

DIN EN ISO 11133



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 11133:2018-07

**Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser –
Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von
Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01
+ Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020);
Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020**

Microbiology of food, animal feed and water –
Preparation, production, storage and performance testing of culture media
(ISO 11133:2014, Corrected version 2014-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020);
German version EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020

Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau –
Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture
(ISO 11133:2014, Version corrigée 2014-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020);
Version allemande EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020

Gesamtumfang 143 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)
DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“, Unterkomitee SC 9 „Microbiology“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“, Unterkomitee SC 4 „Microbiological methods“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) und in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

Das zuständige Gremium des Mitträgers ist der Unterausschuss NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Dieses Dokument enthält die Änderung 1, angenommen von CEN am 2018-03-07 und die Änderung 2, angenommen von CEN am 2020-03-21.

Der Beginn und das Ende von neuem oder geändertem Text werden durch die Markierungen A1 und A2 angezeigt.

Bezeichnung des Verfahrens:

Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (K 30):

Verfahren DIN EN ISO 11133 — K 30

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

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 2859-1	siehe	DIN ISO 2859-1
ISO 5725-6	siehe	DIN ISO 5725-6
ISO 6222	siehe	DIN EN ISO 6222
ISO 6887-1	siehe	DIN EN ISO 6887-1
ISO 6887-2	siehe	DIN EN ISO 6887-2
ISO 6887-3	siehe	DIN EN ISO 6887-3
ISO 6887-4	siehe	DIN EN ISO 6887-4
ISO 6887-5	siehe	DIN EN ISO 6887-5
ISO 6887-6	siehe	DIN EN ISO 6887-6
ISO 6888-1	siehe	DIN EN ISO 6888-1
ISO 6888-2	siehe	DIN EN ISO 6888-2
ISO 6888-3	siehe	DIN EN ISO 6888-3
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 7899-1:1998	siehe	DIN EN ISO 7899-1:1999-07
ISO 7899-2	siehe	DIN EN ISO 7899-2
ISO 7932	siehe	DIN EN ISO 7932
ISO 7937	siehe	DIN EN ISO 7937

ISO 8199	siehe	DIN EN ISO 8199
ISO 9000	siehe	DIN EN ISO 9000
ISO 9001	siehe	DIN EN ISO 9001
ISO 9308-1	siehe	DIN EN ISO 9308-1
ISO 9308-2	siehe	DIN EN ISO 9308-2
ISO 9308-3:1998	siehe	DIN EN ISO 9308-3:1999-07
ISO 10272-1	siehe	DIN EN ISO 10272-1
ISO 10272-2	siehe	DIN EN ISO 10272-2
ISO 10273	siehe	DIN EN ISO 10273
ISO 11290-1	siehe	DIN CEN ISO/TS 11290-1
ISO 11290-2	siehe	DIN EN ISO 11290-2
ISO 11731	siehe	DIN EN ISO 11731
ISO 13720	siehe	DIN EN ISO 13720
ISO 14189	siehe	DIN EN ISO 14189
ISO 16266	siehe	DIN EN ISO 16266
ISO 16649-1	siehe	DIN ISO 16649-1
ISO 16649-2	siehe	DIN ISO 16649-2
ISO 16649-3	siehe	DIN EN ISO 16649-3
ISO 16654	siehe	DIN EN ISO 16654
ISO 19250	siehe	DIN EN ISO 19250
ISO 21528-1	siehe	DIN EN ISO 21528-1
ISO 21528-2	siehe	DIN EN ISO 21528-2
ISO 21567	siehe	DIN EN ISO 21567
ISO 21871	siehe	DIN EN ISO 21871
ISO 21872-1	siehe	DIN EN ISO 21872-1
ISO 22964	siehe	DIN EN ISO 22964

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 11133:2018-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Abschnitte 5.2, 5.4.1, 6.6.1 und 6.6.2 überarbeitet;
- b) normativen Anhang K hinzugefügt;
- c) Norm redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN V ENV ISO 11133-1: 2000-09
DIN ISO/TS 11133-2: 2004-10
DIN ISO/TS 11133-1: 2009-06
DIN CEN ISO/TS 11133-2 (DIN SPEC 10126): 2011-05
DIN EN ISO 11133: 2015-01, 2018-07

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) — gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (K 30).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 11290-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes und andere Listerienarten — Teil 1: Nachweisverfahren*

DIN EN ISO 6222, *Wasserbeschaffenheit — Quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen — Bestimmung der Koloniezahl durch Einimpfen in ein Nähragarmedium*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

DIN EN ISO 6887-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 3: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fisch und Fischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 4: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von sonstigen Erzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-5, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-6, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 6: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Proben aus der Primärproduktion*

DIN EN ISO 6888-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (Staphylococcus aureus und andere Spezies) — Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Agar*

DIN EN ISO 6888-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (Staphylococcus aureus und andere Spezies) — Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Agar*

DIN EN ISO 6888-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (Staphylococcus aureus und andere Spezies) — Teil 3: Nachweis und MPN-Verfahren für niedrige Keimzahlen*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 7899-1:1999-07, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser — Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 7899-1:1998); Deutsche Fassung EN ISO 7899-1:1998*

DIN EN ISO 7899-2, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken — Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration*

DIN EN ISO 7932, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem Bacillus cereus — Koloniezählverfahren bei 30 °C*

DIN EN ISO 7937, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Zählung von Clostridium perfringens — Koloniezählverfahren*

DIN EN ISO 8199, *Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren*

DIN EN ISO 9000, *Qualitätsmanagementsysteme — Grundlagen und Begriffe*

DIN EN ISO 9001, *Qualitätsmanagementsysteme — Anforderungen*

DIN EN ISO 9308-1, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien — Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wässer mit niedriger Begleitflora*

DIN EN ISO 9308-2, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien — Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl*

DIN EN ISO 9308-3:1999-07, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser — Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 9308-3:1998); Deutsche Fassung EN ISO 9308-3:1998*

DIN EN ISO 10272-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Campylobacter spp. — Teil 1: Nachweisverfahren*

DIN EN ISO 10272-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Campylobacter spp. — Teil 2: Koloniezählverfahren*

DIN EN ISO 10273, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis von pathogenen Yersinia enterocolitica*

DIN EN ISO 11290-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes und von Listeria spp. — Teil 2: Zählverfahren*

DIN EN ISO 11731, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Legionellen*

DIN EN ISO 13720, *Fleisch und Fleischerzeugnisse — Zählung von präsumtiven Pseudomonas spp.*

DIN EN ISO 14189, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Clostridium perfringens — Verfahren mittels Membranfiltration*

DIN EN ISO 16266, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von Pseudomonas aeruginosa — Membranfiltrationsverfahren*

DIN EN ISO 16649-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Zählung von β -Glucuronidase-positiven Escherichia coli — Teil 3: Nachweis und Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl unter Verwendung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronid*

DIN EN ISO 16654, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für den Nachweis von Escherichia coli O157*

DIN EN ISO 19250, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 21528-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Enterobacteriaceae — Teil 1: Nachweis von Enterobacteriaceae*

DIN EN ISO 21528-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Enterobacteriaceae — Teil 2: Koloniezählverfahren*

DIN EN ISO 21567, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis von Shigella spp.*

DIN EN ISO 21871, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Bestimmung niedriger Zahlen von präsumtivem Bacillus cereus — Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN) und Nachweisverfahren*

DIN EN ISO 21872-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Vibrio spp. — Teil 1: Nachweis von potentiell enteropathogenen Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae und Vibrio vulnificus*

DIN EN ISO 22964, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis von Cronobacter spp.*

DIN ISO 2859-1, *Annahmestichprobenprüfung anhand der Anzahl fehlerhafter Einheiten oder Fehler (Attributprüfung) — Teil 1: Nach der annehmbaren Qualitätsgrenzlage (AQL) geordnete Stichprobenpläne für die Prüfung einer Serie von Losen*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO 5725-6, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 6: Anwendung von Genauigkeitswerten in der Praxis*

DIN ISO 16649-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven Escherichia coli — Teil 1: Koloniezählverfahren bei 44 °C mit Membranen und 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronid*

DIN ISO 16649-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven Escherichia coli — Teil 2: Koloniezählverfahren bei 44 °C mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronid*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

**Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser —
Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und
Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014,
korrigierte Fassung 2020-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020)**

Microbiology of food, animal feed and water —
Preparation, production, storage and
performance testing of culture media
(ISO 11133:2014, Corrected Version 2014-11-01
+ Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020)

Microbiologie des aliments, des aliments
pour animaux et de l'eau —
Préparation, production, stockage et essais de
performance des milieux de culture
(ISO 11133:2014, Version corrigée 2014-11-01
+ Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. März 2014 angenommen.

Die Änderung 1 ändert die Europäische Norm EN ISO 11133:2014 und wurde von CEN am 28. Dezember 2017 angenommen.

Die Änderung 2 ändert die Europäische Norm EN ISO 11133:2014 und wurde von CEN am 21. März 2020 angenommen.

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

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

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



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

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
▣ ₁ Europäisches Vorwort der Änderung 1 ▣ ₁	5
▣ ₂ Europäisches Vorwort der Änderung 2 ▣ ₂	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	9
3.1 Allgemeine Begriffe	9
3.2 Terminologie zur Leistungsprüfung	9
3.3 Terminologie zu Nährmedien	10
3.4 Terminologie zu Prüfmikroorganismen	14
4 Qualitätssicherungsmanagement	15
4.1 Dokumentation	15
4.2 Lagerung	16
4.3 Herstellung von Medien im Laboratorium	16
4.4 Lagerung und Haltbarkeitsdauer von hergestellten Medien	20
4.5 Vorbereitung für die Verwendung	21
4.6 Bebrütung von festen Medien in Petrischalen	23
4.7 Entsorgung von Medien	23
5 Prüforganismen für die Leistungsprüfung	23
5.1 Allgemeines	23
5.2 Auswahl der Prüforganismen	23
5.3 Konservierung und Erhaltung von Prüforganismen	24
5.4 Mikroorganismen für die Leistungsprüfung	25
6 Qualitätslenkung und Leistungsprüfung von Nährmedien	28
6.1 Allgemeine Anforderungen	28
6.2 Physikalische und chemische Qualitätslenkung	28
6.3 Mikrobiologische Qualitätslenkung	29
6.4 Allgemeine Anforderungen an die mikrobiologische Leistungsprüfung	30
6.5 Leistungsbewertung und Auswertung der Ergebnisse	31
6.6 Bestätigungsmedien und -reagenzien	31
7 Verfahren zur Leistungsprüfung von festen Nährmedien	32
7.1 Allgemeines	32
7.2 Verfahren für quantitative Prüfungen	32
7.3 Prüfung von Nährmedien, die für die Membranfiltration verwendet werden	34
7.4 Verfahren für qualitative Prüfungen	35
8 Verfahren zur Leistungsprüfung von flüssigen Nährmedien	36
8.1 Allgemeines	36
8.2 Quantitatives Röhrenverfahren für die Leistungsprüfung von flüssigen Anreicherungsmedien (Verfahren der Verdünnung bis zur Extinktion)	36
8.3 Qualitatives Röhrenverfahren für die Leistungsprüfung von selektiven flüssigen Medien	37

