verdünnt.

4.2. *Farbentwicklungs-Pufferlösung*

6,0 g Natriummetaborat (NaBO_2) oder 12,6 g Natriummetaborat Tetrahydrat $\text{NaBO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 20,0 g Natriumchlorid (NaCl) werden in Wasser gelöst und zu 1 000 ml aufgefüllt.

4.3. *Farbverdünnungs-Pufferlösung*

10 ml der Farbentwicklungs-Pufferlösung (vgl. 4.2) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

4.4. *Pufferlösungs-Substrat*

Es werden 0,1 g wasser- und phenolfreies Dinatriumphosphat in 100 ml Pufferlösung (vgl. 4.1.3) oder 0,5 g Dinatriumphosphat in 4,5 ml der Farbentwicklungs-Pufferlösung (vgl. 4.2) gelöst, zwei Tropfen der Dibromchinonchlorimid-Lösung (vgl. 4.6) zugesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird der entstandene Farbstoff mit 2,5 ml Butan-1-ol ausgezogen und bis zur Abscheidung von Butan-1-ol stehengelassen. Das Butan-1-ol wird abgegossen und der Auszug erforderlichenfalls wiederholt.

Die Lösung ist mehrere Tage im Kühlschrank haltbar; Farbentwicklung und Auszug vor Verwendung durchführen. Das Pufferlösungs-Substrat ist unmittelbar vor der Verwendung durch Verdünnung von 1 ml der entsprechenden Lösung auf 100 ml mit Bariumborathydroxid-Pufferlösung (vgl. 4.1.3) anzusetzen.

4.5. *Zink-Kupfer-Fällungsmittel*

3,0 g Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) und 0,6 g Kupfer-(II)-Sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

4.6. *2,6-Dibromchinonchlorimid-Lösung*

40 ± 1 mg 2,6-Dibromchinonchlorimid (BQC)($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_2\text{ClNO}_6$) werden in 10 ml Ethanol mit einer Volumenkonzentration von 96 % gelöst.

Die Lösung wird in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Verblässen der Farbe oder beim Überschreiten der Aufbewahrungszeit von einem Monat ist die Lösung zu verwerfen.

4.7. *Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung*

0,05 g Kupfer-(II)-Sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

4.8. *Phenol-Standardlösungen*

4.8.1. 200 \pm 2 mg reines, wasserfreies Phenol werden in einen 100-ml-Meßbecher eingewogen, mit Wasser versetzt und vermischt und bis zur Marke aufgefüllt. Diese Stammlösung kann mehrere Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4.8.2. 10 ml Stammlösung werden mit Wasser vermischt und auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml enthält 200 μg Phenol.

5. **Geräte und Hilfsmittel**

Anmerkung:

- a) Alle Gläser, Stopfen und Probenahmegeräte müssen peinlich sauber gehalten werden. Es wird empfohlen, sie mit frisch aufgekochtem destilliertem Wasser zu spülen oder in Dampf zu behandeln.
- b) Bestimmte Arten von Plastikstopfen können Phenolverunreinigungen hervorrufen und dürfen daher nicht verwendet werden.

Übliche Laborausrüstung, insbesondere:

5.1. *Analysenwaage*

5.2. *Wasserbad*, einstellbar auf eine konstante Temperatur von 37 ± 1 °C.

5.3. *Spektralphotometer*, geeignet für Ablesungen bei einer Wellenlänge von 610 nm.

5.4. *Probenröhrchen*, 16 oder 18 mm \times 150 mm, nach Möglichkeit geeicht bei 5 ml und 10 ml.

5.5. *Pipetten*

5.6. *Glastrichter*, geeignete Größe, z. B. mit 5 cm Durchmesser.

5.7. *Faltenfilter* mit mindestens 9 cm Durchmesser für mittlere Filtriergeschwindigkeit.

5.8. *Meßbecher* zum Ansetzen der Standardlösungen.

6. **Verfahren**

Anmerkung:

- a) Bei der Bestimmung direkte Sonnenbestrahlung vermeiden.
- b) Verunreinigung mit Spuren von Speichel oder Schweiß können zu falschen positiven Ergebnissen führen und sind zu vermeiden. Dies ist insbesondere beim Pipettieren zu beachten.

6.1. *Vorbereitung der Probe für die Untersuchung*

6.1.1. Die Analyse wird direkt nach der Probenahme durchgeführt. Anderenfalls wird die Probe im Kühlschrank aufbewahrt, jedoch nicht länger als zwei Tage.

6.2. *Probeneinwaage*

In jedes der beiden Proberohre (vgl. 5.4) wird 1 ml der zu untersuchenden Probe einpipettiert, wobei eines der Rohre zur Durchführung einer Gegen- oder Blindprobe verwendet wird.

6.3. *Bestimmung*

6.3.1. Die Blindprobe wird zwei Minuten lang in siedendem Wasser erhitzt. Dabei werden das Probenrohr und der Kochbecher mit Aluminiumfolie abgedeckt, damit das ganze Rohr erwärmt wird. Rasch auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

6.3.2. Im weiteren Verlauf des Verfahrens werden Blindprobe und die zu untersuchende Probe gleich behandelt. Es werden 10 ml des Pufferlösungs-Substrats (vgl. 4.4) zugesetzt und vermischt.

- 6.3.3. Die Proben werden sofort 60 Minuten lang im Wasserbad angewärmt (vgl. 5.2), wobei der Inhalt von Zeit zu Zeit zu durchmischen ist (mindestens viermal).
- 6.3.4. In siedendem Wasser zwei Minuten lang wie unter 6.3.1 erwärmen. Rasch auf Raumtemperatur rückkühlen.
- 6.3.5. Jedem Rohr 1 ml Zink-Kupfer-Fällungsmittel (vgl. 4.5) zusetzen und gut vermischen.
- 6.3.6. Über trockenes Filterpapier filtrieren und die ersten 2 ml verwerfen; erforderlichenfalls erneut filtrieren, bis das Filtrat vollkommen klar ist; 5 ml davon in ein Probenrohr geben.
- 6.3.7. Es werden 5 ml der Farbentwicklungspufferlösung (vgl. 4.2) zugesetzt.
- 6.3.8. 0,1 ml Dibromchinonchlorimidlösung (vgl. 4.6) zusetzen, vermischen und die Farbe 30 Minuten bei Raumtemperatur entwickeln lassen.
- 6.3.9. Die Extinktion wird im Vergleich zur Gegen- oder Blindprobe mit dem Spektrometer (vgl. 5.3) bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen.
- 6.3.10. Die Bestimmung ist mit geeigneter Verdünnung der Probe zu wiederholen, wenn die gemäß 6.3.9 gemessene Extinktion die gemäß 6.4.4 gemessene Extinktion der Standardlösung mit 20 µg Phenol je Rohr übersteigt. Diese Verdünnung wird durch Mischen einer Volumeneinheit der Untersuchungsprobe mit einem geeigneten Volumen eines Teils derselben Untersuchungsprobe, der zur Phosphataseinaktivierung zum Sieden gebracht wurde, vermischt.
- 6.4. *Aufstellung der Eichkurve*
- 6.4.1. Ausgehend von der Phenolstandardlösung (vgl. 4.8.2) wird eine geeignete Reihe verdünnter Standardlösungen mit 0 (Kontroll- oder Blindprobe), 2, 5, 10 und 20 µg Phenol je ml angesetzt; 1 ml Wasser oder je 1 ml der Phenolstandardlösungen werden in je eines von fünf Probenröhrchen pipettiert.
- 6.4.2. Jedem Probenröhrchen wird 1 ml Kupfer-(II)-Sulfatlösung (vgl. 4.7), 5 ml der Substratpufferlösung (vgl. 4.3), 3 ml Wasser und 0,1 ml der Bromchinonchlorimid-Lösung (vgl. 4.6) zugesetzt; vermischen.
- 6.4.3. Farbe 30 Minuten bei Raumtemperatur entwickeln lassen.
- 6.4.4. Die Extinktion wird im Vergleich zur Parallel- oder Blindprobe mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen.
- 6.4.5. Anhand der Extinktionswerte (vgl. 6.4.4) für die jeweils zugesetzte Phenolmenge (vgl. 6.4.1) wird die Regressionsgerade durch die Methode der kleinsten Quadrate errechnet.
7. **Auswertung der Ergebnisse**
- 7.1. *Berechnungsformel*
- 7.1.1. Ausgehend von der gemessenen Extinktion (vgl. 6.3.9) wird mit Hilfe der erstellten Regressionsgeraden (vgl. 6.4.5) die entsprechende Phenolmenge errechnet.
- 7.1.2. Die Phosphataseaktivität in µg Phenol je ml pasteurisierter Milch errechnet sich nach folgender Formel:
Phosphataseaktivität = $2,4 \times A \times D$,
hierin bedeuten:
A = Phenolmenge in µg, bestimmt nach 7.1.1,
D = Verdünnungsfaktor der Verdünnung nach 6.3.10 (ohne Verdünnung ist D = 1),
2,4 = Verdünnungsfaktor ($5/12$ von 1 ml Probeneinwaage) (vgl. 6.2 in Verbindung mit 6.3.2, 6.3.5 und 6.3.6).
- 7.2. *Zuverlässigkeit*
- 7.2.1. Wiederholbarkeit (r): 2 µg Phenol/ml.
- 7.2.2. Vergleichbarkeit (R): 3 µg Phenol/ml (vorläufig).
- 7.2.3. Wird eine Verdünnung nach 6.3.10 verwendet, so bezieht sich der unter 7.2.1 und 7.2.2 genannte Grenzwert auf die mit der verdünnten Probe erzielten Ergebnisse.

III. BESTIMMUNG DER PEROXIDASEAKTIVITÄT

1. Zweck und Anwendungsbereich

Die Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung der Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Peroxidaseenzym in der Milch für den einwandfreien Pasteurisierungsnachweis.

2. Begriffsbestimmung

Positive Peroxidasereaktion

30 Sekunden nach dem Durchmischen färbt sich vorschriftsmäßig pasteurisierte Milch blau.

Negative Peroxidasereaktion

30 Sekunden nach dem Durchmischen kein Farbumschlag.

3. Kurzbeschreibung

Durch das Peroxidaseenzym wird Wasserstoffsuperoxid abgebaut. Der dabei freigesetzte atomare Sauerstoff oxydiert die farblose 1,4-Phenylendiamin-Lösung zu violetter Indophenol (Storchsche Reaktion). Die Farbsättigung ist proportional zur Enzymkonzentration.

4. Reagenzien

4.1. 1,4-Phenylendiamin-Lösung

2 g 1,4-Phenylendiamin ($C_6H_8N_2$) werden im warmen Wasser (50 °C) gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird in einer dunkelbraunen Flasche mit Glasstopfen kühl und dunkel aufbewahrt. Die 1,4-Phenylendiamin-Lösung bildet innerhalb von 1 bis 2 Tagen nach dem Ansetzen einen Niederschlag, der zu entfernen ist.

4.2. Wasserstoffperoxid-Lösung

9 ml Wasserstoffperoxid mit einem Massenanteil von ca. 30 % werden in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Zur Stabilisierung wird 1 ml konzentrierte Schwefelsäure je Liter Lösung zugegeben.

Die Wasserstoffperoxid-Lösung ist einen Monat lang haltbar, sofern sie in einer Flasche mit Glasstopfen als Schutz gegen organische Verbindungen im Dunkeln aufbewahrt wird.

5. Verfahren

5.1. 5 ml der Milchprobe werden in ein sauberes Probenröhrchen mit geeignetem Verschluss gegeben.

5.2. 5 ml 1,4-Phenylendiamin-Lösung (vgl. 4.1) werden zugegeben.

5.3. Ferner werden zwei Tropfen Wasserstoffperoxid-Lösung (vgl. 4.2) zugegeben.

5.4. Auf den 30 Sekunden nach dem Durchmischen auftretenden Farbumschlag ist zu achten. Ein später als 30 Sekunden nach dem Zusatz der Reagenzien auftretender Farbumschlag ist eine unspezifische Reaktion.

IV. BESTIMMUNG DES KEIMGEHALTS BEI 30 °C

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Keimzahlbestimmung durch Auszählung der Kolonien bei 30 °C.

Dieses Verfahren ist anwendbar bei roher und pasteurisierter Milch sowie bei ultrahocherhitzter und sterilisierter Milch, die zuvor 15 Tage bei 30 °C bebrütet wurde.

2. Begriffsbestimmung

Keime: Darunter sind Organismen zu verstehen, die bei aerober Bebrütung unter den festgelegten Bedingungen auszählbare Kolonien bilden.

3. Kurzbeschreibung

Eine bestimmte Menge der Milchprobe wird in Petri-Schalen mit Nährboden versetzt und 72 Stunden bei 30 °C bebrütet. Die Kolonien werden ausgezählt und auf die Anzahl von Mikroorganismen je ml roher oder pasteurisierter Milch oder je 0,1 ml zuvor bebrüteter ultrahocherhitzter oder sterilisierter Milch umgerechnet.

4. Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborausrüstung, insbesondere:

4.1. Geräte

4.1.1. Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf 170—175 °C.