8.4	Qualitatives Einröhrchenverfahren (Trübung) für die Leistungsprüfung von flüssigen Medien	38
8.5	Flüssige Mehrzweckmedien	39
9	Verfahren zur Leistungsprüfung von Verdünnungsmitteln und Transportmedien.....	40
9.1	Allgemeines	40
9.2	Verfahren zur Prüfung von Verdünnungsmitteln	40
9.3	Verfahren zur Prüfung von Transportmedien.....	40
10	Dokumentation der Prüfergebnisse.....	42
10.1	Durch den Hersteller bereitzustellende Informationen	42
10.2	Rückverfolgbarkeit.....	42
Anhang A (informativ) Bezeichnung der Bestandteile von Nährmedien in Internationalen Normen für die mikrobiologische Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln sowie Wasser		43
Anhang B (normativ) Herstellung einer Referenz-Stammkultur und einer Gebrauchskultur.....		45
Anhang C (normativ) Ablaufschemata der Verfahren zur Leistungsprüfung		47
Anhang D (informativ) Beispiel einer Karte für die Aufzeichnung von Prüfergebnissen zu Nährmedien.....		51
Anhang E (normativ) Prüfmikroorganismen und Leistungskriterien für allgemein in der Lebensmittelmikrobiologie verwendete Nährmedien.....		53
Anhang F (normativ) Prüfmikroorganismen für allgemein in der Wassermikrobiologie verwendete Nährmedien		82
Anhang G (normativ) Anwendung von Regelkarten zur Überwachung der quantitativen Prüfung von festen Nährmedien		98
Anhang H (informativ) Qualitätssicherung von Nährmedien — Fehlersuche		106
Anhang I (informativ) Quantitative Prüfung von flüssigen Medien		108
Anhang J (normativ) Festlegung von mikrobiologischen Leistungsprüfungen für standardisierte Nährmedien		112
A2 Anhang K (normativ) Leistungsprüfung von Bestätigungsmedien und -reagenzien A2		116
Literaturhinweise.....		130

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11133:2014) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2014 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt CEN ISO/TS 11133-2:2003, CEN ISO/TS 11133-1:2009.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11133:2014, korrigierte Fassung vom 2014-11-01, wurde vom CEN als EN ISO 11133:2014 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

▣_{A1} Europäisches Vorwort der Änderung 1 ▣_{A1}

▣_{A1} Dieses Dokument (EN ISO 11133:2014/A1:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 11133:2014 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2018 zurückgezogen werden.

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

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01/A1:2018 wurde von CEN als EN ISO 11133:2014/A1:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ▣_{A1}

▣_{A2} Europäisches Vorwort der Änderung 2 ▣_{A2}

▣_{A2} Dieses Dokument (EN ISO 11133:2014/A2:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 11133:2014 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2020 zurückgezogen werden.

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

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01/Amd.2:2020 wurde von CEN als EN ISO 11133:2014/A2:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ▣_{A2}

Einleitung

In Laboratorien, die mikrobiologische Untersuchungen durchführen, sind die Hauptziele die Erhaltung, die Wiederbelebung, die Anzucht, der Nachweis und/oder die Zählung einer großen Vielfalt von Mikroorganismen. Nährmedien werden bei allen traditionellen Verfahren zur Kultivierung und auch bei vielen alternativen Verfahren verwendet. Viele Rezepturen von Nährmedien sind im Handel erhältlich, und viele weitere Nährmedien für spezielle Wachstumsanforderungen sind in der Literatur beschrieben.

Viele Untersuchungen und Verfahren hängen von Nährmedien ab, die in der Lage sind, zu gleich bleibenden und reproduzierbaren Ergebnissen zu führen. Die Anforderungen an das jeweilige Nährmedium können sowohl für die zu untersuchende Probe als auch für die nachzuweisenden Organismen spezifisch sein. Nährmedien, die festgelegten Leistungskriterien entsprechen, sind deshalb eine Voraussetzung für jede zuverlässige mikrobiologische Arbeit. Es sollten ausreichend Prüfungen erfolgen, um Folgendes nachzuweisen:

- a) die Annehmbarkeit jeder Charge des Mediums;
- b) die Eignung des Mediums „für den jeweiligen Zweck“; und
- c) die Erzielung gleich bleibender Ergebnisse mit dem Medium.

Diese drei Kriterien sind ein grundlegender Bestandteil von Verfahren der internen Qualitätslenkung. Sie ermöglichen bei geeigneter Dokumentation eine wirksame Überwachung der Nährmedien und tragen zur Gewinnung sowohl genauer als auch präziser Daten bei. Für eine zuverlässige mikrobiologische Untersuchung ist es unerlässlich, dass Nährmedien mit nachgewiesener Qualität verwendet werden. Für alle in genormten Verfahren beschriebenen Medien ist es wesentlich, die Mindestannahmekriterien festzulegen, die zur Sicherstellung der Funktionsfähigkeit der Medien erforderlich sind. Es wird empfohlen, dass bei der Bestimmung der Leistungsmerkmale eines Nährmediums Prüfungen durchgeführt werden, die dieser Internationalen Norm entsprechen.

Die Festlegung von weithin anerkannten Mindestleistungskriterien für Medien sollte zu Produkten von gleichbleibender Qualität führen und somit den Umfang der notwendigen Prüfungen im Laboratorium des Anwenders verringern.

Die Mindestannahmekriterien, die nach den in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren ermittelt werden, können darüber hinaus von allen mikrobiologischen Laboratorien dazu verwendet werden, die produktiven, selektiven und/oder elektiven Eigenschaften eines Nährmediums zu bewerten.

Bei der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser haben die Anforderungen dieser Internationalen Norm Vorrang hinsichtlich der Beurteilung der Qualität von Nährmedien.

A1 Werden spezifische Normen überarbeitet und neue Normen entwickelt, werden diese einen Absatz zur Leistungsprüfung der Nährmedien, die in der Norm verwendet werden, beinhalten. **A1**

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm definiert Begriffe hinsichtlich der Qualitätssicherung von Nährmedien. Sie legt weiterhin die Anforderungen an die Zubereitung von Nährmedien fest, die für mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln, Futtermitteln und Umgebungsproben aus der Lebens- oder Futtermittelproduktion sowie allen Arten von Wasser zu verwenden sind, die für den Verzehr vorgesehen sind oder in der Lebensmittelproduktion verwendet werden.

Diese Anforderungen gelten für alle Arten von Nährmedien, die zur Verwendung in Laboratorien, die mikrobiologischen Untersuchungen durchführen, hergestellt werden.

[A1] Dieses Dokument legt außerdem Kriterien fest und beschreibt Verfahren für die Leistungsprüfung von Nährmedien. Dieses Dokument gilt für Endanwender von Fertigmedien und für herstellende Einrichtungen wie

- kommerzielle Einrichtungen, die Fertigmedien, Halbfertigmedien oder Trockenmedien herstellen und/oder vertreiben,
- nichtkommerzielle Einrichtungen, die Medien an Dritte liefern und
- mikrobiologische Laboratorien, die Nährmedien für ihre eigene Verwendung herstellen. **[A1]**

2 Normative Verweisungen

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

ISO 6887-1, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*

ISO 6887-2, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products*

ISO 6887-3, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*

ISO 6887-4, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products*

ISO 6887-5, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products*

ISO 6887-6, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage*

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

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

ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ANMERKUNG 1 In diesem Abschnitt sind die allgemeine Terminologie hinsichtlich der Qualitätssicherung von Nährmedien und die Terminologie bezüglich der Leistungsprüfung, Nährmedien und Prüfmikroorganismen angeführt.

ANMERKUNG 2 Die Tabellen E.2 und F.2 geben Erklärungen für die Abkürzungen der Bezeichnungen der Medien.

3.1 Allgemeine Begriffe

3.1.1

Qualitätslenkung

Teil des Qualitätsmanagements, der auf die Erfüllung von Qualitätsanforderungen gerichtet ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [1].

3.1.2

Charge eines Nährmediums

Los eines Nährmediums

homogene und vollständig rückverfolgbare Einheit eines Mediums, die sich auf eine definierte Menge eines Halbfertigmediums oder Endprodukts bezieht, die in Art und Qualität einheitlich ist und innerhalb einer definierten Produktionsdauer unter Zuordnung derselben Chargennummer (oder Losnummer) hergestellt wurde

3.1.3

chromogenes Substrat

fluorogenes Substrat

Substrat, das eine chromophore/fluorophore Gruppe und ein von den Bakterien oder Pilzen verwertbares Substrat enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Nach Spaltung des chromogenen/fluorogenen Substrats wird das Chromophor/Fluorophor frei und ein farbiges/fluoreszierendes Endprodukt sichtbar/kann unter Verwendung einer ultravioletten (UV-)Lampe nachgewiesen werden.

3.2 Terminologie zur Leistungsprüfung

3.2.1

Leistung eines Nährmediums

Reaktion eines Nährmediums auf die Beanspruchung durch Prüforganismen unter definierten Bedingungen

3.2.2

Zielmikroorganismus

Mikroorganismus oder Gruppe von Mikroorganismen, der/die nachzuweisen oder zu zählen ist

3.2.3

Nicht-Zielmikroorganismus

Mikroorganismus, der durch das Medium und/oder die Bebrütungsbedingungen unterdrückt (gehemmt) wird oder nicht die erwarteten Merkmale des Zielmikroorganismus aufweist

3.2.4

Produktivität eines Nährmediums

Wiederfindungsgrad eines Zielmikroorganismus vom Nährmedium unter definierten Bedingungen

3.2.5

Selektivität eines Nährmediums

Grad der Hemmung eines Nicht-Zielmikroorganismus auf oder in einem selektiven Nährmedium unter definierten Bedingungen

3.2.6

Elektivität eines Nährmediums

Spezifität eines Nährmediums

A1 Nachweis unter definierten Bedingungen, dass Nicht-Zielorganismen, wenn sie auf dem Medium wachsen können, nicht dieselben visuellen Merkmale wie die Zielmikroorganismen aufweisen **A1**

3.3 Terminologie zu Nährmedien

3.3.1

Nährmedium

Formulierung von Substanzen in flüssiger, halbfester oder fester Form, die natürliche und/oder synthetische Bestandteile zur Unterstützung der Vermehrung (mit oder ohne Hemmung bestimmter Mikroorganismen), Identifizierung oder Konservierung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: In Wortverbindungen wird der Begriff oft auf das Wort „Medium“ beschränkt (z. B. Anreicherungsmedium).