4.1.2. Autoklav, einstellbar auf 121 °C \pm 1 °C.

4.1.3. Brutschrank, einstellbar auf eine überall gleichbleibende Temperatur von 30 \pm 1 °C.

4.1.4. Ein pH-Meßgerät, mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation, auf \pm 0,1 pH genau.

4.1.5. Wasserbad, einstellbar auf 45 \pm 1 °C.

4.1.6. Lupe, 2- bis 4fache Vergrößerung.

4.1.7. Lupe, 8- bis 10fache Vergrößerung.

4.1.8. Zählgerät

4.1.9. Rotationsmischgerät (whirlmix), zum Mischen von 1 ml der Milchprobe oder zur Herstellung einer dezimalen Verdünnung mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit nach dem Prinzip der exzentrischen Rotation des Kulturröhrchen-Inhalts.

4.2. Glasgeräte

4.2.1. Kulturröhrchen mit geeigneten Verschlüssen und ausreichendem Nennvolumen sowie genügend Platz zum Durchmischen von 10 ml Ausgangsverdünnung bzw. der höheren Dezimalverdünnungen.

4.2.2. Verdünnungsflaschen, 150—250 ml Nennvolumen, oder Verdünnungsröhrchen, ca. 20 ml Nennvolumen, zum Aufbewahren des Nährbodens.

4.2.3. Pipetten (mit Baumwolle verstöpselt), aus Glas oder sterilem Kunststoff, mit ausgezogener Spitze, 1 ml Nennvolumen, Auslaßöffnung 1,75—3 mm Durchmesser.

4.2.4. Petri-Schalen, aus durchsichtigem, farblosem Glas oder sterilem Kunststoff mit einem Boden-Innendurchmesser von etwa 90—100 mm. Die Innenhöhe muß mindestens 10 mm betragen. Der Boden darf keine Unregelmäßigkeiten aufweisen, welche das Auszählen der Kolonien beeinträchtigen könnten.

4.2.5. Sterilisieren der Glasgeräte

Die Glasgeräte sind nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

a) mindestens eine Stunde bei einer gleichbleibenden Temperatur von 170—175 °C in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.1);

b) mindestens zwanzig Minuten bei einer gleichbleibenden Temperatur von 121 °C \pm 1 °C in einem Autoklaven (vgl. 4.1.2).

Bei Verwendung des Autoklaven muß eine ausreichende Bedampfung gewährleistet sein; so ist beim Sterilisieren der Gefäße in Behältern darauf zu achten, daß diese Behälter nicht dicht verschlossen sind und Deckel oder Verschlüsse von den Gefäßen abgenommen werden.

Im Autoklaven sterilisierte Glasgeräte müssen durch Ausblasen des Dampfes getrocknet werden. Pipetten werden in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.1) sterilisiert.

5. Nährboden — Plate-Count-Milchpulver-Agar

5.1. Bestandteile

Hefeextrakt	2,5 g,
Trypton	5,0 g,
D(+)-Glucose	1,0 g,
Magermilchpulver	1,0 g,
Agar	10—15 g, je nach Geliereigenschaften,
Wasser	1 000 ml.

Das verwendete Magermilchpulver darf keine keimhemmenden Stoffe enthalten. Dies ist durch Vergleichsprüfungen unter Verwendung von Magermilchpulver sicherzustellen, das nachgewiesenermaßen frei von keimhemmenden Stoffen ist.

Herstellung

Die Nährbodenbestandteile werden in der folgenden Reihenfolge im Wasser suspendiert bzw. gelöst: Hefeextrakt, Trypton, Glucose und zum Schluß Magermilchpulver. Dies kann durch Anwärmen der Suspension gefördert werden. Der Agar wird zugesetzt und unter ständigem Rühren bis zur restlosen Auflösung aufgekocht oder etwa 30 Minuten im Dampftopf behandelt.

Falls erforderlich, durch Filterpapier filtrieren.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) geprüft und gegebenenfalls mit Natriumhydroxidlösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) nach dem Sterilisieren auf $6,9 \pm 0,1$ bei einer Temperatur von 25 °C eingestellt.

5.2. Aufteilen, Sterilisieren und Aufbewahren des Nährbodens

100 bis 150 ml Nährboden (vgl. 5.1) werden in Flaschen bzw. 12 bis 15 ml Nährboden in Röhrchen (vgl. 4.2.2) gegeben. Die Flaschen und Röhrchen werden verschlossen.

Anschließend wird im Autoklaven (vgl. 4.1.2) 15 Minuten bei $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ sterilisiert.

Der pH-Wert des Nährbodens wird geprüft.

Wird der Nährboden nicht unverzüglich verwendet, kann er im Dunkeln bei einer Temperatur zwischen 1 und 5 °C nicht länger als drei Monate nach dem Ansetzen aufbewahrt werden.

5.3. Wasserfreier Fertignährboden

Der Nährboden (vgl. 5.1) kann aus wasserfreiem Fertignährboden hergestellt werden. Dabei sind die Gebrauchsanweisungen des Herstellers zu befolgen. Sofern Magermilchpulver nicht bereits enthalten ist, ist es bereits vor dem Auflösen zuzusetzen.

Der Nährboden wird gemäß 5.1 auf einen pH-Wert von $6,9 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt und gemäß 5.2 aufgeteilt, sterilisiert und aufbewahrt.

6. Verdünnungsflüssigkeit

6.1. Kochsalz-Pepton-Lösung

Bestandteile

Pepton	1,0 g,
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g,
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die Bestandteile werden in Wasser gelöst, erforderlichenfalls unter Erhitzung.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) kontrolliert und nach dem Sterilisieren gegebenenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) auf $7,0 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt.

- 6.2. *Aufteilen, Sterilisieren und Aufbewahren der Verdünnungsflüssigkeit*
- Die Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) wird in Probenröhrchen (vgl. 4.2.1) so aufgeteilt, daß jedes Röhrchen nach dem Sterilisieren 9,0 ml \pm 0,2 ml der Verdünnungsflüssigkeit enthält. Die Röhrchen sind zu verschließen.
- Sie werden im Autoklaven (vgl. 4.1.2) 15 Minuten bei 121 °C \pm 1 °C sterilisiert.
- Der pH-Wert der Verdünnungsflüssigkeit wird kontrolliert.
- Soll die Verdünnungsflüssigkeit nicht sofort verwendet werden, so kann sie im Dunkeln bei einer Temperatur von 1 bis 5 °C nicht länger als einen Monat nach dem Ansetzen aufbewahrt werden.
- 6.3. *Gebrauchsfertige wasserfreie Verdünnungsflüssigkeiten*
- Die Verdünnungsflüssigkeiten (vgl. 6.1) können aus gebrauchsfertigen wasserfreien Tabletten oder Pulvern hergestellt werden. Dabei sind die Gebrauchsanweisungen der Hersteller zu befolgen. Die Verdünnungsmittel werden gemäß 6.1 auf den geeigneten pH-Wert eingestellt und gemäß 6.2 aufgeteilt, sterilisiert und aufbewahrt.
7. **Verfahren**
- 7.1. *Aufschmelzen des Nährbodens*
- Die erforderliche Menge an Nährboden wird vor Beginn der Untersuchung im Wasserbad (vgl. 4.1.5) rasch aufgeschmolzen und anschließend im Wasserbad (vgl. 4.1.5) auf 45 °C \pm 1 °C temperiert.
- 7.2. *Ansetzen der Milchproben*
- Zur möglichst gleichmäßigen Verteilung der Mikroorganismen wird die Milchprobe durch 25maliges rasches Stürzen gründlich durchmischt. Dabei ist Schaumbildung zu vermeiden bzw. abzuwarten, bis sich der Schaum abgebaut hat. Die Probewwaage soll spätestens 3 Minuten nach dem Durchmischen verwendet werden.
- 7.3. *Ansetzen der Ausgangsverdünnung (10^{-1}) (rohe und pasteurisierte Milch)*
- Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird 1 ml der Probe (vgl. 7.2) roher oder pasteurisierter Milch mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) versetzt, wobei die Pipette nicht mit der Verdünnungsflüssigkeit in Berührung kommen darf. Verdünnungsflüssigkeit und Milchprobe müssen etwa dieselbe Temperatur haben. Diese Ausgangsverdünnung wird 5 bis 10 Sekunden vorsichtig auf dem Rotationsmischergerät (vgl. 4.1.9) vermischt.
- Auf diese Weise erhält man eine Ausgangsverdünnung von 10^{-1} .
- 7.4. *Ansetzen höherer Dezimalverdünnungsstufen (rohe und pasteurisierte Milch)*
- Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird 1 ml Ausgangsverdünnung (vgl. 7.3) mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) entsprechend den Anweisungen nach 7.3 versetzt.
- Auf diese Weise erhält man eine Verdünnung der Stufe 10^{-2} .
- Zur Herstellung höherer Dezimalverdünnungsstufen ist dieses Verfahren so lange zu wiederholen, bis die geeignete Keimzahl (vgl. 8.1.1) erwartet werden kann.
- 7.5. *Beimpfung der Petri-Schalen*
- 7.5.1. **Rohe Milch:** Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird eine Petri-Schale (vgl. 4.2.4) mit 1 ml der Probe oder der entsprechenden Dezimalverdünnung beschickt. Es sind mindestens zwei Verdünnungsstufen zu untersuchen. Mit jeder geeigneten Verdünnung (vgl. 8.1.1) wird eine Petri-Schale beimpft.
- 7.5.2. **Pasteurisierte Milch:** Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird eine Petri-Schale (vgl. 4.2.4) mit 1 ml der Probe oder der entsprechenden Dezimalverdünnung beschickt. Es sind mindestens zwei Verdünnungsstufen zu untersuchen. Mit jeder geeigneten Verdünnung (vgl. 8.1.1) werden zwei Petri-Schalen beimpft.
- 7.5.3. **Ultrahochoerhitzte und sterilisierte Milch (Untersuchung nach 15tägiger Bebrütung bei 30 °C — Richtlinie 85/397/EWG, Anhang A Kapitel VII Nummer 5):**
- Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird eine Petri-Schale (vgl. 4.2.4) mit 0,1 ml Milchprobe (vgl. 7.2) beschickt. Es werden zwei Petri-Schalen beimpft.

7.6. *Gießen des Nährbodens*

Jede beimpfte Petri-Schale wird mit 15—18 ml Nährboden (vgl. 7.1) beschickt.

Sofort nach Eingießen des Nährbodens wird die Petri-Schale zur Erzielung gleichmäßig verteilter Kolonien nach dem Bebrüten gründlich umgeschwenkt.

Zwischen dem Ende der Probenherstellung und dem Ausgießen des Nährbodens dürfen je nach Art der Milch, Probe oder Verdünnung mit Nährboden höchstens 15 Minuten vergehen.

Die Petri-Schalen werden auf einer sauberen, kühlen und ebenen Fläche stehengelassen.

7.7. *Bebrütung der Petri-Schalen*

Die Petri-Schalen werden in den Brutschrank (vgl. 4.1.3) übergeführt. Sie sind mit dem Deckel nach unten zu bebrüten. Es dürfen höchstens sechs Schalen übereinander gestapelt werden. Die Stapel dürfen einander sowie die Wände und die Decke des Brutschranks nicht berühren.

Die Bebrütungstemperatur beträgt 30 ± 1 °C, die Bebrütungsdauer 72 ± 2 Stunden.

7.8. *Auszählen der Kolonien*

Die Kolonien in den Petri-Schalen mit höchstens 300 Kolonien werden ausgezählt.

Die Kolonien werden in diffusem Licht gezählt. Um das Zählen zu erleichtern, darf eine geeignete Lupe (vgl. 4.1.6) und/oder ein Zählgerät (vgl. 4.1.8) verwendet werden. Es ist darauf zu achten, daß kleine Niederschlagspartikel nicht mit Pin-point-Kolonien verwechselt werden. In Zweifelsfällen ist die Unterscheidung zwischen Kolonien und anderen Partikeln mit einer stärkeren Lupe (vgl. 4.1.7) abzusichern.

Laufkolonien werden als einzelne Kolonie bewertet. Wenn Laufkolonien mehr als ein Viertel der Schale bedecken, werden die Kolonien auf dem nicht überwachsenen Teil gezählt und auf die gesamte Fläche der Petri-Schale umgerechnet. Wenn mehr als ein Viertel der Nährbodenfläche von Laufkolonien überwachsen ist, ist die Schale zu verwerfen.

8. **Berechnung und Auswertung**8.1. *Rohe und pasteurisierte Milch*

8.1.1. Grundsätzlich sind solche Petri-Schalen auszuwerten, die zwischen 10 und 300 Kolonien (vgl. 8.1.3 und 8.1.4) aufweisen.

8.1.2. Die Keimzahl je 1 ml roher oder pasteurisierter Milch errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

hierin bedeuten:

$\sum C$ = Summe der ausgezählten Kolonien gemäß 8.1.1,

$(n_1 + 0,1 n_2) d$ = Volumen der ausgestrichenen Probe mit:

n_1 = Anzahl der Petri-Schalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe;

n_2 = Anzahl der Petri-Schalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe;

d = die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe.

Die Ergebnisse werden auf zwei Stellen gerundet; im Beispiel wird das Ergebnis auf 29 000 gerundet. Ist die zu rundende Stelle eine 5, ist so zu runden, daß die links folgende Stelle eine gerade Zahl ergibt.