3.3.2 Nach der Zusammensetzung eingeteilte Nährmedien

3.3.2.1

chemisch definiertes Medium

Nährmedium, das ausschließlich aus chemisch definierten Bestandteilen mit bekanntem Molekularaufbau und Reinheitsgrad besteht

3.3.2.2

chemisch nicht definiertes oder teilweise nicht definiertes Medium

Nährmedium, das vollständig oder teilweise aus natürlichen Rohstoffen, verarbeitet oder in anderer Form verwendet, besteht, deren chemische Zusammensetzung nicht vollständig definiert ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Harmonisierte Bezeichnungen für verschiedene in Nährmedien verwendete chemisch nicht definierte Bestandteile sind in Anhang A festgelegt.

3.3.2.3

chromogenes Nährmedium

fluorogenes Nährmedium

Nährmedium, das ein oder mehrere chromogene/fluorogene Substrate enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Chromogene Nährmedien unterstützen die Identifizierung von Bakterien oder Pilzen anhand definierter farblicher und morphologischer Merkmale (nährmediumtypisches Wachstum). Fluorogene Medien erfordern die Sichtbarmachung mit Hilfe einer UV-Lampe. Die Produkte biochemischer Reaktionen, auf denen die Wirksamkeit chromogener/fluorogener Nährmedien beruht, sind in der Regel das Ergebnis enzymatischer Aktivitäten bestimmter Organismen, die ihrerseits stark von der genauen Einhaltung spezifischer Bedingungen (z. B. Temperatur, pH-Wert, Substratkonzentrationen) abhängen.

3.3.3 Nach der physikalischen Beschaffenheit eingeteilte Nährmedien

3.3.3.1

flüssiges Medium

Nährmedium, das aus einer wässrigen Lösung eines oder mehrerer Bestandteile(s) besteht, wie Peptonwasser und Nährbouillon

Anmerkung 1 zum Begriff: Vereinzelt werden dem flüssigen Nährmedium feste Bestandteile zugesetzt, wie Kochfleisch-Bouillon.

Anmerkung 2 zum Begriff: Flüssige Medien in Röhrchen, Kolben oder Flaschen werden häufig als „Bouillon“ bezeichnet.

3.3.3.2

festes Medium

halbfestes Medium

flüssiges Medium, das Verfestigungsstoffe (z. B. Agar-Agar, Gelatine) in unterschiedlichen Konzentrationen enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Durch die weltweite Verwendung von Medien, die mittels Agar-Agar verfestigt werden, wird die Kurzform „Agar“ häufig synonym für feste Medien verwendet und kommt daher in Wortverbindungen wie z. B. „Plate-Count-Agar“ (Keimzählagar) vor.

Anmerkung 2 zum Begriff: Feste Medien, die in Petrischalen gegossen werden, werden üblicherweise als „Platten“ bezeichnet. Feste Medien, die in Röhrchen oder kleine Flaschen gegossen und während der Verfestigung in eine Schräglage gebracht werden, werden meistens als „Schrägagar“ bezeichnet. Wenn das Medium so abgefüllt wird, dass es den Boden des Behälters füllt, bildet es eine „Hochschicht“.

3.3.4 Nach der Verwendung eingeteilte Nährmedien

3.3.4.1

Transportmedium

Medium, das der Konservierung und Erhaltung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen dient und gleichzeitig die Änderung der Keimzahl im Zeitraum zwischen der Probenahme und der Laborverarbeitung der Probe minimiert

BEISPIELE Transportmedium nach Stuart oder nach Amies.

3.3.4.2

Konservierungsmedium

Medium, das der Konservierung und Erhaltung der Lebensfähigkeit von Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum und dem Schutz der Mikroorganismen gegen ungünstige Einflüsse, die während der Langzeitlagerung auftreten können, dient und die Wiederfindung nach diesem Zeitraum ermöglicht

BEISPIEL Dorset-Eier-Medium, Nähr-Schrägagar.

3.3.4.3

Verdünnungsmittel

Suspensionsmedium

Medium, das zum Abtrennen der Mikroorganismen von einem festen zu untersuchenden Produkt in eine flüssige Phase und/oder zur Verringerung der Konzentration durch Verdünnung dient, ohne dass während der Kontaktzeit eine Vermehrung oder Hemmung auftritt

BEISPIEL Pepton-Salz-Lösung.

3.3.4.4

Wiederbelebungsmedium

Medium, das eine Wiederbelebung von gestressten und geschädigten Mikroorganismen und ihr normales Wachstum ermöglicht, ohne unbedingt ihre Vermehrung zu fördern

BEISPIEL Gepuffertes Peptonwasser.

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Wiederbelebungsmedium darf auch als Voranreicherungsmedium verwendet werden, z. B. gepuffertes Peptonwasser.

3.3.4.5

Voranreicherungsmedium

Anreicherungsmedium

im Allgemeinen ein flüssiges Medium, das durch seine Zusammensetzung besonders günstige Bedingungen für die Vermehrung von Mikroorganismen bietet

BEISPIEL Trypton-Soja-Bouillon.

3.3.4.5.1

selektives Anreicherungsmedium

Anreicherungsmedium, das die Vermehrung bestimmter Mikroorganismen ermöglicht, während das Wachstum anderer Mikroorganismen teilweise oder vollständig gehemmt wird

BEISPIEL Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS).

3.3.4.5.2

nicht selektives Anreicherungsmedium

Anreicherungsmedium, das das Wachstum eines breiten Spektrums von Mikroorganismen ermöglicht

BEISPIEL Hirn-Herz-Nährbouillon.

3.3.4.6

Isolierungsmedium

festes oder halbfestes Medium, das das Wachstum von Mikroorganismen ermöglicht

3.3.4.6.1

selektives Isolierungsmedium

Isolierungsmedium, das das Wachstum bestimmter Zielmikroorganismen ermöglicht, während andere Mikroorganismen vollständig oder teilweise gehemmt werden

BEISPIEL Modifizierter Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCD-Agar).

3.3.4.6.2

nicht selektives Isolierungsmedium

Isolierungsmedium, das nicht der selektiven Hemmung von Mikroorganismen dient

BEISPIEL Nähragar.

3.3.4.6.3

chromogenes selektives Nährmedium

fluorogenes selektives Nährmedium

chromogenes/fluorogenes Nährmedium, das zusätzlich selektiv wirksame Bestandteile enthält, die die in Untersuchungsmaterialien enthaltene Begleitflora vollständig oder teilweise hemmen und damit den gezielten Nachweis von Zielmikroorganismen unterstützen

BEISPIELE TBX-Agar, MUG/EC-Medium.

3.3.4.7

Differenzierungsmedium

Charakterisierungsmedium

Medium, das die Prüfung eines oder mehrerer physiologischer/biochemischer Merkmale von Mikroorganismen zum Zweck ihrer Identifizierung ermöglicht

BEISPIELE TBX-Agar, Lactose-Agar mit Tergitol-7 und TTC.

Anmerkung 1 zum Begriff: Differenzierungsmedien, die als Isolierungsmedien verwendet werden können, werden als Isolierungs-/Differenzierungsmedien bezeichnet, z. B. Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar), Lactose-TTC-Agar.

3.3.4.8

Identifizierungsmedium

Medium, das eine spezifische Identifizierungsreaktion auslöst, die üblicherweise keine weitere Bestätigungsprüfung erfordert

BEISPIEL Galle-Aesculin-Azid-Agar.

3.3.4.9

Zählmedium

selektives oder nicht selektives Nährmedium, das eine quantitative Bestimmung der Mikroorganismen ermöglicht

BEISPIELE Baird-Parker-Agar, Hefeextrakt-Agar.

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Zählmedium darf Eigenschaften von einem Wiederbeleungs- und/oder einem Anreicherungsmedium aufweisen.

3.3.4.10

Bestätigungsmedium

Medium, das zur Identifizierung oder Charakterisierung von Mikroorganismen nach vorausgehender Wiederbelebung und/oder Anreicherung und/oder Isolierung beiträgt

BEISPIEL Kligler-Eisen-Agar.

3.3.4.11

Neutralisationsmittel enthaltendes Medium

Transportmedium, Verdünnungsmedium oder Nährmedium, das neutralisierende Bestandteile zur Inaktivierung von Detergenzien/Desinfektionsmitteln oder anderen bioziden Wirkstoffen enthält

3.3.4.12

Medium mit mehreren Anwendungsmöglichkeiten

Medium, das mehreren Kategorien zugeordnet ist

BEISPIELE Blutagar ist ein Wiederbeleungsmedium nach 3.3.4.4, ein Isolierungsmedium nach 3.3.4.6 und ein Differenzierungsmedium nach 3.3.4.7 zum Hämolyse-Nachweis. Gepuffertes Peptonwasser ist ein Verdünnungsmittel nach 3.3.4.3 und ein Voranreicherungsmedium nach 3.3.4.5.

3.3.4.13

Referenzmedium

Medium, üblicherweise nicht selektiv, zur vergleichenden Bewertung der Leistung, unabhängig vom zu prüfenden Medium und mit nachgewiesener Eignung für Kontrollzwecke

BEISPIEL Trypton-Soja-Agar (TSA).

3.3.5 Nach dem Zubereitungsverfahren eingeteilte Nährmedien

3.3.5.1

Fertigmedium

flüssiges, festes oder halbfestes Medium, das in Platten, Flaschen, Röhrchen oder anderen Behältnissen in gebrauchsfertiger Form vorliegt bzw. nach dem erneuten Verflüssigen oder nach dem erneuten Verflüssigen und Supplementieren gebrauchsfertig ist

3.3.5.1.1

fertig zubereitetes Nährmedium

Medium in einer Form, in der es direkt beimpft werden kann

3.3.5.1.2

nach erneutem Verflüssigen gebrauchsfertiges Medium

erneut zu verflüssigendes Medium, zum Beispiel zur Verwendung beim Plattengussverfahren oder um es in Petrischalen zu gießen

3.3.5.1.3

nach erneutem Verflüssigen und Supplementieren gebrauchsfertiges Medium

vor dem Gebrauch erneut zu verflüssigendes, zu supplementierendes und abzufüllendes Medium (unvollständiges Fertigmedium)

BEISPIELE Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar), Baird-Parker- oder Kaninchenplasma-Fibrinogen-Agar (RPF-Agar).