Beispiel (pasteurisierte Milch):

Verdünnungsstufe 10^{-2} : 278 und 290 Kolonien

Verdünnungsstufe 10^{-3} : 33 und 28 Kolonien

$$\begin{aligned} \text{Anzahl/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

- 8.1.3. Werden auf den Petri-Schalen nur Koloniezahlen unter 10 gefunden, wird die Keimzahl mit „weniger als $10 \times d$ je ml“ angegeben, wobei „d“ der Faktor der niedrigsten Verdünnungsstufe (Kehrwert der Verdünnung) ist.
- 8.1.4. Werden nur Koloniezahlen über 300 gefunden und ist ein Auszählen dennoch möglich, wird eine geschätzte Koloniezahl aus Petri-Schalen mit Koloniezahlen in der Größenordnung von 300 bestimmt und diese mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Das Ergebnis wird dann ausgedrückt als „geschätzte Keimzahl je ml“.
- 8.2. *Ultrahochoerhitzte und sterilisierte Milch*
Keimzahlen von mehr als 10 Kolonien pro Platte bei 0,1 ml erfüllen nicht mehr die Anforderungen der Richtlinie 85/397/EWG.
9. **Zuverlässigkeit**
Ergebnisse international anerkannter Ringversuche liegen nicht vor.

V. BESTIMMUNG DES KEIMGEHALTS BEI 21 °C

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Keimzahlbestimmung durch Auszählen der Kolonien bei 21 °C bei pasteurisierter Milch, die 5 Tage bei 6 °C bebrütet wurde, um in pasteurisierter Milch den Besatz mit psychrotrophen Keimen, die in Milch bei 6 °C vermehrungsfähig sind, zu bestimmen.

2. Begriffsbestimmung

Keime: Darunter sind Organismen zu verstehen, die bei aerober Bebrütung unter den festgelegten Bedingungen zählbare Kolonien bilden.

3. Kurzbeschreibung

Die pasteurisierte Milch wird 5 Tage bei 6 °C bebrütet. Eine bestimmte Menge der Milchprobe wird in Petri-Schalen mit Nährboden versetzt und 25 Stunden bei 21 °C bebrütet.

Die Kolonien werden ausgezählt und auf die Anzahl Mikroorganismen je 1 ml pasteurisierte Milch umgerechnet.

4. Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborausrüstung und insbesondere:

4.1. Geräte

4.1.1. Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf 170—175 °C.

4.1.2. Autoklav, einstellbar auf 121 °C \pm 1 °C.

4.1.3. Brutschrank, einstellbar auf eine konstante Innenraumtemperatur an allen Stellen von:

a) 6 \pm 0,2 °C,

b) 21 \pm 1 °C.

4.1.4. Ein pH-Meßgerät, mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation, auf \pm 0,1 pH genau.

4.1.5. Wasserbad, einstellbar auf 45 \pm 1 °C.

4.1.6. Lupe, 2—4fache Vergrößerung.

4.1.7. Lupe, 8—10fache Vergrößerung.

4.1.8. Zähl Tisch

4.1.9. Rotationsmischgerät, zum Mischen von 1 ml Milchprobe oder Dezimalverdünnung mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit nach dem Prinzip der exzentrischen Rotation des Proberöhrchen-Inhalts.

4.2. Glasgeräte

4.2.1. Proberöhrchen, mit geeigneten Verschlüssen und ausreichendem Nennvolumen zur Aufnahme von 10 ml Ausgangsverdünnung oder höherer Dezimalverdünnungen mit ausreichendem Raum zum Vermischen.

4.2.2. Verdünnungsflaschen, mit 150—200 ml Nennvolumen, oder Verdünnungsröhrchen, mit 20 ml Nennvolumen, zum Aufbewahren des Nährbodens.

4.2.3. Pipetten (mit Baumwolle verstopft), aus Glas oder sterilem Kunststoff mit ausgezogener Spitze, 1 ml Nennvolumen, Auslaßöffnung 1,75—3 mm Durchmesser.

4.2.4. Petri-Schalen aus durchsichtigem farblosem Glas oder sterilem Kunststoff mit einem Bodendurchmesser von etwa 90—100 mm. Die Innenhöhe muß mindestens 10 mm betragen. Der Boden darf keine Unregelmäßigkeiten aufweisen, die das Auszählen der Kolonien beeinträchtigen.

4.2.5. Sterilisieren der Glasgeräte

Die Glasgeräte sind nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

a) mindestens eine Stunde bei gleichbleibender Temperatur von 170—175 °C in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.1);

b) mindestens 20 Minuten bei gleichbleibender Temperatur von 121 °C \pm 1 °C in einem Autoklaven (vgl. 4.1.2).

Bei Verwendung eines Autoklaven muß eine ausreichende Bedampfung gewährleistet sein; so ist beim Sterilisieren der Geräte in Behältern darauf zu achten, daß diese nicht dicht verschlossen sind und Deckel oder Verschlüsse von Gefäßen abgenommen werden.

Die im Autoklaven sterilisierten Glasgeräte sind durch Ausblasen des Dampfs zu trocknen.

Pipetten werden in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.1) sterilisiert.

5. Nährboden — Plate-Count-Milchpulver-Agar

5.1. Bestandteile

Hefeextrakt	2,5 g,
Trypton	5,0 g,
D(+)-Glucose	1,0 g,
Magermilchpulver	1,0 g,
Agar	10—15 g, je nach Gelieereigenschaften,
Wasser	1 000 ml.

Das Magermilchpulver darf keine Keimhemmstoffe enthalten. Dies ist durch Vergleichsprüfungen unter Verwendung von Magermilchpulver sicherzustellen, das nachgewiesenermaßen frei von Hemmstoffen ist.

Herstellung

Die Bestandteile werden in folgender Reihenfolge in Wasser suspendiert bzw. gelöst: Hefeextrakt, Trypton, Glucose und zum Schluß Magermilchpulver. Dies kann durch Erhitzen unterstützt werden. Agar wird zugegeben und bis zum vollständigen Lösen entweder unter ständigem Rühren aufgekocht oder 30 Minuten im Dampftopf behandelt.

Falls erforderlich, durch Filterpapier filtrieren.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) kontrolliert und erforderlichenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) nach dem Sterilisieren auf $6,9 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt.

5.2. Aufteilen, Sterilisieren und Aufbewahren des Nährbodens

100 bis 150 ml Nährboden (vgl. 5.1) werden in Verdünnungsflaschen oder 12 bis 15 ml Nährboden in Kulturröhrchen (vgl. 4.2.2) aufgeteilt. Die Flaschen und Röhrchen sind zu verschließen.

Das Material wird im Autoklaven (vgl. 4.1.2) 15 Minuten bei 121 °C \pm 1 °C sterilisiert.

Der pH-Wert des Nährbodens wird kontrolliert.

Wird der Nährboden nicht sofort verwendet, kann er im Dunkeln bei einer Temperatur von 1—5 °C für höchstens drei Monate nach dem Ansetzen aufbewahrt werden.

5.3. Wasserfreier Fertignährboden

Der Nährboden (vgl. 5.1) kann mit Hilfe eines wasserfreien Fertignährbodens hergestellt werden. Dabei ist die Gebrauchsanweisung des Herstellers zu befolgen und Magermilchpulver zuzusetzen, sofern es nicht bereits darin enthalten ist.

Der Nährboden wird gemäß 5.1 auf einen pH-Wert von $6,9 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt und gemäß 5.2 aufgeteilt, sterilisiert und aufbewahrt.

6. Verdünnungsflüssigkeiten

6.1. Kochsalz-Pepton-Lösung

Bestandteile:

Pepton	1,0 g,
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g,
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die Bestandteile werden erforderlichenfalls unter Erhitzung in Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) kontrolliert und erforderlichenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) nach dem Sterilisieren auf $7,0 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt.

6.2. Aufteilen, Sterilisieren und Aufbewahren der Verdünnungsflüssigkeit

Die Kulturröhrchen (vgl. 4.2.1) werden mit soviel Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) beschickt, daß jedes Röhrchen nach dem Sterilisieren $9,0 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$ Verdünnungsflüssigkeit enthält. Die Röhrchen sind zu verschließen.

Das Material wird im Autoklaven (vgl. 4.1.2) 15 Minuten bei $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ sterilisiert.

Der pH-Wert der Verdünnungsflüssigkeit wird kontrolliert.

Wird die Verdünnungsflüssigkeit nicht sofort verwendet, kann sie im Dunkeln bei einer Temperatur von $1\text{--}5 \text{ }^\circ\text{C}$ für höchstens einen Monat nach dem Ansetzen aufbewahrt werden.

6.3. Wasserfreie Fertigverdünnungsflüssigkeiten

Die Verdünnungsflüssigkeiten (vgl. 6.1) können mit Hilfe wasserfreier Fertigttabletten oder -pulver hergestellt werden. Dabei ist die Gebrauchsanweisung des Herstellers zu befolgen. Die Verdünnungsflüssigkeiten werden gemäß 6.1 auf den geeigneten pH-Wert eingestellt und gemäß 6.2 aufgeteilt, sterilisiert und aufbewahrt.

7. Verfahren**7.1. Aufschmelzen des Nährbodens**

Eine geeignete Menge Nährboden wird vor Beginn der Untersuchung im Wasserbad (vgl. 4.1.5) aufgeschmolzen. Der Nährboden wird im Wasserbad (vgl. 4.1.5) auf $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

7.2. Herstellung der Milchprobe**7.2.1. Eine ungeöffnete Packung pasteurisierter Milch oder, wenn dies nicht möglich ist, eine repräsentative Probe von mindestens 100 ml wird 120 ± 2 Stunden bei $6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Brutschrank (vgl. 4.1.3 a) bebrütet.****7.2.2. Zur möglichst gleichmäßigen Verteilung der Mikroorganismen wird die Milchprobe durch 25maliges rasches Stürzen des Milchprobengefäßes gründlich durchmischt. Dabei ist Schaumbildung zu vermeiden oder so lange abzuwarten, bis sich der Schaum zersetzt hat. Zwischen dem Durchmischen und Herausnehmen der Probe dürfen höchstens 3 Minuten vergehen.****7.3. Ansetzen der Ausgangsverdünnung (10^{-1})**

Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird 1 ml Probe (vgl. 7.2.2) mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) versetzt, wobei die Pipette nicht mit der Verdünnungsflüssigkeit in Berührung kommen darf. Die Verdünnungsflüssigkeit muß ungefähr dieselbe Temperatur haben wie die Milchprobe. Diese Ausgangsverdünnung ist vorsichtig 5—10 Sekunden lang mit einem Rotationsmischgerät (vgl. 4.1.9) zu durchmischen.

Auf diese Weise erhält man eine Ausgangsverdünnung von 10^{-1} .

7.4. Ansetzen höherer Dezimalverdünnungsstufen

Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird entsprechend den Anweisungen unter 7.3 1 ml Ausgangsverdünnung mit 9 ml Verdünnungsflüssigkeit (vgl. 6.1) versetzt.

Auf diese Weise erhält man eine Verdünnung der Stufe 10^{-2} .

Zur Herstellung höherer Dezimalverdünnungen sind diese Arbeitsschritte so lange zu wiederholen, bis die geeignete Keimzahl (vgl. 8.1) erwartet werden kann.

7.5. Beimpfung der Petri-Schalen

Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) wird eine Petri-Schale (vgl. 4.2.4) mit 1 ml der Probe oder der geeigneten Dezimalverdünnung beschickt. Es müssen mindestens zwei Verdünnungsstufen untersucht werden. Mit jeder geeigneten Verdünnung (vgl. 8.1) sind zwei Petri-Schalen anzusetzen.

7.6. Gießen des Nährbodens

Jede beimpfte Petri-Schale wird mit etwa 15—18 ml Nährboden (vgl. 7.1) versetzt.

Sofort nach dem Gießen des Nährbodens ist die Petri-Schale gründlich umzuschwenken, damit die Kolonien nach dem Bebrüten gleichmäßig verteilt sind.

Zwischen dem Ende der Probenherstellung und dem Gießen der Petri-Schale dürfen höchstens 15 Minuten vergehen.

Die Petri-Schalen werden auf einer sauberen, kühlen und horizontalen Fläche stehengelassen.

7.7. *Bebrütung der Petri-Schalen*

Die Schalen werden in den Brutschrank (vgl. 4.1.3 b)) übergeführt. Die Schalen müssen mit dem Deckel nach unten bebrütet werden. Dabei dürfen höchstens 6 Schalen übereinander gestapelt werden. Die Stapel dürfen einander sowie die Seitenwände und die Decke des Brutschranks nicht berühren.

Die Bebrütungstemperatur beträgt 21 ± 1 °C, die Bebrütungsdauer 25 Stunden.

7.8. *Auszählung der Kolonien*

Die Kolonien in den Petri-Schalen mit höchstens 300 Kolonien werden ausgezählt.

Die Petri-Schalen werden in diffusem Licht untersucht. Um das Auszählen zu erleichtern, darf eine geeignete Lupe (vgl. 4.1.6) und/oder ein Zähltablett (vgl. 4.1.8) verwendet werden. Es ist darauf zu achten, daß in den Schalen ausgefällte Partikel nicht mit Pin-point-Kolonien verwechselt werden. In Zweifelsfällen ist die Unterscheidung zwischen Kolonien und Fremdpartikeln mit einer stärkeren Lupe (vgl. 4.1.7) abzusichern.

Laufkolonien werden als einzelne Kolonie bewertet. Wenn weniger als ein Viertel der Schale von Laufkolonien überwachsen ist, werden die Kolonien auf dem nichtüberwachsenen Teil gezählt und auf die gesamte Fläche der Petri-Schale umgerechnet. Ist mehr als ein Viertel der Schale von Laufkolonien überwachsen, ist die Schale zu verwerfen.

8. **Berechnung und Auswertung der Ergebnisse**

8.1. Grundsätzlich sind alle Petri-Schalen auszuwerten, die zwischen 10 und 300 Kolonien (vgl. 8.3 und 8.4) aufweisen.

8.2. Die Anzahl der Mikroorganismen je ml pasteurisierte Milch berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

hierin bedeuten:

$\sum C$ = Summe der ausgezählten Kolonien gemäß 8.1,

$(n_1 + 0,1 n_2) d$ = Volumen der ausgestrichenen Probe mit:

n_1 = Anzahl der ausgezählten Petri-Schalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe,

n_2 = Anzahl der ausgezählten Petri-Schalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe,

d = die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe.

Das ausgezählte Ergebnis wird auf zwei Stellen gerundet; im Beispiel wird das Ergebnis auf 29 000 gerundet. Ist die zu rundende Stelle eine 5, ist so zu runden, daß die links folgende Ziffer eine gerade Zahl ergibt.

Beispiel:

Verdünnungsstufe 10^{-2} : 278 und 290 Kolonien

Verdünnungsstufe 10^{-3} : 33 und 28 Kolonien

$$\begin{aligned} \text{Anzahl/ml} &= \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-2}} \\ &= \frac{629}{0,022} \\ &= 28\,590 \\ &= 29\,000 \\ &= 2,9 \times 10^4. \end{aligned}$$

8.3. Werden nur Koloniezahlen unter 10 gefunden, wird die Keimzahl mit „weniger als $10 \times d$ je ml“ angegeben, wobei „d“ der Faktor der niedrigsten Verdünnungsstufe ist.

8.4. Werden nur Koloniezahlen über 300 gefunden und ist ein Auszählen dennoch möglich, wird eine geschätzte Koloniezahl aus Petri-Schalen mit Koloniezahlen der Größenordnung von 300 bestimmt und diese mit dem Kehrwert der Verdünnung multipliziert. Das Ergebnis wird dann ausgedrückt als „geschätzte Keimzahl je ml“.

9. **Zuverlässigkeit**

Ergebnisse international anerkannter Ringversuche liegen nicht vor.

VI. BESTIMMUNG DER COLIFORMEN KEIME — KOLONIEZÄHLVERFAHREN BEI 30 °C

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Bestimmung coliformer Keime in pasteurisierter Milch durch Auszählung der Kolonien bei 30 °C.

2. Begriffsbestimmung

Unter coliformen Keimen werden Bakterien verstanden, die unter den Bedingungen dieses Verfahrens bei 30 °C charakteristische oder uncharakteristische Kolonien bilden und die Lactose unter Gasbildung vergären.

3. Kurzbeschreibung

Eine bestimmte Menge Milchpulver wird in Petri-Schalen mit Nährboden versetzt und 24 Stunden bei 30 °C bebrütet. Die charakteristischen Kolonien werden ausgezählt; uncharakteristische Kolonien werden erforderlichenfalls durch Prüfung ihrer Fähigkeit zur Lactosevergärung identifiziert. Anschließend wird auf die Anzahl coliformer Keime je ml pasteurisierte Milch umgerechnet.

4. Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborausrüstung, insbesondere:

4.1. Geräte

4.1.1. Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf 170 bis 175 °C.

4.1.2. Autoklav, einstellbar auf 121 °C ± 1 °C.

4.1.3. Brutschrank, einstellbar auf eine überall konstante Temperatur von 30 ± 1 °C.

4.1.4. Ein pH-Meßgerät, mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation, auf ± 0,1 pH genau.

4.1.5. Wasserbad, einstellbar auf 45 ± 1 °C.

4.1.6. Impf-Öse, aus Platin-Iridium- oder Nickel-Chrom.

4.2. Glasgeräte

4.2.1. Kulturröhrchen mit geeignetem Verschuß und einem Nenninhalt von 20 ml zur Aufnahme des Nachweismediums (vgl. 5.2) und Durham-Röhrchen geeigneter Größe.

4.2.2. Verdünnungsflaschen, 150 bis 250 ml Nenninhalt, zur Aufnahme des spezifischen Trockennährbodens (vgl. 5.1).

4.2.3. Pipetten (mit Baumwolle verstopft), aus Glas oder sterilem Kunststoff mit ausgezogener Spitze und einem Nenninhalt von 1 bis 10 ml sowie einer Auslaßöffnung von 1,75 bis 3 mm Durchmesser.

4.2.4. Petri-Schalen, aus durchsichtigem, farblosem Glas oder sterilem Kunststoff mit einem Innendurchmesser am Boden von ca. 90—100 mm. Die Innenhöhe muß mindestens 10 mm betragen. Der Boden darf keine Unregelmäßigkeiten aufweisen, die das Auszählen der Kolonien beeinträchtigen könnten.

4.2.5. Sterilisieren der Glasgeräte

Die Glasgeräte müssen nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert werden:

a) mindestens eine Stunde bei 170 bis 175 °C in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.1);

b) mindestens 20 Minuten bei 121 °C ± 1 °C in einem Autoklaven (vgl. 4.1.2).

Bei Verwendung des Autoklaven ist eine ausreichende Bedampfung zu gewährleisten; so ist bei der Sterilisierung der Gefäße in Behältern darauf zu achten, daß diese Behälter nicht dicht verschlossen sind und Deckel oder Verschlüsse von Gefäßen oder Flaschen abgenommen werden.

Im Autoklaven sterilisierte Glasgeräte müssen durch Ausblasen des Dampfes getrocknet werden.

Pipetten werden in einem Heißluftsterilisator (vgl. 4.1.1) sterilisiert.

5. Nährböden

5.1. *Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar* als spezifischer Trockennährboden.

Bestandteile

Pepton	7 g,
Hefeextrakt	3 g,
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g,
Natriumchlorid (NaCl)	5 g,
Gallensalzmischung	1,5 g,
Neutralrot	0,03 g,
Kristallviolett	0,002 g,
Agar	10—15 g (je nach Geliereigenschaften),
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die einzelnen Bestandteile werden in Wasser gelöst und einige Minuten stehengelassen. Anschließend wird gründlich vermischt.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) geprüft und gegebenenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) nach dem Aufkochen auf $7,4 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt.

Der Nährboden wird bis zum Sieden erhitzt und von Zeit zu Zeit umgeschwenkt und sofort in Mengen von 100 bis 150 ml auf sterile Verdünnungsflaschen (vgl. 4.2.2) verteilt und im Wasserbad (vgl. 4.1.5) bei $45 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ temperiert.

Die Sterilität des Nährbodens ist zum Zeitpunkt der Verwendung (vgl. 6.4) zu kontrollieren.

Der Nährboden soll innerhalb von drei Stunden nach dem Ansetzen verwendet werden.

5.2. *Brillantgrün-Galle-Lactose-Nährbouillon* als Nachweis-Medium

Bestandteile

Pepton	10 g,
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	10 g,
Rindergalle, getrocknet	20 g,
Brillantgrün	0,0133 g,
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die Bestandteile werden in kochendem Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird mit einem pH-Meßgerät (vgl. 4.1.4) kontrolliert und erforderlichenfalls mit Natriumhydroxid-Lösung (mindestens 0,1 mol/l) oder Salzsäure (mindestens 0,1 mol/l) nach dem Sterilisieren auf $7,2 \pm 0,1$ bei 25 °C eingestellt.

Das Nährmedium wird in Mengen von 10 ml in mit Durham-Röhrchen beschickte Kulturröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen werden verschlossen.

Die Proben werden im Autoklaven (vgl. 4.1.2) 15 Minuten bei $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ sterilisiert.

Nach dem Sterilisieren dürfen die Durham-Röhrchen keine Luftblasen enthalten.

Der pH-Wert des Nährbodens wird kontrolliert.

Wird das Nährmedium nicht sofort verwendet, kann es im Dunkeln bei einer Temperatur von 0 bis 5 °C für die Dauer von höchstens einem Monat nach dem Ansetzen aufbewahrt werden.

5.3. *Wasserfreie Fertignährböden*

Die Nährböden (vgl. 5.1 und 5.2) können aus wasserfreien Fertignährböden hergestellt werden. Dabei sind die Gebrauchsanweisungen der Hersteller zu befolgen. Die Nährböden werden auf den vorgesehenen pH-Wert eingestellt und gemäß 5.1 und 5.2 aufgeteilt, aufgekocht bzw. sterilisiert und aufbewahrt.

6. Verfahren

6.1. *Verwendeter Nährboden*

Es wird Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar (vgl. 5.1) verwendet.

6.2. *Herstellung der Milchprobe*

Zur möglichst gleichmäßigen Verteilung der Mikroorganismen wird die Milchprobe durch rasches 25maliges Stürzen des Milchprobengefäßes gründlich durchmischt. Dabei ist eine Schaumbildung zu vermeiden oder so lange abzuwarten, bis sich der Schaum zersetzt hat. Zwischen dem Durchmischen und dem Ausgießen der Probenmenge dürfen höchstens drei Minuten vergehen.

6.3. *Beimpfen der Petri-Schalen*

3 ml Milchprobe (vgl. 6.2) werden überimpft, indem drei Petri-Schalen (vgl. 4.2.4) mit Hilfe einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.3) mit jeweils 1 ml Milchprobe beschickt werden.

6.4. *Gießen des Nährbodens*

Jeder beimpften Petri-Schale werden 12 ml Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar (vgl. 6.1) zugegeben.

Die Petri-Schalen werden nach dem Gießen ausreichend umgeschwenkt, damit die Kolonien nach dem Bebrüten gleichmäßig verteilt sind.

Zwischen dem Abschluß der Milchprobenherstellung und dem Ausgießen des Nährbodens dürfen höchstens 15 Minuten vergehen.

Zur Kontrolle der Sterilität wird eine unbeimpfte Petri-Schale mit 12 ml Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar angesetzt, wie er für die beimpften Schalen verwendet wird.

Die Petri-Schalen mit dem Nährboden werden auf einer sauberen, kühlen und horizontalen Fläche stehengelassen, bis der Nährboden verfestigt ist.

Nach völligem Erstarren werden mindestens 4 ml Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agar (vgl. 6.1) auf die Fläche des beimpften Nährbodens gegossen.

Erstarren lassen.

6.5. *Bebrütung der Petri-Schalen*

Die Petri-Schalen werden in den Brutschrank (vgl. 4.1.3) übergeführt. Sie sind mit dem Deckel nach unten zu bebrüten. Es dürfen höchstens sechs Schalen übereinander gestapelt werden. Die Stapel dürfen einander sowie die Wände und die Decke des Brutschranks nicht berühren.

Die Bebrütungstemperatur beträgt 30 ± 1 °C, die Bebrütungsdauer 24 ± 2 Stunden.

6.6. *Auszählung der Kolonien*

6.6.1. Die Kolonien der Petri-Schalen mit höchstens 150 Kolonien werden ausgezählt. Es werden die für coliforme Keime typischen dunkelroten Kolonien mit oder ohne ringförmigem Hof mit einem Durchmesser von mindestens 0,5 mm ausgezählt.

6.6.2. Falls einige oder alle Kolonien atypisches Aussehen haben (z. B. andere Farbe, Größe oder Form des Hofes als bei typischen Kolonien), so ist eine Bestätigungsprobe (vgl. 6.7) durchzuführen.

6.7. *Bestätigungsprobe*

Nach dem unter 6.6.2 beschriebenen Verfahren wird mit einer geeigneten Zahl (z. B. 3—5) atypischer Kolonien eine Bestätigungsprobe durchgeführt, bei der Röhrrchen mit Brillantgrün-Galle-Lactose-Nährbouillon (vgl. 5.2) mit Hilfe einer Impf-Öse (vgl. 4.1.6) beimpft werden. Diese Kulturröhrrchen werden 24 ± 2 Stunden lang bei 30 ± 1 °C bebrütet.

Der Nachweis coliformer Keime gilt als bestätigt, wenn diese Kolonien im Durham-Röhrrchen eine Gasbildung verursachen.

7. **Berechnung und Auswertung**

7.1. Die Petri-Schalen mit höchstens 150 Kolonien sind auszuwerten (vgl. 7.4).

7.2. Wird eine Bestätigungsprobe durchgeführt, so ist der Prozentsatz der bestätigten Kolonien coliformer Keime auf die Anzahl der Kolonien coliformer Keime umzurechnen.

7.3. Die Anzahl coliformer Keime je ml pasteurisierte Milch errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\sum C}{n},$$

hierin bedeuten:

ΣC = Summe aller Kolonien coliformer Keime (vgl. 7.1 in Verbindung mit 7.2), die bei der Untersuchung der Milchprobe (3 ml) gefunden wurden,

n = Probenmenge (vgl. 6.3) in Milliliter (3 ml).