3.3.5.2

aus handelsüblichen dehydrierten Formulierungen hergestelltes Medium

Medium in trockener Form, das vor dem Gebrauch eine Rehydratisierung und Verarbeitung erfordert, wobei eine von zwei Medienarten entsteht:

- ein vollständiges Medium;
- ein unvollständiges Medium, zu dem vor dem Gebrauch Supplemente hinzugefügt werden.

BEISPIELE Pulver, kompaktiertes Granulat, lyophilisierte Produkte.

3.3.5.3

aus einzelnen Bestandteilen hergestelltes Medium

Medium, das von einem mikrobiologischen Laboratorium ausschließlich aus den entsprechenden Einzelbestandteilen hergestellt wird

3.4 Terminologie zu Prüfmikroorganismen

3.4.1

Prüforganismen

Mikroorganismen, die im Allgemeinen zur Leistungsprüfung von Nährmedien verwendet werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Prüforganismen werden weiterführend entsprechend ihrer Herkunft definiert (siehe 3.4.2 bis 3.4.7).

3.4.2

Referenzstamm

Mikroorganismus, der direkt von einer Referenzkultursammlung erhalten wird, d. h. einer Kultursammlung, die Mitglied des Weltverbandes für Kultursammlungen (en: World Federation of Culture Collections, WFCC) oder der Europäischen Organisation für Kultursammlungen (en: European Culture Collections Organisation, ECCO) ist, und mindestens bis zur Ebene der Gattung und Art definiert und nach seinen Merkmalen beschrieben und katalogisiert ist, wobei er vorzugsweise aus Lebensmitteln, Futtermitteln, Umgebungsproben aus der Lebens- oder Futtermittelproduktion oder Wasser, je nach Zutreffen, stammen sollte

3.4.3

Referenz-Stammkultur

Satz von separaten identischen Kulturen, der entweder im Laboratorium oder von einem Lieferanten durch Anlegen einer einzigen Subkultur vom Referenzstamm gewonnen wurde

3.4.4

Stammkultur

primäre Subkultur von einer Referenz-Stammkultur

3.4.5

Gebrauchskultur

Subkultur von einer Referenz-Stammkultur oder Stammkultur oder von einem zertifizierten oder nicht zertifizierten Referenzmaterial

3.4.6

Referenzmaterial

RM

Material, das eine bestimmte Anzahl an wiederbelebbaren Mikroorganismen enthält und das in Bezug auf die Anzahl an wiederbelebbaren Mikroorganismen ausreichend homogen und stabil ist und sich für die vorgesehene Verwendung in einem Messprozess als geeignet erwiesen hat

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [3].

3.4.7

zertifiziertes Referenzmaterial

ZRM

Referenzmaterial, das durch ein messtechnisch gültiges Verfahren in Bezug auf die Anzahl an wiederbelebbaren Mikroorganismen charakterisiert und durch ein Zertifikat begleitet wird, in dem der Wert der festgelegten Anzahl an wiederbelebbaren Mikroorganismen, die zugehörige Unsicherheit und eine Erklärung der metrologischen Rückverfolgbarkeit angegeben werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [3].

4 Qualitätssicherungsmanagement

4.1 Dokumentation

4.1.1 Dokumentation durch den Hersteller oder die Lieferfirma

Die folgenden Angaben müssen durch den Hersteller oder die Lieferfirma (kommerzielle oder nicht-kommerzielle Einrichtungen, die Medien an Dritte liefern) mitgeteilt werden:

- Bezeichnung des Mediums, der einzelnen Bestandteile und aller Supplemente sowie, wenn möglich, deren Produktcodes;
- technisches Datenblatt, z. B. Formulierung, vorgesehener Verwendungszweck, falls zutreffend Füllmenge, Verweisungen;
- im erforderlichen Fall Sicherheits- und/oder Gefahrendaten;
- Chargennummer;
- Ziel-pH-Wert des vollständigen Mediums;
- Angaben über Lagerung und Verfallsdatum;
- zugewiesene Haltbarkeitsdauer;
- Zertifikat über die Qualitätslenkung unter Angabe der verwendeten Prüforganismen und Ergebnisse der Leistungsprüfung mit den Annahmekriterien.

4.1.2 Abnahme von Produkten bei Anlieferung

Bei jeder Charge eines Produktes (Bestandteil oder Nährmedium) ist Folgendes zu überprüfen:

- Kennzeichnung des Produkts;
- Unversehrtheit der Verpackung;
- Verfallsdatum des Produkts;
- mitgelieferte Dokumentation;
- Anzahl der erhaltenen Einheiten.

Das Eingangsdatum ist aufzuzeichnen.

4.2 Lagerung

4.2.1 Allgemeines

In allen Fällen sind die Anweisungen des Herstellers zu befolgen.

4.2.2 Qualitätsmanagement und Produktkontrolle bei Trockenmedien und Supplementen

Die Medien werden in Form dehydrierter Pulver oder als kompaktierte Granulate in dicht verschlossenen Behältern geliefert. Supplemente unterschiedlicher Selektiv- oder Diagnostiksubstanzen werden in lyophilisiertem, pulverförmigem oder flüssigem Zustand geliefert. Die Beschaffung sollte so geplant werden, dass die Bestände regelmäßig umgeschlagen werden (d. h. zuerst eingegangene Substanzen sind als Erste zu verbrauchen, „First In, First Out“-Verfahren). Wenn ein neuer Behälter geöffnet wird, muss

- der Verschluss überprüft werden,
- das Datum der ersten Öffnung aufgezeichnet werden und
- der Inhalt von geöffneten Behältern in Augenschein genommen werden.

Nach Öffnung eines neuen Behälters hängt die Qualität des Mediums vom Lagerumfeld ab. Der Qualitätsverlust von Trockenmedien zeigt sich durch Veränderung des Produkts hinsichtlich der Rieseigenschaften, seiner Homogenität, durch Verklumpung, Farbveränderungen usw. Alle Trockenmedien, die Feuchtigkeit aufgenommen haben oder sichtbare Veränderungen des äußeren Erscheinungsbildes aufweisen, müssen verworfen werden.

Wenn eine Flasche mit Trockenmedium geöffnet wird, ist der Behälter mit dem Datum zu versehen und eine Höchstlagerungsdauer ist anzugeben.

4.3 Herstellung von Medien im Laboratorium

4.3.1 Allgemeines

Die sorgfältige und genaue Herstellung von Nährmedien ist einer der grundlegenden Schritte zur Sicherstellung der Integrität der mikrobiologischen Untersuchung, bei dem besondere Sorgfalt aufgewandt werden muss.

Bei der Handhabung von Trockenmedien und anderer Bestandteile sind die Gute Laborpraxis und die Anweisungen des Herstellers zu beachten; das betrifft besonders Zubereitungen, die gefährliche Substanzen enthalten, z. B. Gallensalze, Natriumazid, Antibiotika oder andere selektive Wirkstoffe.

[A1] Wenn eine Rezeptur einen wasserhaltigen Bestandteil erfordert (z. B. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ für BPW in ISO 6887-1), kann dieser durch einen wasserfreien oder wasserhaltigen Bestandteil mit einer abweichenden Wassermolekülanzahl ersetzt werden, vorausgesetzt, dass bei der endgültigen Menge des Bestandteils diese Abweichung durch Berechnung der molaren Masse berücksichtigt wird. **[A1]**

Wenn Medien aus handelsüblichen Trockenformulierungen hergestellt werden, sind die Anweisungen des Herstellers genau zu befolgen. Alle wesentlichen Daten, wie z. B. Code-, Chargennummer, Masse/Volumen, pH-Wert, Herstellungsdatum, Sterilisationsbedingungen, Bearbeiter, sind zu dokumentieren.

Wenn Medien aus einzelnen Bestandteilen hergestellt werden, ist die Formulierung genau einzuhalten. Alle Einzelheiten wie vorstehend angeführt sowie zusätzlich die vollständigen Identitätsdaten (d. h. Code-, Chargennummer und, falls vorhanden, Verfallsdatum) aller verwendeten Bestandteile sind aufzuzeichnen.

In Anhang D ist ein Beispiel für eine Prüfkarte zur Aufzeichnung dieser Angaben angeführt.

4.3.2 Qualität der Grundsubstanzen der Medien

Die Formulierung von Grundsubstanzen der Medien ist in den spezifischen Internationalen Normen beschrieben (siehe Literaturhinweise). Sofern verfügbar, sollten die relative Molekülmasse und die CAS¹⁾-Nummer einer chemischen Substanz in der Formulierung angegeben werden.

Manchmal ist ein bestimmter in der Formulierung festgelegter Bestandteil (der zum Beispiel nachstehend aufgeführt ist) zu verändern, um eine konstante und gleichbleibende Leistung des Mediums zu erreichen.

- Peptone und Fleisch- oder Hefeextrakte, die hinsichtlich ihrer nutritiven Eigenschaften veränderlich sind;
- Agar, der hinsichtlich seiner Gelierfähigkeit veränderlich ist;
- Puffersubstanzen;
- Gallensalze, Gallenextrakt und Desoxycholat sowie antibakteriell wirkende Farbstoffe, abhängig von ihren selektiven Eigenschaften;
- Indikatorfarbstoffe;
- Antibiotika, abhängig von ihrer Wirksamkeit und von ihren Wechselwirkungen mit anderen Bestandteilen.

ANMERKUNG Im Industriemaßstab geben die Hersteller üblicherweise an, dass die Formulierung optimiert wird, um die geforderten Leistungskriterien zu erfüllen. Es ist allgemein üblich, zuerst den Rezepturbestandteil zu wählen und dann die Konzentration zwischen den Chargen anzupassen, um die gleiche Leistung zu erreichen und Schwankungen von Charge zu Charge zu minimieren.

4.3.3 Wasser

Für die Herstellung von Nährmedien ist nur gereinigtes Wasser zu verwenden, z. B. destilliertes, vollentsalztes, deionisiertes oder durch Umkehrosmose hergestelltes Wasser oder Wasser von gleichwertiger Qualität, frei von Substanzen, die das Wachstum der Mikroorganismen unter Prüfbedingungen voraussichtlich hemmen oder beeinflussen, z. B. Spuren von Chlor, Spuren von Ammoniak, Spuren von Metallionen.