Bei einer Koloniezahl von höchstens 100 wird das Auszählungsergebnis auf zwei Stellen gerundet. Ist die zu rundende Stelle eine 5, ist so zu runden, daß die links folgende Ziffer eine gerade Zahl ergibt.

Werden nur Koloniezahlen über 150, die jedoch ausgezählt werden können, gefunden, so wird das Ergebnis als „geschätzte Anzahl coliformer Keime je ml“ ausgedrückt.

8. **Zuverlässigkeit**

Ergebnisse internationaler Ringversuche liegen nicht vor.

VII. BESTIMMUNG DES GEHALTS AN SOMATISCHEN ZELLEN

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt zwei Referenzverfahren zur Auszählung somatischer Zellen:

- A. Mikroskopische Methode.
- B. Fluoreszenzoptische Methode.

A. Mikroskopische Methode

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren zur Auszählung somatischer Zellen in Rohmilch.

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt ferner das Verfahren zur Auszählung der Anzahl von Zellen in einer Milchprobe zur Eichung und Kontrolle der Genauigkeit der fluoreszenzoptischen Methode (vgl. B.1).

2. Begriffsbestimmung

Unter somatischen Zellen im Sinne dieses Verfahrens werden solche Zellen verstanden, die nach Anfärbung der Zellkerne mit Methylenblau deutlich erfaßt werden (z. B. Leukozyten und Epithelzellen).

3. Kurzbeschreibung

0,01 ml Milch wird auf einem Objektträger zu einer Fläche von 1 cm² ausgestrichen. Der Film wird getrocknet und angefärbt. Die Auszählung erfolgt unter dem Mikroskop. Die in einem bestimmten Bereich gefundene Anzahl somatischer Zellen wird zur Bestimmung der Zellenanzahl je ml mit dem Arbeitsfaktor multipliziert.

4. Reagenzien

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden.

Farblösung

Bestandteile

Methylenblau	0,6 g,
Ethanol — 99 %	54,0 ml,
1,1,1-Trichlorethan oder Tetrachlorethan	40,0 ml,
Eisessig	6,0 ml.

Achtung:

Tetrachlorethan ist giftig. Aufbereitung und Aufarbeitung müssen daher unter einem Abzug erfolgen.

Herstellung

Ethanol und 1,1,1-Trichlorethan oder Tetrachlorethan werden in einer Flasche vermischt und im Wasserbad auf 60 bis 70 °C angewärmt. Nach Zugabe von Methylenblau wird, sorgfältig durchmischt, in einem Kühlschrank 12 bis 24 Stunden lang bei einer Temperatur von 4 °C gekühlt und Eisessig zugesetzt. Die Farblösung wird über einen Filter mit einer Porengröße von höchstens 10 bis 12 µm filtriert und in einer luftdicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. Bei Ausflockung oder Sedimentierung wird vor der Verwendung nachfiltriert.

5. Geräte und Hilfsmittel

- 5.1. Mikroskop, mit 500- bis 1000facher Vergrößerung.
- 5.2. Mikrospritze 0,01 ml Nenninhalt, Genauigkeit mindestens $\pm 2\%$.

- 5.3. *Objektträger*, Abmessung 20 mm × 5 mm, mit Markierungen für den Ausstrich, oder Standardobjektträger mit Schablone 20 mm × 5 mm für den Ausstrich.
- 5.4. *Nivellierte Heizplatte* (30 bis 50 °C), zum Trocknen der Objektträger.
- 5.5. *Ventilator* (Fön), zum Trocknen des Ausstrichs.
- 5.6. *Wasserbad*, einstellbar auf eine Temperatur von 30 bis 40 °C zum Erwärmen der Milchprobe.
- 5.7. *Objektträger mit mikrometrischer Teilung*, Unterteilung 0,01 mm.

6. Verfahren

6.1. *Milchprobe*

Die Milchprobe muß innerhalb von 6 Stunden nach der Probenahme untersucht werden. Während der Aufbewahrung darf die Temperatur der Proben 6 °C nicht überschreiten. Ein Gefrieren ist zu vermeiden.

6.2. *Vorbereitung der Probe für die Untersuchung im Labor*

Die Proben werden im Wasserbad (vgl. 5.6) auf 30 bis 40 °C angewärmt. Dann wird gründlich durchmischt. Anschließend werden sie auf die Eichtemperatur der Mikrospritze (vgl. 5.2), z. B. 20 °C, temperiert.

6.3. *Vorbehandlung der Objektträger*

Die Objektträger (vgl. 5.3) werden gereinigt, beispielsweise mit Ethanol, mit staubfreiem Papier trockengewischt, abgeflammt und gekühlt. Sie werden in einer staubgeschützten Schachtel aufbewahrt.

6.4. *Probenausstrich*

0,01 ml der vorbereiteten Milch werden mit der Mikrospritze (vgl. 5.2) abgemessen. Der mit der Milch in Berührung kommende Teil der Spritze ist außen peinlich sauberzuhalten. Die Spritze wird auf den Objektträger (vgl. 5.3) aufgesetzt und zuerst die Fläche (20 mm × 5mm) umstrichen, die anschließend möglichst gleichmäßig ausgestrichen wird. Der Ausstrich wird auf einer nivellierten Heizplatte (vgl. 5.4) so lange fixiert, bis er völlig abgetrocknet ist.

Von jeder Milchprobe sind mindestens 2 Ausstriche anzusetzen und zu untersuchen.

6.5. *Anfärben der Ausstriche*

Die Ausstriche werden 10 Minuten lang in eine Farblösung (vgl. 4) getaucht und anschließend getrocknet, erforderlichenfalls mit einem Ventilator (vgl. 5.5). Danach werden die Ausstriche in Leitungswasser getaucht, bis der Farbüberschuß ausgewaschen ist. Anschließend erneut trocknen und staubgeschützt aufbewahren.

6.6. *Einjustieren des Gesichtsfelds*

Der Gesichtsfelddurchmesser ist mit Hilfe des Objektträgers mit mikrometrischer Teilung (vgl. 5.7) entsprechend der gewählten Vergrößerung (500 x — 1 000 x) einzujustieren.

7. Auszählung und Berechnung

7.1. *Auszählung der Zellen*

Dazu ist ein Mikroskop (vgl. 5.1) zu verwenden. Es werden nicht die Zellen, sondern nur die Zellkerne gezählt. Sie sind deutlich erkennbar; ausgezählt werden Zellkerne, von denen mindestens die Hälfte im Gesichtsfeld erfaßbar ist. Bei der Auszählung soll das mittlere Drittel des Ausstrichs streifen- oder gesichtsfeldweise durchgesehen werden; das Durchsehen von ausschließlich in den Randzonen des Ausstrichs gelegenen Streifen oder Gesichtsfeldern ist zu vermeiden. Das sorgfältige Ansetzen der Ausstriche sowie die Verlässlichkeit der Ergebnisse ist mindestens einmal im Monat durch Auszählen verschiedener Bereiche des Ausstrichs zu kontrollieren. Die Auszählung kann auch in der Weise erfolgen, daß für alle Teile des Ausstrichs repräsentative Gesichtsfelder ausgezählt werden.

7.2. *Mindestanzahl auszählender Zellen*

Seitdem die mikroskopische Zählung somatischer Zellen auch zur Standardisierung automatischer und mechanischer Auszählverfahren herangezogen werden kann, darf der Variationskoeffizient der Auszählungen identischer Proben nicht höher sein als der elektronischer Geräte. Dieser Variationskoeffizient einer Milchprobe mit 400 000 bis 600 000 Zellen/ml sollte 5 % nicht übersteigen.

Die Anzahl der von jeder Probe auszählenden somatischen Zellen muß entsprechend dem Gesetz der Poisson-Verteilung mindestens 400 betragen, damit das Kriterium der Wiederholbarkeit erfüllt ist.

Nach der Poisson-Verteilung gilt

$$M = V = s^2,$$

mit:

M = Mittelwert,

V = Varianz,

s = Standardabweichung.

Der Variationskoeffizient errechnet sich wie folgt:

$$VK = \frac{s \times 100\%}{M} \text{ oder } VK = \frac{100\%}{s} \text{ oder } VK = \frac{100\%}{\sqrt{M}},$$

M = Mittelwert der Anzahl der ausgezählten Partikel (Zellen) (z. B. 400 für VK = 5%).

7.3. Berechnung des Arbeitsfaktors

Bei Verwendung von 0,01 ml Milch errechnet sich der Arbeitsfaktor gemäß 7.3.1 oder 7.3.2.

7.3.1. Streifenweise Durchsicht des Ausstrichs

Die auszählenden Streifen haben eine Länge von jeweils 5 mm. Die Breite eines Streifens entspricht dem Durchmesser des Gesichtsfelds, das mit dem Objektträger mit mikrometrischer Teilung (vgl. 5.7) bestimmt werden kann.

$$\text{Arbeitsfaktor} = \frac{20 \times 100}{d \times b},$$

hierin bedeuten:

d = Durchmesser des Gesichtsfelds in mm,

b = Anzahl der vollständig ausgezählten Streifen.

7.3.2. Auszählung der Gesichtsfelder im mittleren Ausstrich-Drittel bzw. mit Hilfe eines Rasters

$$\text{Arbeitsfaktor} = \frac{20 \times 5 \times 100}{\frac{\pi \times d^2 \times s}{4}} = \frac{12\,732}{d^2 \times s},$$

darin sind:

d = Durchmesser des Gesichtsfelds in mm, bestimmt mit Hilfe der mikrometrischen Teilung des Objektträgers (vgl. 5.7),

s = Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder.

7.4. Berechnung des Zellgehalts

Zur Berechnung des Zellgehalts je ml Milch wird die Anzahl der ausgezählten somatischen Zellen (vgl. 7.1 und 7.2) mit dem Arbeitsfaktor (vgl. 7.3) multipliziert.

7.5. Zuverlässigkeit

Der Variationskoeffizient (vgl. 7.2) darf 5 % nicht überschreiten.

Ergebnisse internationaler Ringversuche zur Genauigkeit liegen nicht vor.

B. Fluoreszenzoptische Methode

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren, das nach entsprechender Eichung (vgl. A.1) zur Auszählung somatischer Zellen in Rohmilch, auch chemisch konserviert, verwendet werden kann.

2. **Begriffsbestimmung**

Unter somatischen Zellen im Sinne dieser Arbeitsvorschrift werden die Partikel verstanden, die nach Anfärbung der DNS im Zellkern und bei Festlegung eines bestimmten Schwellenwertes im Fluoreszenzmikroskop erfaßt werden.

3. **Kurzbeschreibung**

Ein Teil der Probe (z. B. 0,2 ml) wird mit der Pufferlösung und der Fluoreszenzlösung gründlich vermischt. Ein Teil dieser Mischung wird dünn auf eine rotierende Scheibe ausgestrichen, die als Objektträger für ein Fluoreszenzmikroskop dient.

Jede Zelle erzeugt einen elektrischen Impuls, der nach entsprechender Verstärkung registriert wird. Die Anzahl somatischer Zellen wird in 1 000 je ml ausgedrückt.

4. **Reagenzien**

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien zu verwenden; das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und von entsprechender Reinheit sein.

4.1. *Pufferlösung*

Bestandteile

Kalimhydrogenphthalat	51,0 g,
Kaliumhydroxid	13,75 g,
Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether (z. B. Triton X-100), Massenanteil 1 %	10 ml,
pH-Wert 5,7 bis 5,9. Wasser zum Auffüllen auf 10 000 ml.	

Herstellung

Die einzelnen Bestandteile werden vermischt. Unter luftdichtem Verschuß ist der Ansatz höchstens sieben Tage haltbar.

4.2. *Fluoreszierende Farblösung (Vorratslösung)*

Bestandteile

Ethidiumbromid	1,0 g,
Wasser zum Auffüllen auf 1 000 ml.	

Herstellung

Ethidiumbromid wird in Wasser gelöst. Bei Aufbewahrung in einem lichtgeschützten und luftdichtem Gefäß ist der Ansatz höchstens zwei Monate haltbar.

4.3. *Fluoreszierende Farblösung (Gebrauchslösung)*

20 ml der Vorratslösung (vgl. 4.2) werden mit der Pufferlösung (vgl. 4.1) zu 1 000 ml vermischt. Die Gebrauchslösung ist höchstens sieben Tage haltbar.

4.4. *Reinigungslösung*

Bestandteile

Pufferlösung (vgl. 4.1)	10 ml,
Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether (z. B. Triton X-100), 1 % Massenanteil	10 ml,
Ammoniak, 25 % Massenanteil	25 ml,
Wasser zum Auffüllen auf 10 000 ml.	

Herstellung

Die einzelnen Bestandteile werden vermischt. Der Ansatz ist höchstens 30 Tage haltbar.

5. **Geräte und Hilfsmittel**

5.1. *Zellzählgeräte* mit fluoreszenzoptischem Zählsystem.

Hinweis:

Das Gerät ist vor dem Gebrauch einzujustieren. Dabei wird ein Schwellenwert für die Erfassung im Verhältnis zur Menge der auszählenden Partikel festgelegt. Bei der Einstellung des Geräts sind die Gebrauchsanweisungen des Herstellers zu befolgen und Standardproben zu verwenden, deren Zellgehalt mit der mikroskopischen Methode bestimmt wurde (A).