Das gereinigte Wasser ist in dicht verschlossenen Behältern aus einem inerten Material (Neutralglas, Polyethylen usw.) zu lagern, das keine Hemmstoffe enthalten darf. Es wird jedoch empfohlen, das Wasser so bald wie möglich nach der Herstellung zu verwenden.

Die mikrobielle Kontamination sollte nicht mehr als 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE) je ml betragen und vorzugsweise unterhalb 10^2 KBE/ml liegen. Die mikrobielle Kontamination sollte regelmäßig nach ISO 6222 [4] mit einer Bebrütung für (68 ± 4) h bei (22 ± 1) °C oder unter Anwendung eines gleichwertigen Verfahrens überprüft werden.

ANMERKUNG Wasser, das durch einen Ionenaustauscher geleitet (vollentsalzt) wurde, kann einen sehr hohen Gehalt an Mikroorganismen aufweisen; es ist deshalb ratsam, diesen Prozess nicht ohne Überprüfung der Keimzahl des Wassers anzuwenden. Um die besten Mittel zur Verringerung der mikrobiellen Kontamination auf ein Mindestmaß zu finden, ist der Hersteller zu konsultieren. Stark kontaminiertes vollentsalztes Wasser kann sogar nach der Sterilfiltration noch Substanzen enthalten, die sich hemmend auf das Wachstum bestimmter Mikroorganismen auswirken.

1) CAS-Nummer/CAS-Registriernummer: ein eindeutiges numerisches Identifizierungskennzeichen des Chemical Abstracts Service (CAS) für chemische Elemente, Verbindungen, Polymere, biologische Sequenzen, Gemische und Legierungen.

Die Leitfähigkeit des im Laboratorium verwendeten Wassers darf bei 25 °C nicht mehr als 25 μScm^{-1} (das entspricht einem spezifischen Widerstand von $\geq 0,04 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) und muss vorzugsweise weniger als 5 μScm^{-1} (Wasser der Qualität 3, siehe ISO 3696 [5]) betragen, sofern in der Anlagenauslegung nicht anders gefordert. Die Leitfähigkeit des Wassers sollte vor dem Gebrauch überprüft werden.

4.3.4 Wägen und Rehydratisieren

Unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen ist die erforderliche Menge Trockenmedium oder einzelner Bestandteile sorgfältig einzuwägen und schrittweise mit der erforderlichen Wassermenge unter Vermeidung einer Klumpenbildung zu mischen. Es ist eine Waage mit einer hinreichenden Auflösung einzusetzen; der Grenzwert der Messabweichung sollte 1 % oder besser sein, wie in ISO 7218 und ISO 8199 festgelegt. Sofern nicht anders angegeben, wird nicht das Volumen aufgefüllt, sondern die Bestandteile werden zu dem festgelegten Volumen an Wasser hinzugefügt.

4.3.5 Lösen und Verteilen

Bei Trockenmedien ist eine schnelle Verteilung der Substanz in der Lösung durch sofortiges und wiederholtes oder ständiges Rühren, ggf. unter Erwärmen, bis zur Auflösung erforderlich. Agar enthaltende Medien sollten mehrere Minuten quellen, bevor sie unter Rühren bis zur Auflösung erwärmt werden; anschließend werden sie, gegebenenfalls vor dem Autoklavieren, abgefüllt. Eine Überhitzung des Mediums ist zu vermeiden.

4.3.6 Messen und Einstellen des pH-Wertes

Der pH-Wert ist mit einem pH-Messgerät zu bestimmen und, wenn erforderlich, vor der Sterilisation so einzustellen, dass nach der Sterilisation und dem Abkühlen auf 25 °C das Medium den erforderlichen pH-Wert $\pm 0,2$ pH-Einheiten aufweist, falls nicht anders festgelegt. Die Einstellung erfolgt üblicherweise mit einer Natriumhydroxidlösung mit einer Konzentration von etwa 40 g/l [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] oder verdünnter Salzsäure mit einer Konzentration von etwa 36,5 g/l [$c(\text{HCl})$ etwa 1 mol/l]. Wenn die Einstellung nach der Sterilisation erfolgt, ist eine sterilisierte Lösung zu verwenden. Zusätzliche Informationen zur Messung des pH-Wertes sind in ISO 7218 und ISO 8199 enthalten.

ANMERKUNG Kommerziell hergestellte Medien zeigen möglicherweise erhebliche Veränderungen des pH-Wertes vor und nach dem Autoklavieren. Eine pH-Wert-Einstellung vor dem Autoklavieren ist jedoch normalerweise nicht notwendig, vorausgesetzt, dass destilliertes oder deionisiertes Wasser von guter Qualität verwendet wird.

4.3.7 Abfüllen

Das Medium ist in geeignete Behälter abzufüllen, wobei sicherzustellen ist, dass ein hinreichender Freiraum verbleibt, um ein Überkochen während des Abkühlungsprozesses nach der Hitzebehandlung durch Autoklavieren oder nach erneutem Verflüssigen oder ein Überlaufen nach der Zugabe von Supplementen zu verhindern.

ANMERKUNG Dieser Freiraum ist möglicherweise nicht notwendig, wenn der Druck im Autoklaven während des Abkühlungsprozesses aufrechterhalten wird.

4.3.8 Sterilisation

4.3.8.1 Allgemeines

Die gelösten Nährmedien sind am Tag der Herstellung zu sterilisieren.

Die Sterilisation von Nährmedien und Reagenzien erfolgt im Allgemeinen durch feuchte Hitze (4.3.8.2) oder durch Filtration (4.3.8.3).

Bestimmte Medien werden nicht durch Autoklavieren sterilisiert, sondern können nach dem Aufkochen verwendet werden. Zum Beispiel reagieren Brillantgrün enthaltende Medien für *Enterobacteriaceae* besonders empfindlich auf Wärme und Licht und sollten nach dem Aufkochen schnell gekühlt und vor starkem Licht geschützt werden. Einige Reagenzien können ohne Sterilisation verwendet werden. ^[A1] In allen Fällen ist nach den Festlegungen der entsprechenden Internationalen Norm oder den Anweisungen des Herstellers zu verfahren. ^[A1]

4.3.8.2 Sterilisation durch feuchte Hitze

Die Sterilisation durch feuchte Hitze erfolgt in einem Autoklaven oder in einem Gerät zur Herstellung von Medien.

Bei Behältern mit Volumina von mehr als 1 000 ml ist der Sterilisationszyklus des Autoklaven den Erfordernissen anzupassen, um eine angemessene Hitzebehandlung sicherzustellen. In allen Fällen sind die in der entsprechenden Internationalen Norm oder den Anweisungen des Herstellers angegebenen Festlegungen zu befolgen.

ANMERKUNG Die Sterilisation großer Nährmedienvolumina (> 1 000 ml) im Autoklaven kann zu Überhitzung führen.

Es ist notwendig, dass die Medien nach dem Erwärmen in einer Weise gekühlt werden, welche ein Überkochen verhindert. Das ist besonders wichtig bei Medien in großen Volumina und bei Medien, die hitzeempfindliche Bestandteile enthalten, z. B. Medien, die Brillantgrün enthalten.

Zusätzliche Informationen zur Sterilisation durch feuchte Hitze sind in ISO 7218 und im Literaturhinweis [11] enthalten.

Die Sterilisation durch Hitze sollte unter Verwendung von F_0 -Werten und unter Berücksichtigung der Hitzebehandlung während des Erhitzens und Abkühlens bewertet werden. Die Hitzebehandlung sollte für die jeweilige zu autoklavierende Beladung festgelegt werden, um ein geeignetes Verfahren unabhängig von der jeweiligen Platzierung im Autoklavenraum sicherzustellen.

4.3.8.3 Sterilisation durch Filtration

Die Sterilisation durch Filtration kann unter Vakuum- oder Überdruckbedingungen erfolgen. Es sind ein steriles Gerät und Membranen mit einer Porengröße von 0,2 µm zu verwenden. Das Filtriergerät ist nach ISO 7218 oder ISO 8199 zu sterilisieren, oder es ist ein vorsterilisiertes Gerät zu verwenden.

Einige Filtermembranen könnten Proteine oder auch andere Substanzen (wie z. B. Antibiotika) zurückhalten. Um die korrekte Konzentration zu erhalten, sollte der Anwender eine geeignete Membranart, z. B. Membran mit geringer Proteinbindung, auswählen und das Filter vorher befeuchten.

4.3.9 Herstellen von Supplementen

ACHTUNG — Supplemente, die toxische Wirkstoffe enthalten, insbesondere Antibiotika, müssen sorgfältig gehandhabt werden, um ein Verstäuben von Pulver zu verhindern, das beim Laborpersonal allergische oder andere Reaktionen hervorrufen kann. Bei der Herstellung von Lösungen sind geeignete Sicherheitsvorkehrungen zu ergreifen und die Anweisungen des Herstellers zu befolgen.

Supplemente sind nicht über ihre festgelegte Haltbarkeitsdauer hinaus zu verwenden, die für Antibiotika-Gebrauchslösungen im Allgemeinen der Herstellungstag ist. Unter bestimmten Bedingungen dürfen antibiotische Lösungen in geeigneten Aliquoten eingefroren aufbewahrt werden, sie sollten nach dem Auftauen jedoch nicht erneut eingefroren werden. Der mögliche Aktivitätsverlust durch das Einfrieren muss mit dem Hersteller ermittelt oder vom Anwender geprüft werden.

4.4 Lagerung und Haltbarkeitsdauer von hergestellten Medien

4.4.1 Vom Handel gelieferte Medien

Die Anweisungen des Herstellers zu Lagerungsbedingungen, Verfallsdatum und Verwendung sind zu befolgen.

4.4.2 Im Laboratorium hergestellte Medien

4.4.2.1 Allgemeines

Sämtliche Medien müssen so gekennzeichnet werden, dass die Rückverfolgbarkeit sichergestellt ist.

Die Haltbarkeitsdauer der verschiedenen Medien ist unterschiedlich. In speziellen Internationalen oder nationalen Normen könnten spezifische Bedingungen und Haltbarkeitsdauern festgelegt sein, diese müssen jedoch vom Laboratorium verifiziert werden. Die Häufigkeit der Verifizierung ist vom Laboratorium festzulegen.