- 5.2. Wasserbad mit Umwälzeinrichtung, einstellbar auf 40 ± 1 °C.
- 5.3. Probenröhrchen mit geeignetem Verschuß, ca 15 ml.
6. **Milchprobe**
- 6.1. Die Probe muß in einem Probenröhrchen (vgl. 5.3) kühl aufbewahrt werden. Die Untersuchung einer nicht chemisch konservierten Milchprobe darf frühestens 24 Stunden nach ihrer Gewinnung erfolgen, da ansonsten die Auszählung zu niedrig ausfällt. Die Lagertemperatur darf 6°C nicht überschreiten.
- 6.2. **Konservierung**
- Die chemische Konservierung muß innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Die Konservierung muß so schnell wie möglich nach der Probenahme durchgeführt werden.
- 6.2.1. Die chemische Konservierung der Proben kann durch Zusatz eines der folgenden Konservierungsmittel geschehen:
- Orthoborsäure
Die Endkonzentration der in der Probe enthaltenen Orthoborsäure darf 0,6 g/100 ml nicht überschreiten. Derart konservierte Proben können bei 6 bis 12 °C für weitere 24 Stunden aufbewahrt werden.
 - Kaliumdichromat
Die Endkonzentration von Kaliumdichromat darf 0,2 g/100 ml nicht überschreiten. Derartig konservierte Proben können bei 6 bis 12 °C für weitere 72 Stunden aufbewahrt werden.
 - Natriumacid
Die Probe kann mit Natriumacid in einer Endkonzentration von 0,024 g/100 ml konserviert werden, sofern sie unmittelbar nach der Gewinnung auf 6 bis 12 °C abgekühlt und binnen 48 Stunden nach der Probenahme ausgezählt wird.
 - Bronopol
Die Probe kann mit Bronopol in einer Endkonzentration von 0,05 g/100 ml konserviert werden, sofern sie nach der Gewinnung auf einer Lagertemperatur von 6 bis 12 °C gekühlt und binnen 72 Stunden nach der Probenahme ausgezählt wird.
- 6.2.2. Proben, die bereits mit Orthoborsäure konserviert wurden, dürfen bei Verwendung von Kaliumdichromat für weitere 48 Stunden aufbewahrt werden.
- Hinweis:*
Bei der Entsorgung von mit Kaliumdichromat konservierten Proben sind die jeweiligen örtlichen Bedingungen für das Einleiten von Abwasser zu beachten.
7. **Verfahren**
- 7.1. **Vorbehandlung der Proben**
- Die zu untersuchende Milch muß nach ihrer Gewinnung mindestens 24 Stunden bei etwa 2 bis 6 °C aufbewahrt werden. Die Auszählung von nichtvorbehandelten Proben am Tag der Milchgewinnung ist nicht ratsam, da die Ergebnisse zu niedrig ausfallen dürften. Ist die Zählung derartiger Proben dennoch erforderlich, so müssen diese mindestens drei Stunden zuvor mit Kaliumdichromat (vgl. 6.2.1) vorbehandelt werden.
- 7.2. **Vorbereitung**
- Die vorbehandelten Proben (vgl. 7.1) oder die mindestens einen Tag alten Proben werden im Wasserbad (vgl. 5.2) auf etwa 40 °C erwärmt. Anschließend werden die Proben bis zur Zählung bei Zimmertemperatur gehalten.
- 7.3. **Zählung der Zellen**
- Die Zellen werden mit Hilfe des Zellzählers (vgl. 5.1) innerhalb von 15 Minuten nach Beendigung der Erwärmung (vgl. 7.2) gezählt. Unmittelbar vor der Auszählung sind die Proben zur möglichst homogenen Verteilung der somatischen Zellen gründlich zu durchmischen.
- Die weitere Verdünnung und Aufbereitung der Proben wird im Zellzählgerät automatisch vorgenommen.

8. Zuverlässigkeit

Für die Wiederholbarkeit (r) bzw. Vergleichbarkeit (R) gibt es keine Ergebnisse aus internationalen Ringversuchen. Zuverlässigkeitsdaten sollen in Zukunft erstellt werden.

Die aus nationalen Ringversuchen stammenden Ergebnisse erlauben folgende Schätzungen:

Zellzahl zwischen 400 000 und 500 000 je ml:

— Standardabweichung für die Wiederholbarkeit:

$$s_r = 20\,000 \text{ Zellen je ml (entspricht einem Variationskoeffizienten von 5\% bis 4\%);}$$

— Standardabweichung für die Vergleichbarkeit:

$$s_R = 40\,000 \text{ Zellen je ml (entspricht einem Variationskoeffizienten von 10\% bis 8\%).}$$

9. Genauigkeit

Die Kontrolle der Genauigkeit wird unter Verwendung von Proben, deren Zellgehalt mit der mikroskopischen Methode in einem einzelstaatlichen Referenzlaboratorium bestimmt wurde, durchgeführt.

VIII. NACHWEIS VON ANTIBIOTIKA UND SULFONAMIDEN

ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt das Referenzverfahren für den Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in roher und hitzebehandelter Milch.

Das Referenzverfahren umfaßt zwei Teile:

A. Qualitatives Verfahren

Dieses Verfahren ist der erste Schritt zur Selektion von Milchproben, die Antibiotika und Sulfonamide enthalten. Das beschriebene Verfahren ist eines von zahlreichen ähnlichen Verfahren, bei denen grundsätzlich *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, ATCC 10149, als Testorganismus verwendet wird. Dieses Verfahren wurde wegen seiner Repräsentativität für diese Untersuchungen ausgewählt.

B. Verfahren für die Identifizierung und die quantitative Bestimmung von Penicillin

Diese Methode ist zur Bestätigung der Ergebnisse der „Methode A“, zur Identifizierung und der quantitativen Bestimmung von Penicillin zu verwenden.

A. Qualitatives Verfahren

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt den qualitativen Nachweis von Antibiotika und Sulfonamiden in roher und hitzebehandelter Milch entsprechend den nachstehenden Grenzwerten:

Nachweisgrenzen für die jeweiligen Antibiotika und Sulfonamide ⁽¹⁾

	Nachweisgrenzen	
	alle negativ	alle positiv
Benzylpenicillin	0,002	0,006
Ampicillin	0,002	0,005
Cloxacillin	0,015	0,035
Nafcillin	0,006	0,011
Tetracyclin	0,10	0,40
Oxytetracyclin	0,20	0,45
Chlortetracyclin	0,15	0,50
Chloramphenicol	7	15
Dihydrostreptomycin	4	13
Neomycin	1	22
Kanamycin	9	28
Bacitracin	0,06	0,14
Erythromycin	1	2,25
Rifamycin	0,01	0,14
Diaphenylsulfon	0,01	0,1
Sulfamethazin (Sulfadimidin)	0,5	1

⁽¹⁾ Angabe der Enzymaktivität von Benzylpenicillin und Bacitracin in Internationalen Einheiten je ml (I. E./ml), die aller anderen Antibiotika in µg/ml.

2. Begriffsbestimmung

Sofern keine Farbänderung des Nährbodens (vgl. 7.1) eintritt, enthält die Milchprobe Antibiotika bzw. Sulfonamide.

3. Kurzbeschreibung

Ein Agar-Nährboden, der mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, ATCC 10149 (vgl. 5.4.1), mit guter Breitbandaktivität und spezifischer Hemmwirkung gegenüber Penicillin sowie mit Redoxindikator beimpft wurde, wird mit einer Milchprobe und Nährstoffen beschickt. Beim Bebrüten vermehren sich die Mikroorganismen und bewirken eine Säuerung, was durch den Farbumschlag des Redoxindikators von Violett nach Gelb nachgewiesen werden kann. Treten in der Milch Hemmstoffe auf, so bleibt die violette Farbe des Redoxindikators unverändert.

4. Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborausstattung, insbesondere:

4.1. Geräte

4.1.1. Brutschrank, einstellbar auf eine konstante Temperatur von 64 ± 1 °C.

4.1.2. Wasserbad, einstellbar auf 64 ± 1 °C.

4.1.3. Gestell für Röhrchen bzw. Ampullen.

4.1.4. Mikrospritze, mit Einweg-Spitzen, zum Abmessen von 0,1 ml.

4.1.5. Pinzetten

4.1.6. Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf 170 bis 175 °C.

4.1.7. Autoklav, einstellbar auf 121 °C ± 1 °C.

4.1.8. pH-Meßgerät

4.2. Glasgeräte

4.2.1. Probenflaschen mit geeigneten Verschlüssen.

Anmerkung:

Bei einigen Gummistopfen treten Hemmstoffe in den Flaschenhals aus.

4.2.2. Petri-Schalen aus durchsichtigem, farblosem Glas oder sterilem Kunststoff mit flachem Boden gleichmäßiger Dicke, Innendurchmesser mindestens etwa 140 mm.

4.2.3. Flaschen, 250 ml Nenninhalt.

4.2.4. Pipetten (mit Baumwolle verstopft), aus Glas oder sterilem Kunststoff, 1 ml und 10 ml Nenninhalt.

4.2.5. Glasstapel

4.2.6. Röhrchen oder Ampullen, Innendurchmesser 8 mm, mit Kappen oder Stopfen.

4.2.7. Sterilisieren der Glasgeräte

Die Glasgeräte sind nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

a) mindestens eine Stunde bei gleichbleibender Temperatur von 170 bis 175 °C in einem Heißluft-Sterilisator (vgl. 4.1.6);

b) mindestens 20 Minuten bei gleichbleibender Temperatur von 121 ± 1 °C in einem Autoklaven (vgl. 4.1.7).

Bei Verwendung eines Autoklaven ist ein ausreichender Dampfstrom zu gewährleisten; die Glasgeräte dürfen nicht in geschlossenen Behältern sterilisiert werden, und von Gefäßen oder Flaschen sind die Kappen abzunehmen.

Die im Autoklaven sterilisierten Glasgeräte sind durch Ausblasen des Dampfes zu trocknen.

Pipetten werden in einem Heißluft-Sterilisator sterilisiert.

5. Nährböden, Standardlösungen, Testorganismus usw.

Die Nährbodenbestandteile müssen für bakteriologische Zwecke geeignet sein. Das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und von zumindest entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Hemmstoffe gegen Mikroorganismen enthalten.

5.1. Nährböden

5.1.1. Nähragar

Bestandteile

Hefeextrakt	2 g,
Pepton	5 g,
Fleischextrakt	1 g,
Natriumchlorid	5 g,
Agar	10—15 g, je nach Gelieereigenschaften,
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die Bestandteile werden in Wasser gelöst, bis zum Sieden erhitzt und von Zeit zu Zeit geschwenkt. Der pH-Wert ist so einzustellen, daß er nach dem Sterilisieren bei 25 °C $7,4 \pm 0,1$ beträgt. Zur Herstellung von Schrägagar werden je 10 ml in Proberöhrchen oder 100 ml in Flaschen gegeben.

Der Nährboden wird bei 121 °C ± 1 °C 15 Minuten sterilisiert.

5.1.2. Agar-Nährboden

Bestandteile

Natriumchlorid	2 g,
Agar	15 g,
Wasser	1 000 ml,

Trimethoprim oder Tetroxoprim-Lösung (vgl. 5.1.3) 10 ml.

Herstellung

Die Bestandteile werden ohne Trimethoprim bzw. Tetroxoprim in Wasser durch Kochen und Schütteln gelöst. Trimethoprim oder Tetroxoprim wird zugesetzt und die Lösung 15 Minuten lang bei 121 ± 1 °C sterilisiert. Der pH-Wert wird so eingestellt, daß er nach dem Sterilisieren bei 25 °C $7,0 \pm 0,1$ beträgt.

Hinweis:

Patentrechtliche Vorschriften über die Verwendung antifolathaltiger Nährböden sind zu beachten.

5.1.3. Trimethoprim- oder Tetroxoprim-Lösung

Bestandteile

Trimethoprim	5 mg,
oder Tetroxoprim	30 mg,
Ethanol — 96 %	5 ml/30 ml,
Wasser	zu 1 000 ml.

Herstellung

Trimethoprim wird in 5 ml Ethanol (oder Tetroxoprim in 30 ml) gelöst und mit Wasser aufgefüllt.

5.1.4. Nährstofflösung

Bestandteile

Hefeextrakt	0,75 mg,
Glucose	5,0 mg,
lösliche Stärke	8,0 mg,
Bromkresolrot	0,025 mg,
Wasser	zu 50 ml.

Herstellung

Die Nährstoffe und der Indikator werden — gegebenenfalls unter Erhitzen — in Wasser gelöst, sterilisiert und filtriert. Dieses Nährsubstrat ist als Fertignährsubstrat in Tablettenform erhältlich.

5.2. Penicillin-Standardlösungen

5.2.1. In einer verschließbaren, sterilen Flasche wird aus kristallinem Natrium- oder Kaliumbenzylpenicillin und sterilem destilliertem Wasser eine *Penicillin-Standardlösung* mit einer Konzentration von 60 µg/ml (≈ 100 I.E./ml) hergestellt.

5.2.2. Aus 1,25 ml Penicillin-Lösung (vgl. 5.2.1) und 1 000 ml sterilem destilliertem Wasser wird eine *Penicillin-Gebrauchslösung* mit einer Konzentration von 0,075 µg/ml ($\approx 0,125$ I.E./ml) hergestellt.

5.2.3. Aus 4 ml Penicillin-Gebrauchslösung (vgl. 5.2.2) und 71 ml hemmstofffreier Milch (vgl. 5.3) werden durch Mischen 75 ml einer *Penicillin-Standardlösung* mit einer Penicillin-Konzentration von 0,004 µg/ml ($\approx 0,0067$ I.E./ml) hergestellt.

- 5.2.4. Die Penicillin-Lösungen nach 5.2.1 bis 5.2.3 dürfen nur am Tag der Herstellung verwendet werden.
- 5.3. *Hemmstofffreie Milch*
Aus Magermilchpulver, das sich bei vorhergegangenen Untersuchungen als hemmstofffrei erwiesen hat, und sterilem destilliertem Wasser wird ein 10%iges *hemmstofffreies Milchsubstrat* als Kontrollprobe hergestellt. Alternativ dazu kann eine ausreichende Menge frischer Anlieferungsmilch, die sich bei vorangegangenen Untersuchungen als hemmstofffrei erwiesen hat, in Flaschen eine Stunde lang bei einer Temperatur von 100 °C gehalten und anschließend für einen Zeitraum von höchstens einer Woche im Kühlschrank bei 0 bis 6 °C aufbewahrt werden.
- 5.4. *Testorganismus*
- 5.4.1. Als Testorganismus wird *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, Stamm ATCC 10149, verwendet. Der Stamm ist identisch mit dem Stamm C 953.
- 5.4.2. Es wird eine *Stammkultur* für die Erhaltung des Teststamms angesetzt. Der Teststamm wird auf den Schrägagar-Nährboden (vgl. 5.1.1) gehalten. Der Schrägagar wird auf der Oberfläche streifenweise mit einer Öse des Teststamms beimpft und 48 Stunden lang bei 63 ± 1 °C aerob bebrütet. Nach dem Bebrüten wird das Röhrchen mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen. Die so gewonnene Stammkultur kann mehrere Monate lang im Kühlschrank bei 0 bis 5 °C aufbewahrt werden.
- 5.5. *Teststamm (Sporensuspension)*
- 5.5.1. 20 ml des aufgeschmolzenen Nähragars (vgl. 5.1.1) werden unter aseptischen Bedingungen in eine sterile Petri-Schale (vgl. 4.2.2) gebracht und auf Raumtemperatur gekühlt.
- 5.5.2. Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.4) werden 5 ml steriles destilliertes Wasser in ein Röhrchen mit Stammkultur (vgl. 5.4.2) gegeben und die Keime unter Verwendung einer sterilen Öse von dem Schrägagar abgeschwemmt. Diese Abschwemmsuspension ist bei 0 bis 5 °C aufzubewahren und innerhalb von 36 Stunden zu verwenden.
- 5.5.3. Mit einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.4) werden 0,5 ml der Sporensuspension (vgl. 5.5.2) auf eine Petri-Schale (5.5.1) gegeben und mit einem gebogenen Glasstäbchen gleichmäßig ausgestrichen. Die Kultur wird 16 bis 18 Stunden bei 63 ± 1 °C (vgl. 4.1.1) bebrütet.
Bei Verwendung einer Stammkultur (vgl. 5.4.2) oder einer über 36 Stunden alten Kultur soll mindestens zweimal und in einem Abstand von höchstens 36 Stunden abgeimpft werden.
- 5.5.4. Die Petri-Schale (vgl. 5.5.3) wird mit Hilfe einer sterilen Pipette (vgl. 4.2.4) mit 10 ml destilliertem Wasser beschickt; die Keime werden mit Hilfe eines Glasstäbchens in die Suspension abgeschwemmt.
Die Abschwemmsuspension wird in eine Flasche (vgl. 4.2.3) mit 250 ml sterilem destilliertem Wasser gegeben. Die Flasche wird verschlossen und gründlich geschüttelt. Kulturen, die nicht sofort abgeimpft werden, sind im Kühlschrank bei 0 bis 6 °C aufzubewahren.
- 5.5.5. Die Abschwemmsuspension muß nach einer Bebrütung von 16 bis 18 Stunden bei 63 ± 1 °C auf Plate-Count-Agar-Nährboden eine Lebendkeimdichte von 5 bis 10 Millionen je ml aufweisen. Die Abschwemmsuspension muß eine gleichmäßige Trübung zeigen und ist zu verwerfen, falls Niederschläge oder Sedimente auftreten; in diesem Fall ist die Stammkultur (vgl. 5.4.2) erneut abzuschwemmen.
- 5.6. *Herstellung des Testsystems (Röhrchen/Ampulle)*
- 5.6.1. Der Agar-Nährboden (vgl. 5.1.2) wird aufgeschmolzen und auf 55 °C gekühlt.
- 5.6.2. Ein Teil frische Abschwemmsuspension (vgl. 5.5.4) wird in einem Röhrchen oder in einer Flasche mit fünf Teilen Agar-Nährboden (vgl. 5.6.1) versetzt und gründlich durchmischt.
- 5.6.3. Ein steriles Röhrchen oder eine sterile Ampulle (vgl. 4.2.6) wird mit 0,3 ml beimpften Nährboden (vgl. 5.6.2) zur Bildung einer Schicht von 5 mm Dicke beschickt, mit einem Stopfen oder einer Kappe oder durch Schmelzen der Spitze verschlossen, in senkrechter Stellung bis zum Erstarren abkühlen gelassen und dann mindestens 12 Stunden lang aufbewahrt.
- 5.6.4. Die Testsysteme können am gleichen Tag verwendet, aber auch mehrere Monate lang aufbewahrt werden, sofern sie unverzüglich nach dem Ansetzen gekühlt und bei 0 bis 6 °C gehalten werden.
6. *Verfahren*
- 6.1. Die Proben müssen so schnell wie möglich, am besten innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme, untersucht werden und sind bis zur Analyse bei einer Temperatur von 0 bis 5 °C aufzubewahren. Können die Proben nicht innerhalb von 24 Stunden untersucht werden, so müssen sie tiefgefroren werden (-30 °C bis -15 °C), um die Inaktivierung des Penicillins so gering wie möglich zu halten.

- 6.2. Jede Probe/ Ampulle (vgl. 5.6) wird lesbar und unverwischbar gekennzeichnet. Der Verschuß bzw. Stopfen wird entfernt. Eine für die durchzuführenden Untersuchungen und Kontrollen (vgl. 5.2 und 5.3) ausreichende Zahl wird in einem geeigneten Gestell (vgl. 4.1.3) bereitgestellt.
- 6.3. Jedes Röhrchen/ Ampulle wird mit 50 µl Nährstofflösung (vgl. 5.1.4) beschickt.
- 6.4. Die Milchprobe wird gründlich durchmischt und mit der Microspritze (vgl. 4.1.4) in einer Menge von 0,1 ml dem entsprechend gekennzeichneten Röhrchen oder der Ampulle zugesetzt. Für jede zu verimpfende Probe ist eine keimfreie Einwegspritze zu verwenden.
- 6.5. Der Arbeitsgang gemäß 6.4 wird unter Verwendung der Penicillin-Standardlösung mit 0,004 µg/ml (\pm 0,0067 I.E./ml) Penicillin anstelle der Milchprobe (vgl. 5.2.3) in gleicher Weise durchgeführt.
- 6.6. Der Arbeitsgang gemäß 6.4 wird unter Verwendung von hemmstofffreiem Milchsubstrat (vgl. 5.3) als Parallelprobe anstelle der Milchprobe in gleicher Weise durchgeführt.
- 6.7. Die Röhrchen/ Ampullen werden verschlossen und in dem Gestell im Wasserbad mindestens zweieinhalb bis zweidreiviertel Stunden bei $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vgl. 4.1.2) gehalten.
- 6.8. Das Gestell mit den Röhrchen/ Ampullen wird aus dem Wasserbad genommen.
- 6.9. Die Farbe des Testmediums (vgl. 7) wird festgestellt.

7. Auswertung der Ergebnisse

- 7.1. Eine Violettfärbung des Nährbodens bei einer der Milchproben oder einer Parallelprobe gilt als Nachweis für die Anwesenheit von Antibiotika oder Sulfonamiden (entsprechend den Positivwerten gemäß Tabelle auf Seite 39) in der Probe. Als Nachweis der ausreichenden Empfindlichkeit des Testsystems darf in den Röhrchen/ Ampullen mit Penicillin-Standardlösung (vgl. 6.5) kein Farbumschlag eintreten.
- 7.2. Eine teilweise Violettfärbung des Nährbodens oder eine unregelmäßige Färbung bei einer der Milchproben gilt als Nachweis für die Anwesenheit von Hemmstoffen (zwischen Negativ- und Positivwerten gemäß der Tabelle auf Seite 39) in der Probe.
- 7.3. Eine Gelbfärbung des Nährbodens bei einer der Milchproben oder Kontrollproben gilt als Nachweis für die Abwesenheit von Hemmstoffen.
- 7.4. Tritt in allen Probenröhrchen/ Ampullen, einschließlich der Negativkontrollen eine Violettfärbung ein, so enthalten die Röhrchen/ Ampullen keine lebenden Keime; in diesem Fall sind die Proben mit frisch angesetztem Testmaterial erneut zu prüfen.

8. Bestätigung der Ergebnisse

- 8.1. Alle Proben mit Befunden gemäß 7.1 und 7.2 werden gemäß der „Methode B“ bestätigt.
Werden die Milchproben bis zur Bestätigung aufbewahrt, so müssen sie tiefgefroren werden, damit die Antibiotika nicht ihre Wirkung einbüßen.

B. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Penicillin

1. Umfang und Anwendungsbereich des Bestätigungstests

Diese Arbeitsvorschrift beschreibt den Bestätigungstest für Penicillin oder andere Antibiotika sowie das Verfahren zur Bestimmung der Penicillin-Konzentration in Milchproben mit positivem (vgl. A.7.1) oder zweifelhaftem (vgl. A.7.2) Befund.

Nachweisgrenzen für einige Antibiotika bei diesem Verfahren

Vgl. A.1

Begriffsbestimmung

- 2.1. Zeigt die nach dem beschriebenen Verfahren behandelte Milchprobe eine klare Hemmzone von mindestens 2 mm, so enthält die Milchprobe Antibiotika bzw. Sulfonamide.

2.2. Zeigt eine Antibiotika bzw. Sulfonamide enthaltende (vgl. 2.1) und mit Penicillinase (Betalactamase) versetzte Milchprobe keine klare Hemmzone oder eine klare Hemmzone mit geringerem Durchmesser als die penicillinasefreie Probe, so handelt es sich bei dem Hemmstoff entweder um Penicillin oder um ein Gemisch aus Penicillin und einem weiteren Antibiotikum bzw. Sulfonamid.

2.3. Wird die Zone nicht mit Penicillinase (vgl. 2.2) inaktiviert, so handelt es sich bei dem in der Milchprobe enthaltenen Hemmstoff nicht um Penicillin, sondern möglicherweise um einen anderen Rückstand (vgl. Richtlinie 85/397/EWG, Anhang A Kapitel VI Teil A Nummer 1 Buchstabe f) und Nummer 2 Buchstabe b).

Eine Reihe von halbsynthetischen Penicillinen, z. B. Natriumcloxacillin, werden nicht oder nur teilweise durch Penicillinase inaktiviert oder sind dagegen völlig resistent, so daß sie nicht als Penicillin nachgewiesen werden können (vgl. 7.3).

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. Die Größe dieser Hemmzone hängt unter anderem von Konzentration und Art des Hemmstoffes in der Milch ab.

4. Geräte, Glasgeräte und Hilfsmittel

4.1. Geräte

4.1.1. Vgl. A.4.1.

4.1.2. Wasserbad, einstellbar auf eine Temperatur von $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Glasgeräte

Vgl. A.4.2.

4.3. Papierblättchen, hemmstofffrei, 9 bis 13 mm Durchmesser, zur Absorption von etwa 130 mg Milch (Aufbewahrung vorzugsweise im Exsikkator).

5. Nährböden, Standardlösungen, Penicillinase-Lösung, Reagenzien, Testorganismus usw.

Die Nährbodenbestandteile müssen für bakteriologische Zwecke geeignet sein. Das verwendete Wasser muß entweder in Glasgeräten destilliert oder entmineralisiert und mindestens von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Hemmstoffe gegen Mikroorganismen enthalten.

5.1. Nährböden

5.1.1. Nähragar (vgl. A.5.1.1)

5.1.2. Nährboden zum Nachweis von Hemmstoffen

Bestandteile

Hefeextrakt	2,5 g,
Caseintrypton	5 g,
Glucose	1 g,
Trimethoprim- oder Tetroxoprim-Lösung (vgl. A.5.1.3)	10 ml,
Agar	10—15 g, je nach Geliereigenschaften,
Wasser	1 000 ml.