Die Medien sind unter Bedingungen zu lagern, die eine Veränderung der Zusammensetzung verhindern, und zwar vor Licht und Austrocknung geschützt. Sofern sie nicht unverzüglich verwendet werden oder es in der spezifischen Norm nicht anders festgelegt ist, sind sie in einem Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ zu lagern.

Bei Lagerung im gekühlten Zustand wird allgemein empfohlen, dass die Lagerung bei Platten nicht länger als zwei Wochen bis vier Wochen und bei verschlossenen Flaschen und Röhrchen drei Monate bis sechs Monate betragen sollte, sofern in spezifischen Normen nichts anderes festgelegt ist oder sofern Ergebnisse einer Bewertung der Haltbarkeitsdauer durch das Laboratorium keine längere Haltbarkeitsdauer ergeben. Weitere Angaben zur Höchstlagerungsdauer von hergestellten Medien sind in ISO 8199, Literaturhinweis [17] und Literaturhinweis [21] angeführt.

Es wird empfohlen, dass Medien mit einem Zusatz labiler Supplemente am Tag ihrer Herstellung verbraucht werden sollten, sofern in spezifischen Normen nichts anderes festgelegt ist oder sofern Ergebnisse einer Validierung der Haltbarkeitsdauer durch das Laboratorium nicht ergeben, dass eine längere Haltbarkeitsdauer angemessen ist (4.4.2.2). Feste Medien, die chemisch reaktive und/oder labile Substanzen enthalten, sollten zum erneuten Verflüssigen nicht in großen Mengen (Bulkware) gelagert werden.

Es wird empfohlen, die Nährmedien vor der Verwendung oder vor dem weiteren Erwärmen auf die Umgebungstemperatur zu bringen.

4.4.2.2 Bewertung der Haltbarkeitsdauer

Das Verfallsdatum für gelagerte Medien muss ermittelt werden, indem die Medien nach festgelegten Lagerungsdauern entsprechend der Beschreibung in der vorliegenden Internationalen Norm auf ihre physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Leistungsmerkmale überprüft werden. Die Häufigkeit der Verifizierung ist vom Laboratorium festzulegen.

Medien sind auf jegliche Farbveränderungen, Anzeichen von Verdunstung/Austrocknung, Änderung des pH-Wertes oder nicht annehmbare Produktivität oder Selektivität und gegebenenfalls Spezifität zu überprüfen. Das Verfallsdatum muss auf der Lagerungsdauer beruhen, bei der alle vorstehend beschriebenen Leistungsmerkmale annehmbar bleiben.

ANMERKUNG Diese Überprüfungen sind auch zur Anwendung geeignet, wenn vom Handel gelieferte Medien bestellt werden.

4.4.2.3 Lagerung von Medien in Petrischalen

Das verfestigte Medium ist unmittelbar zu verwenden oder umgedreht und unter Bedingungen zu lagern, die eine Qualitätsminderung und Austrocknung verhindern, d. h. im Dunkeln und/oder im Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Die Platten sind auf der Unterseite oder an der Seite mit dem Herstellungsdatum und/oder dem Verfallsdatum und der Identitätsbezeichnung zu kennzeichnen. Alternative Codierungssysteme, die diese Anforderungen erfüllen, dürfen verwendet werden.

Die Haltbarkeitsdauer gegossener Platten verlängert sich durch die Lagerung in dicht verschlossenen Kunststoff- oder Zellglasbeuteln. Um die Bildung von Kondenswasser auf ein Mindestmaß zu verringern, müssen die Platten vor dem Einbringen in die Beutel abgekühlt sein. Vor einer Kühlagerung dürfen die Oberflächen der Agarplatten nicht getrocknet werden.

4.5 Vorbereitung für die Verwendung

4.5.1 Verflüssigen von Agar-Nährmedien

Nährmedien sind durch Einbringen in einem kochenden Wasserbad oder durch ein anderes Verfahren, das zu identischen Ergebnissen führt (z. B. im Autoklaven mit Dampf durchströmung, siehe ISO 7218, ISO 8199) zu verflüssigen. Vorher autoklavierte Medien sollten schnellstmöglich wiedererwärmt werden, damit die Qualität der Medien konstant gehalten wird. Eine Überhitzung ist zu vermeiden und die Medien sind herauszunehmen, sobald sie verflüssigt sind. Um Glasbruch zu vermeiden, sind sie für eine kurze Zeitdauer, z. B. 2 min, auf einer hitzebeständigen Oberfläche bei Raumtemperatur stehen zu lassen, bevor sie in ein Wasserbad zum Abkühlen gestellt werden. Verschlüsse von Behältern sollten vor dem Erhitzen gelockert und nach der Entnahme vom Erwärmen fest verschlossen werden.

Das verflüssigte Medium ist in einem thermostatisch geregelten Wasserbad auf eine Temperatur von 47 °C bis 50 °C abzukühlen. Die erforderliche Zeit bis zum Erreichen von 47 °C bis 50 °C hängt von der Art des Mediums, dem Volumen und der Anzahl der Gefäße im Wasserbad ab. Verflüssigte Medien sollten sobald wie möglich verwendet werden. Es wird jedoch empfohlen, dass sie nicht länger als 4 h flüssig gehalten werden sollten. Bei besonders empfindlichen Medien muss die Standzeit des verflüssigten Mediums verkürzt werden, was in der entsprechenden Internationalen Norm festgelegt wird. Nicht verwendete Medien dürfen nicht erneut verfestigt und wiederverwendet werden.

Es ist ein Agar-Temperierungsregime einzurichten und zu dokumentieren, indem ein Thermometer in den Agar in einem getrennten Behälter, ähnlich dem, der für das Prüfmedium verwendet wird, eingebracht wird. Dies ist abhängig von der Anzahl und der Größe der Behälter im Wasserbad ab.

ANMERKUNG Im Plattengussverfahren verwendete Medien, die zu der Probe hinzugefügt werden, werden auf 44 °C bis 47 °C oder entsprechend den Festlegungen der Internationalen Norm temperiert. Es ist ein auf 44 °C bis 47 °C eingestelltes Wasserbad zu verwenden. Zusätzliche Informationen zum Gebrauch und zur Verifizierung von Wasserbädern sind in ISO 7218 enthalten.

4.5.2 Entlüften von Nährmedien

Falls es erforderlich ist, den Luft-/Sauerstoffgehalt im Medium zu verringern, ist das Nährmedium unmittelbar vor der Verwendung in kochendem Wasser oder unter einem Dampfstrom für 15 min zu erwärmen, wobei die Deckel oder Verschlusskappen gelockert sind; nach dem Erwärmen sind die Verschlusskappen fest zu verschließen und das Medium ist schnell auf Arbeitstemperatur herunterzukühlen.

4.5.3 Zugabe von Supplementen

Hitzelabile Supplemente sollten nach dessen Abkühlung auf eine Temperatur weniger als 50 °C zum Medium gegeben werden. Wenn das Medium Agar-Agar enthält, sind die sterilen Supplemente vor der Zugabe zum Agarmedium mindestens auf Raumtemperatur zu bringen. Die Zugabe von kalten flüssigen Supplementen kann die Gelierung des Agar-Agars oder die Bildung von transparenten Flocken hervorrufen und eine ordnungsgemäße Verteilung verhindern. Die Anweisungen des Herstellers sind einzuhalten. Alle Supplemente sind schonend und sorgfältig mit dem Medium zu vermischen, und dieses ist anschließend so schnell wie möglich in die endgültigen Behälter abzufüllen.

4.5.4 Herstellung von festen Medien in Petrischalen

Das verflüssigte Agarmedium ist so in Petrischalen zu gießen, dass eine Dicke von mindestens 3 mm erreicht wird (z. B. sind bei Schalen mit einem Durchmesser von 90 mm üblicherweise 18 ml bis 20 ml Agar erforderlich) oder entsprechend den Festlegungen in der geeigneten Internationalen Norm. Möglicherweise ist mehr Nährmedium erforderlich, wenn die Platten gelagert werden, wenn sich die Bebrütung über mehr als 72 h erstreckt oder wenn die Bebrütungstemperatur mehr als 40 °C beträgt. Der Agar ist in Petrischalen mit aufgelegten Deckeln auf eine kühle horizontale Fläche zu stellen, damit er abkühlen und sich verfestigen kann.

Kommerziell hergestellte gebrauchsfertige Agarplatten sollten nach den Anweisungen des Herstellers gelagert und verwendet werden.

4.5.5 Vorbereitung von Medien in Plattenform für die Bebrütung

Für die Oberflächenbeimpfung von festen Nährmedien sind die Platten kurz vor dem Gebrauch zu trocknen, bis die Wassertropfchen von der Oberfläche des Mediums verschwunden sind. Die Platten dürfen nicht übergetrocknet werden.

Für das Trocknen der Platten sind die folgenden Punkte von Bedeutung:

- Der Feuchtigkeitsgrad in Nährmedien ist wichtig, weil optimales Bakterienwachstum von den Feuchtigkeitsverhältnissen in und auf dem Medium abhängt. Starker Feuchtigkeitsverlust kann zum Beispiel zu einem Anstieg der Hemmstoffkonzentration in selektiven Nährmedien und zu einer Reduktion der Wasseraktivität an der Oberfläche des Nährmediums führen.
- Eine Trocknung ist nicht immer notwendig, wenn Bakterien angezüchtet werden, die sich nicht schnell ausbreiten, und die Platten nach der Akklimatisierung trocken aussehen. In diesem Fall darf das Trocknen entfallen, da es nur die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und eines unnötigen Feuchtigkeitsverlusts erhöht.
- Temperatur und Trocknungszeit sind so zu wählen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination so gering wie möglich gehalten wird und die Erwärmung die Qualität des Nährmediums nicht negativ beeinflusst. Die Trocknungszeit hängt vom Ausmaß der Kondensation in der Petrischale ab, muss jedoch so kurz wie möglich sein.
- Werden die Platten außerhalb einer Laminar-Flow-Werkbank getrocknet werden, müssen sie immer mit der zu beimpfenden Oberfläche des Nährmediums nach unten getrocknet werden, um Kontaminationen zu vermeiden.

In der Praxis können die Platten mit der Agaroberfläche nach unten und mit halb geöffneten Deckeln in einem Trockenschrank, der auf eine Temperatur zwischen 25 °C und 50 °C eingestellt ist, getrocknet werden. Die Platten sind so lange zu trocknen, bis die Tropfchen von der Oberfläche der Deckel verschwunden sind. Länger dürfen sie nicht getrocknet werden. Die Agarplatten können auch mit der Agaroberfläche nach oben in einer Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur 30 min bis 60 min oder über Nacht mit geschlossenen Deckeln bei Raumtemperatur getrocknet werden.

4.6 Bebrütung von festen Medien in Petrischalen

Während der Bebrütung verlieren Agarmedien Feuchtigkeit. Das kann unter bestimmten Umständen das Wachstum der Mikroorganismen beeinträchtigen. Den Wasserverlust beeinflussende Faktoren sind die Zusammensetzung des Mediums, die Menge des Mediums in den Platten, die Art des Brutschranks, d. h. mit Gebläseunterstützung oder anderer Typ, der Feuchtegehalt der Atmosphäre im Brutschrank, die Position und Anzahl der Platten im Brutschrank und die Bebrütungstemperatur. Der Wasserverlust kann verringert werden, indem die Platten in Stapeln von bis zu sechs Platten in oben offene (um eine übermäßige Kondensation zu vermeiden) Kunststoffbeutel gegeben werden. Alternativ darf die Luftfeuchte in den Brutschränken erhöht werden, indem ein offener Behälter mit Wasser auf den Boden gestellt wird. Um einen Pilzbefall zu vermeiden, sollten das Wasser häufig gewechselt und die Behälter desinfiziert werden.

4.7 Entsorgung von Medien

Sowohl kontaminierte als auch ungebrauchte Medien müssen sicher und entsprechend den örtlichen oder nationalen Bestimmungen entsorgt werden.

5 Prüforganismen für die Leistungsprüfung

5.1 Allgemeines

Neue oder überarbeitete Normen müssen die Leistungsprüfung von Nährmedien, einschließlich der Festlegung von Kontrollstämmen und Annahmekriterien, entsprechend den Anforderungen von Anhang J festlegen.

5.2 Auswahl der Prüforganismen

Ein Satz von Prüforganismen sollte Mikroorganismen mit stabilen Merkmalen enthalten, die für ihre Art repräsentativ sind und deren Zuverlässigkeit zum Nachweis der optimalen Leistung eines bestimmten hergestellten Mediums nachgewiesen ist. Die Prüforganismen sollten in erster Linie Stämme enthalten, die in Referenzkultursammlungen allgemein verfügbar sind, es dürfen jedoch auch gut charakterisierte, durch das Laboratorium isolierte Stämme einbezogen werden. Vorzugsweise sind Stämme zu verwenden, die aus Lebensmitteln oder Wasser stammen, obgleich nicht alle Kultursammlungen Daten über die Herkunft des Stammes liefern.

Die für die Kultur relevanten Eigenschaften der Referenz-Stammkultur müssen durch das Laboratorium untersucht und aufgezeichnet werden. Wenn eine Variabilität des Stammes gefunden wurde, sind die möglichen Einflüsse des Nährmediums durch den Bezug des gleichen Mediums von einem anderen Hersteller zu überprüfen und eine weitere Referenzkultur aus der Kultursammlung, in der sie ursprünglich hinterlegt wurde, ist zu beschaffen.

WICHTIG Die Anwender werden gebeten, relevante Angaben zur Variabilität und zu Eigenschaften bei Stämmen und der Leistung über das Sekretariat des ISO/TC 34/SC 9 an die WG 5 „*Culture media*“ des ISO/TC 34/SC 9 rückzumelden.

Die Prüfmikroorganismen für jedes Medium können:

- stark positive Stämme mit typischen Merkmalen des Zielorganismus;
 - schwach positive Stämme;
 - negative Stämme, die nicht die erwarteten Merkmale des Zielorganismus aufweisen (mit negativen Merkmalen);
 - teilweise oder vollständig gehemmte Stämme
- umfassen.

Anhang E legt die zu verwendenden Prüfmikroorganismen hinsichtlich der spezifischen Internationalen Normen zur Lebensmittelmikrobiologie fest, Anhang F legt die zu verwendenden Prüfmikroorganismen hinsichtlich der spezifischen Internationalen Normen zur Wassermikrobiologie fest.

A₂ Anhang K enthält die zu verwendenden Prüfmikroorganismen für Bestätigungsmedien und -reagenzien, die in Internationalen Normen für die Lebensmittel- und Wassermikrobiologie spezifiziert sind. **A₂**

ANMERKUNG Einige nationale Beschränkungen und Vorschriften erfordern die Verwendung eines anderen als in diesen Tabellen festgelegten Serovars. Bezüglich der Wahl von *Salmonella*-Serovaren sind die nationalen Anforderungen heranzuziehen.

5.3 Konservierung und Erhaltung von Prüforganismen

5.3.1 Allgemeines

Für die erfolgreiche Konservierung und Erhaltung aller für die Lebensmittel- und Wassermikrobiologie bedeutenden Mikroorganismen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, z. B. die Lyophilisierung, die Lagerung auf Perlen bei -70 °C oder die Verwendung von flüssigem Stickstoff. Ein einzelnes Verfahren ist möglicherweise nicht für alle Stämme geeignet. Weitere Verfahren zur Konservierung von Mikroorganismen sind in [14], [15], [36], [37], [38] angegeben.

Die Anzahl der Übertragungen der Prüforganismen sollte dokumentiert werden, um eine zu häufige Subkultivierung zu verhindern, die das Risiko phänotypischer Veränderungen erhöht. Eine Passage ist definiert als die Übertragung von einer lebensfähigen Kultur auf ein frisches Medium mit Wachstum der Mikroorganismen. Jede Form der Subkultivierung wird als eine Form der Übertragung/Passage angesehen. Weiterführende Angaben sind in den Literaturhinweisen [27], [28], [35], [38] zu finden.

Siehe die Ablaufdiagramme (Bilder B.1 und B.2) und die in Anhang B festgelegten zusätzlichen Angaben zur Erhaltung und Herstellung.

5.3.2 Prüfmikroorganismen von kommerziellen Anbietern

Bei Prüfmikroorganismen, die von Referenzstammsammlungen oder kommerziellen Anbietern, die nach ISO 9001 [2] zertifiziert sind oder eine andere geeignete Zertifizierung nachweisen können, bezogen und in ihren Originalbehältern aufbewahrt werden, müssen die Anweisungen des Herstellers bezüglich der Kultivierung und Verwendung befolgt werden.

Das Laboratorium sollte ermitteln, ob der gelieferte Stamm ein Referenzstamm oder eine Referenz-Stammkultur ist und wie viele Passagen vor dem Eingang erfolgt sind; die Angaben sollten dokumentiert werden.

Das Laboratorium sollte außerdem überprüfen, ob die erwarteten Merkmale vorliegen.

5.3.3 Im Laboratorium hergestellte Referenz-Stammkulturen

Aus Referenzstämmen (siehe Bild B.1) hergestellte Referenz-Stammkulturen zur Leistungsprüfung sind so zu erhalten und zu handhaben, dass die Möglichkeiten einer Kreuzkontamination, einer Mutation oder einer Veränderung der typischen Merkmale minimiert werden. Referenz-Stammkulturen sollten in mehreren Portionen aufbewahrt werden, üblicherweise entweder tiefgefroren, z. B. bei weniger als -70 °C , oder lyophilisiert. Bei einer höheren Temperatur verkürzt sich möglicherweise die Dauer der Lebensfähigkeit und es könnten genetische Modifikationen auftreten.

Die Wachstumseigenschaften der Referenz-Stammkulturen sollten für jedes Medium, auf/in dem sie als Prüfmikroorganismen eingesetzt werden, vollständig dokumentiert werden.

Referenz-Stammkulturen dürfen nicht zur Herstellung von Referenzstämmen verwendet werden.

5.3.4 Stammkulturen

Stammkulturen werden üblicherweise aus lyophilisierten oder tiefgefrorenen Referenz-Stammkulturen (siehe Bild B.2) hergestellt. Aliquote sind so zu handhaben, dass eine mögliche Kreuzkontamination der Referenz-Stammkultur und/oder deren Schädigung vermieden werden. Die Stammkulturen sollten durch Resuspendieren einer Portion der Referenz-Stammkultur in oder auf einem nicht selektiven Wachstumsmedium hergestellt werden. Um eine Kultur in einer stationären Phase zu erhalten, muss der Ansatz bebrütet werden.

Hinsichtlich der Anforderungen an Lagerung und Dokumentation siehe 5.3.3.

Bei handelsüblichen Konservierungssystemen sind die Anweisungen des Herstellers genau einzuhalten.

Stammkulturen dürfen nicht zur Herstellung von Referenzstämmen oder Referenz-Stammkulturen verwendet werden.

5.3.5 Gebrauchskulturen

Gebrauchskulturen werden aus Stammkulturen oder Referenz-Stammkulturen hergestellt und zur Herstellung von Inokula für die Prüfungen verwendet.

Gebrauchskulturen dürfen nicht zur Herstellung von Referenzstämmen, Referenz-Stammkulturen, Stammkulturen oder weiterer Gebrauchskulturen verwendet werden.

5.4 Mikroorganismen für die Leistungsprüfung

5.4.1 Allgemeines

A₂ Für die routinemäßige Leistungsprüfung geeignete Mikroorganismen sind in den Anhängen E, F und K aufgelistet. **A₂**

Die verwendeten Volumina der Inokula und die verwendeten Keimzahlen sind von entscheidender Bedeutung; siehe 5.4.2.4 und 5.4.2.5.

Die folgende Anleitung ist als Beispiel für Verfahren angeführt, die für die Herstellung standardisierter Inokula für die Qualitätslenkung von Medien geeignet sind. Diese Verfahren sind allgemeingültig, einige Organismen erfordern jedoch möglicherweise besondere Ansatzbedingungen, z. B. Anaerobier, Schimmelpilze, halophile, osmophile oder xerophile Organismen und Organismen mit speziellen Wachstumsanforderungen oder Nährstoffansprüchen.

5.4.2 Herstellung

5.4.2.1 Herstellung von Stammkulturen

Bei Bedarf ist ein festes Medium, z. B. Trypton-Soja-Agar (TSA) oder Blut-TSA, so mit der Referenz-Stammkultur zu beimpfen, dass einzelne Kolonien erhalten werden. Die Bebrütung muss unter geeigneten Bedingungen erfolgen, z. B. bei den meisten Bakterien 18 h bis 24 h bei 37 °C.

Diese Stammkultur auf festem Medium ist auf Reinheit zu untersuchen und für eine festgelegte Zeitdauer zu verwenden (z. B. für 14 Tage bei einer geeigneten Temperatur, um eine signifikante Änderung bezüglich des Organismus zu verhindern).