Herstellung

Die festen Bestandteile werden unter Erhitzen und Rühren vollständig gelöst und anschließend mit Trimethoprim- oder Tetroxoprim-Lösung versetzt. Nach Zusetzen der Trimethoprim- oder Tetroxoprim-Lösung wird der pH-Wert so eingestellt, daß er nach dem Sterilisieren $8,0 \pm 0,1$ bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ beträgt. Der Nährboden wird 15 Minuten bei $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ sterilisiert.

5.2. Penicillin-Standardlösungen in Milch

Vgl. A.5.2.

Für den quantitativen Nachweis von Hemmstoffen (vgl. 8) werden mit hemmstofffreier Milch (vgl. A.5.3) Penicillin-Standardlösungen folgender Konzentration angesetzt:

- a) 0,004 µg/ml (\pm 0,0067 I.E./ml),
- b) 0,006 µg/ml (\pm 0,01 I.E./ml),
- c) 0,03 µg/ml (\pm 0,05 I.E./ml),
- d) 0,06 µg/ml (\pm 0,1 I.E./ml).

5.3. *Penicillinase-Lösung*

- 5.3.1. Es wird soviel Penicillinase (Betalactamase) in sterilem destilliertem Wasser gelöst, daß sich eine Konzentration von 1 000 E/ml ergibt. Diese Lösung, die vorzugsweise in Portionen abgefüllt werden sollte, darf höchstens vier Wochen bei etwa 0 bis 5 °C aufbewahrt werden.

Anmerkung:

Für Penicillinase gibt es keine einheitlichen internationalen Festlegungen. Für dieses Verfahren gilt die Voraussetzung, daß 10 Einheiten Penicillinase zur Inaktivierung von 0,6 µg (= 1 I.E.) Penicillin ausreichen. Bei Penicillinase mit unbekannter Aktivität muß geprüft werden, ob diese Voraussetzung erfüllt ist. Anderenfalls muß die Konzentration der Penicillinase-Lösung entsprechend geändert werden.

- 5.3.2. Anstelle der Penicillinase-Lösung können handelsübliche Penicillinase-Blättchen verwendet werden, sofern sie nachweislich die geeignete Menge Penicillinase enthalten.

5.4. *Testorganismus*

Vgl. A.5.4.

5.5. *Teststamm (Sporensuspension)*

Vgl. A.5.5.

5.6. *Herstellung des Testsystems*

- 5.6.1. Der Nähr-Agar für den Hemmstoffnachweis (vgl. 5.1.2) wird aufgeschmolzen und auf 55 °C abgekühlt.

- 5.6.2. Ein Teil der frischen Sporensuspension (vgl. 5.5) wird in einer Flasche mit einer zur Erzielung einer geeigneten Keimdichte erforderlichen Menge des Nährbodens für den Hemmstoffnachweis (vgl. 5.1.2) versetzt und gründlich durchmischt.

- 5.6.3. Der beimpfte Test-Nährboden (vgl. 5.6.2) wird in einer Schichtdicke von 0,6 bis 0,8 mm in eine sterile, auf 55 °C erwärmte Petri-Schale (vgl. A.4.2.2) gegossen. Um eine Schichtdicke von 0,8 mm zu erhalten, sind bei Petri-Schalen mit einem Innendurchmesser von 140 mm etwa 15 ml Nährboden erforderlich.

- 5.6.4. Zur Verfestigung des Agars werden die Petri-Schalen mit abgenommenen Deckeln auf eine kalte, nivellierte Fläche gestellt. Nach Erstarren des Nährbodens werden die Petri-Schalen mit Deckeln verschlossen und umgedreht, um die Kondensation auf der Oberfläche des Agars gering zu halten.

- 5.6.5. Die so hergestellten Testplatten werden vorzugsweise am Tag der Herstellung verwendet, können jedoch bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden, sofern sie sofort nach der Herstellung in einem verschlossenen Polyethylenbeutel bei etwa 5 °C aufbewahrt werden.

- 5.6.6. Zur Kennzeichnung der Proben wird der Boden der Testplatten markiert.

6. *Verfahren*

6.1. *Herstellung der Probe*

- 6.1.1. Proben mit positivem oder zweifelhaftem Befund gemäß „Methode A“ (vgl. A.7.1 und A.7.2) sind in einer Kontrollanalyse qualitativ und quantitativ auf Penicillin zu untersuchen.

- 6.1.2. Zunächst sind diese Milchproben 10 Minuten auf 80 ± 1 °C zu erwärmen, damit eine Beeinflussung des Ergebnisses durch thermolabile, unspezifische Hemmstoffe ausgeschlossen ist.

- 6.1.3. 10 ml der gründlich durchgemischten, hitzebehandelten Milchprobe werden in eine geeignete Weithalsflasche verbracht, mit etwa 0,4 ml Penicillinase-Lösung (vgl. 5.3) versetzt und gründlich durchgemischt.

- 6.2. *Hemmstoffnachweis*
- 6.2.1. Ein Papierblättchen (vgl. 4.3) wird mit einer sauberen, trockenen Pinzette in die Milchprobe (vgl. 6.1.2) getaucht. Milchüberschuß wird durch Abstreifen des Blättchens an der Probenflasche entfernt. Das Blättchen wird auf die Oberfläche der Testplatte (vgl. 5.6) gelegt und mit der Pinzette leicht angedrückt.
- 6.2.2. Die mit den verschiedenen Milchproben getränkten Blättchen müssen mindestens 20 mm voneinander und mindestens 10 mm vom Rand entfernt sein.
- 6.2.3. Zur Kontrolle der Empfindlichkeit müssen mit den Penicillin-Standardlösungen (vgl. 5.2a)) getränkte Blättchen (vgl. 4.3) zu einem Anteil von mindestens 2% der Anzahl der Milchproben-Blättchen nach dem Zufallsprinzip unter die Milchproben-Blättchen verteilt werden, wobei für jede Untersuchung mindestens 5 Standardblättchen zu verwenden sind.
- 6.2.4. Nachdem alle Blättchen in zufälliger Reihenfolge auf dem Agar verteilt und ihre Lage protokolliert wurde, werden die Platten umgedreht und 2,5 bis 5 Stunden bei 63 ± 1 °C bebrütet.
- 6.2.5. Nach der Bebrütung werden die Platten vor einer geeigneten Lichtquelle auf Hemmzonen um die Blättchen untersucht. Die klaren Hemmzonen werden gemessen.
- 6.2.6. Die mit Penicillin-Standardlösung (vgl. 6.2.3) getränkten Blättchen müssen Hemmzonen von mindestens 2 mm Durchmesser aufweisen.
- 6.2.7. Das Auftreten klarer Hemmzonen um die Milchproben-Blättchen in der Größe gemäß 6.2.6 oder größer gilt als Nachweis für die Anwesenheit von Hemmstoffen gegenüber dem Testorganismus.
- 6.3. *Qualitativer und quantitativer Nachweis des Hemmstoffs*
- 6.3.1. Der Arbeitsgang gemäß 6.2.1 wird mit der hitzebehandelten Milchprobe (vgl. 6.1.2) und mit der penicillinasebehandelten Probe (vgl. 6.1.3) in gleicher Weise durchgeführt. Alternativ zur Beimpfung von 10 ml der Milchprobe mit Penicillin kann auch ein vorbehandeltes Penicillinase-Blättchen (vgl. 5.3.2) mit dieser Probe getränkt und auf die Testplatte gelegt werden.
- 6.3.2. Der Arbeitsgang 6.2.1 wird für jede der Penicillin-Standardlösungen gemäß 5.2 Buchstaben a) bis d) in gleicher Weise durchgeführt.
- 6.3.3. Die mittleren Durchmesser der Hemmzonen um Proben, Penicillinase-Kontrollen und Penicillin-Standardlösungen werden bestimmt.
7. *Auswertung der Ergebnisse (vgl. 2)*
- 7.1. Wenn sich um das Blättchen mit der Penicillinase-Kontrolle keine klare Hemmzone, jedoch um das mit der Milchprobe getränkte Blättchen eine Hemmzone gebildet hat, die mindestens ebenso groß und größer als die Hemmzone um das mit der Penicillin-Standardlösung (vgl. 5.2a)) getränkte Blättchen ist, so entspricht die Konzentration der in der Probe enthaltenen Hemmstoffe einer Natrium- bzw. Kaliumbenzylpenicillin-Konzentration von mindestens 0,004 µg/ml.
- 7.2. Wenn der mittlere Durchmesser der klaren Hemmzone um das penicillinasegetränkte Blättchen ebenso groß ist wie der mittlere Durchmesser der klaren Hemmzone um das mit der Milchprobe getränkte Blättchen, so enthält diese Milch Hemmstoffe, die mit der in diesem Verfahren verwendeten Penicillinase-Konzentration nicht inaktiviert werden können.
- 7.3. Wenn die klare Hemmzone um das penicillinasegetränkte Blättchen einen kleineren mittleren Durchmesser aufweist als die um das Blättchen mit der gemäß 6.1.2 hitzebehandelten Milchprobe, so enthält die Milchprobe Penicillin und andere Antibiotika bzw. Sulfonamide, außer Penicillin oder halbsynthetisches Penicillin, die mit der in diesem Verfahren verwendeten Penicillinase-Konzentration nicht nachgewiesen werden können. Synthetische Penicilline, wie Natriumcloxacillin, werden unter diesen Analysenbedingungen nicht ohne weiteres durch Penicillinase inaktiviert und können daher als andere Hemmstoffe als Penicillin eingestuft werden.
- Anmerkung:*
- Andere Hemmstoffe als Penicillin können gegebenenfalls mit geeigneten Verfahren nachgewiesen werden.
8. *Quantitativer Nachweis von Penicillin*
- 8.1. Der quantitative Nachweis von Penicillin kann entweder durch Aufstellung einer Standardkurve oder rechnerisch anhand der mit den Penicillin-Standardlösungen (vgl. 5.2a)—d) ermittelten Hemmzonen Durchmesser bestimmt werden.

8.2. *Aufstellung einer Standardkurve*

Da der Logarithmus der Penicillin-Konzentration proportional zum Durchmesser der Hemmzonen ist, kann die entsprechende Standardkurve durch Auftragen der Hemmzonendurchmesser auf die einfach geteilte Abszissenachse und der Penicillin-Konzentrationen auf die logarithmisch geteilte Ordinatenachse aufgestellt werden. Für die Hemmzonendurchmesser werden die errechneten Mittelwerte der Paralleltests herangezogen. Die Hemmzonendurchmesser werden in Abhängigkeit von den Penicillin-Standardkonzentrationen aufgetragen, und die Standardkurve wird gezeichnet.

8.3. *Berechnung*

Anhand der Hemmzonendurchmesser können die Penicillin-Konzentrationen in der Milchprobe mit Hilfe der Gleichung errechnet oder mit Hilfe der Standardkurve bestimmt werden. Für eine genaue Bestimmung muß der Radius der Hemmzonen mindestens das Doppelte, jedoch weniger als das Fünffache des Blättchenradius ausmachen.

9. *Auswertung*

9.1. Die Ergebnisse werden als Penicillingehalt größer oder gleich $0,004 \mu\text{g/ml}$ (oder durch Angabe der bestimmten Konzentration) oder als Gehalt an anderen Hemmstoffen als Penicillin ausgedrückt.

9.2. *Wiederholbarkeit (r) und Vergleichbarkeit (R)*

Zahlenwerte hierfür liegen nicht vor und sind entbehrlich, da ein Vergleichsstandard herangezogen wird.

IX. BESTIMMUNG PATHOGENER KEIME**1. Umfang und Anwendungsbereich**

Nach Maßgabe der Vorschriften gemäß Anhang A Kapitel VII Nummer 2 der Richtlinie 85/397/EWG beschreibt diese Arbeitsvorschrift das obligatorische Verfahren zur Untersuchung pasteurisierter Milch auf pathogene Keime.

2. Begriffsbestimmung

Die Untersuchung muß sich auf die am häufigsten mit Lebensmittelvergiftungen in Verbindung gebrachten Bakterien beziehen.

Die Pasteurisierung verhindert das Auftreten thermolabiler pathogener Keime in Milch. Sofern die festgelegten Normen gemäß Anhang A Kapitel VII Nummer 2 der Richtlinie 85/397/EWG für die Keimzahlbestimmung bei 30 °C und 21 °C, die Phosphataseaktivität und den Colititer erfüllt sind, ist eine spezifische Untersuchung auf pathogene Keime nur dann erforderlich, wenn der Verdacht besteht, daß die Milch als Ursache für Fälle von Lebensmittelvergiftungen in Frage kommt.

3. Verfahren

Verfahren und Häufigkeit von Untersuchungen werden von den einzelstaatlichen Behörden im Hinblick auf die Ausstellung von Genußtauglichkeitsbescheinigungen für Milch für den innergemeinschaftlichen Handel festgelegt. Für die Bestimmung pathogener Keime gelten die international anerkannten Methoden.

4. Untersuchungsbericht

Im Untersuchungsbericht sind die Ergebnisse für jeden einzelnen pathogenen Keim wie folgt anzugeben:

Keimzahl je ml Milch oder „Anwesenheit“ oder „Abwesenheit“ in dem bei der verwendeten Methode vorgeschriebenen Volumen pasteurisierter Milch. Die verwendete Methode muß in dem Untersuchungsbericht im einzelnen beschrieben werden.