5.4.2.2 Herstellung von Gebrauchskulturen

Gebrauchskulturen sind als Reinkulturen in der stationären Phase in einer nicht selektiven Bouillon von der Referenz-Stammkultur (oder bei Bedarf von der Stammkultur) herzustellen. Bei den meisten aeroben Bakterien wird das üblicherweise durch eine Bebrütung für 18 h bis 24 h erreicht.

Die Gebrauchskultur kann aus einem handelsüblichen Referenzmaterial, RM oder ZRM, oder vom Laboratorium hergestellt werden. Die Konzentration der hergestellten Suspension muss während der Gebrauchsdauer stabil und homogen sein [7], [10], [11], [21], [29], [30].

Es dürfen unterschiedliche Techniken angewendet werden; diese müssen jedoch die Reinheit des Inokulums wie auch seine Standardisierung sicherstellen, um eine Verwendung in einem nachfolgenden Schritt zu ermöglichen.

In Abhängigkeit von der Größe der Kolonien sind mit einer Impföse ein bis zwei Kolonien vom Medium mit der Stammkultur zu entnehmen. Die Verwendung einer 1- μ l-Impföse wird empfohlen, um ein zu starkes Inokulum zu vermeiden.

Das Inokulum ist in ein nicht selektives flüssiges Medium, z. B. Trypton-Soja-Bouillon (TSB), zu überführen und sorgfältig mit einem Vortex-Mischer zu mischen.

Die Bebrütung muss unter geeigneten Bedingungen und für eine geeignete Zeitdauer erfolgen (z. B. bei den meisten Bakterien 18 h bis 24 h bei 37 °C).

Diese Gebrauchskultur ist für eine festgelegte Zeitdauer zu verwenden (z. B. für höchstens drei Tage bei einer geeigneten Temperatur, um eine signifikante Änderung bezüglich des Organismus zu verhindern).

Hinsichtlich der Herstellung und Lagerung von Bakterien- und Pilzsporen als Gebrauchskulturen siehe Literaturhinweise [10], [11], [24], [25], [30].

5.4.2.3 Herstellung von Suspensionen (Inokula) für die Prüfung

In einem geeigneten Verdünnungsmittel (z. B. viertelstarke Ringerlösung, Pepton-Salz-Lösung) sind Reihenverdünnungen herzustellen und die für die gewünschte Anzahl von Organismen (KBE) in einem festgelegten Volumen geeignetste Verdünnungsstufe ist zu verwenden.

Die geeignete Verdünnung, die als Prüfinokulum zu verwenden ist, sollte in Vorversuchen bestimmt werden, die für alle Schritte unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführt werden.

Die Suspensionen (Inokula) sind innerhalb einer festgelegten Zeitdauer zu verwenden (z. B. bei Raumtemperatur bis zu 2 h oder bei Lagerung bei 5 °C $\pm$ 3 °C innerhalb von 24 h; längere Lagerungsdauern sind möglicherweise zulässig, sofern sie validiert wurden [10], [21]).

Eingefrorene Inokula dürfen verwendet werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass der Mikroorganismus die gewählte Zeitspanne überleben kann.

5.4.2.4 Volumina der Inokula

Die für die quantitative Leistungsprüfung verwendeten Volumina der Inokula müssen den unter Prüfbedingungen für die betreffenden Medien verwendeten Volumina entsprechen.

Bei für die quantitative Prüfung verwendeten Verdünnungsmitteln und flüssigen Medien muss das Volumen des Inokulums im selben Verhältnis verwendet werden wie in der einschlägigen Internationalen Norm, üblicherweise sind es 10 % des zu prüfenden Mediums.

5.4.2.5 Inokulum-Gehalt

5.4.2.5.1 Inokulum-Gehalt für die Produktivitätsprüfung

5.4.2.5.1.1 Quantitative Prüfung

Ⓐ₁ Bei einem quantitativen Zählverfahren sind etwa 100 KBE notwendig, um eine hinreichende Präzision zu erreichen (siehe Tabelle 1). Das kann die Verwendung von mehr als einer Platte erfordern. Ⓐ₁

Ⓐ₁ Es sollte ein praktisch anwendbarer Bereich von 80 KBE bis 120 KBE je Platte bei einer Mindestanzahl von 50 KBE je Platte Anwendung finden. Der Einsatz von mehr als einer Platte erhöht die Präzision. Bei Filtern wird die gleiche Anzahl an KBE unter Verwendung von einem oder mehreren Filtern benötigt. In Tabelle 1 sind die mit den Koloniezahlen verbundenen 95 %-Vertrauensbereiche dargestellt. Ⓐ₁

Bei quantitativen Prüfungen von Verdünnungsmitteln und flüssigen Transportmedien ist ein Inokulum-Gehalt von 10^3 KBE bis 10^4 KBE notwendig, um im Volumen, das auf die Platten ausgestrichen wird, ein Inokulum von etwa 100 KBE zu erreichen.

Tabelle 1 — Angenäherte 95 %-Vertrauensbereiche für Koloniezahlen unter Annahme des Vorliegens einer Poisson-Verteilung [21], [26]

Anzahl der gezählten Kolonien	Grenzpräzision (auf das nächste Prozent) %	Angenäherte 95 %-Vertrauensgrenzen
500	± 9	455 bis 545
400	± 10	360 bis 440
320	± 11	284 bis 356
200	± 14	172 bis 228
100	± 20	80 bis 120
80	± 22	62 bis 98
50	± 28	36 bis 64
30	± 37	19 bis 41
20	± 47	11 bis 29
16	± 50	8 bis 24
10	± 60	4 bis 16
6	± 83	1 bis 11

5.4.2.5.1.2 Qualitative Prüfung

Das für die Prüfung verwendete Volumen Ⓐ₁ der Suspension Ⓐ₁ sollte enthalten:

- 10^3 KBE bis 10^4 KBE bei qualitativen Prüfungen von festen Medien in Plattenform;
- ≤ 100 KBE bei Produktivitätsprüfungen von Voranreicherungs- und Anreicherungsmedien;
- 10^4 KBE bis 10^6 KBE bei qualitativen Prüfungen von festen Transportmedien.

5.4.2.5.2 Inokulum-Gehalt für die Selektivitätsprüfung

A1 Für die Prüfung der Selektivität von Nährmedien wird die Platte oder das Röhrchen des Mediums mit einer Suspension des Nicht-Zielmikroorganismus, die mindestens 10^4 KBE enthält, beimpft. **A1**

5.4.2.5.3 Inokulum-Gehalt für die Spezifitätsprüfung

A1 Bei qualitativen Prüfungen von festen Medien in Plattenform auf Spezifität ist ein Inokulum-Gehalt von mindestens 10^3 KBE erforderlich. **A1**

5.4.2.6 Bebrütung

Die beimpften Nährmedien sind unter den in der einschlägigen Internationalen Norm beschriebenen Bedingungen zu bebrüten. Anhang E legt die zu verwendenden Bebrütungsbedingungen hinsichtlich der spezifischen Internationalen Normen zur Lebensmittelmikrobiologie fest. Anhang F legt die zu verwendenden Bebrütungsbedingungen hinsichtlich der spezifischen Internationalen Normen zur Wassermikrobiologie fest.

Um zu vermeiden, dass Agarmedien während der Bebrütung Feuchtigkeit verlieren, siehe 4.6.

Für den (die) Zielorganismus (Zielorganismen) sollte die kürzeste zulässige Bebrütungszeit in der Internationalen Norm verwendet werden, während zur Bestimmung der Selektivität die längste zulässige Bebrütungszeit verwendet werden sollte [10].

6 Qualitätslenkung und Leistungsprüfung von Nährmedien

6.1 Allgemeine Anforderungen

In den folgenden Unterabschnitten werden die Anforderungen an sämtliche Nährmedien beschrieben. Sie gelten unabhängig vom Umfang der Charge.

In der Praxis können Proben stressgeschädigte Mikroorganismen enthalten. Die Eignung des Mediums bezüglich der Wiederfindung von stressgeschädigten Zellen sollte mit berücksichtigt werden [21], [31], [32], [33].

Die Qualität der Nährmedien hängt von der Qualität der Grundsubstanzen, der richtigen Zusammensetzung (Formulierung), der Qualität der Zubereitungsverfahren, der Beseitigung der mikrobiellen Kontamination und geeigneten Verpackungs- und Lagerungsbedingungen ab.

Die Qualitätslenkung der Nährmedien ist an den vorgesehenen Verwendungszweck der Medien (z. B. qualitativ oder quantitativ) anzupassen. Vor dem Gebrauch ist die Leistung jeder Charge des Nährmediums entsprechend den in 6.4 beschriebenen Medienarten zu prüfen. Ist eine Prüfung vor dem Gebrauch aufgrund der Labilität des Mediums oder von Supplementen nicht möglich, muss eine parallele Leistungsprüfung neben der Prüfung der Probe durchgeführt werden.

6.2 Physikalische und chemische Qualitätslenkung

Fertig zubereitete Nährmedien müssen die Anforderungen an die physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie sie in den entsprechenden Normen festgelegt sind, erfüllen. Darüber hinaus ist durch die Qualitätsbewertung mittels Sichtprüfung sicherzustellen, dass jedes Nährmedium den festgelegten Empfehlungen entspricht, z. B. bezüglich:

- Füllvolumen und/oder Schichtdicke;
- Aussehen, Farbe und Homogenität;
- Gelfestigkeit und
- Feuchtigkeitsgehalt.

Zusätzlich muss der pH-Wert bestimmt werden.

Bei den einzelnen Grundsubstanzen und sämtlichen nutritiven oder selektiven Supplementen müssen ebenfalls geeignete Verfahren zur Qualitätsbewertung durchgeführt werden.

6.3 Mikrobiologische Qualitätslenkung

6.3.1 Allgemeines

Die mikrobiologischen Leistungsprüfungen sind an einer Probe durchzuführen, die für eine Charge eines Endproduktes repräsentativ ist [6], [8], [9], [21].

6.3.2 Referenzmedium

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse der Leistungsprüfung sicherzustellen, muss das verwendete Referenzmedium eine gleichbleibend hohe Qualität aufweisen.

Beispiele für Aspekte, die vom Anwender zu berücksichtigen sind, sind nachstehend angeführt:

- bei der Bewertung eines Referenzmediums ist ein quantitatives RM (siehe 3.4.6) zu verwenden, das eine genau festgelegte Anzahl von Organismen enthält;
- es ist ein festgelegter Herstellungsprozess anzuwenden, gegebenenfalls einschließlich erneuter Verflüssigung;
- das Medium/die Bestandteile sind von den gleichen Herstellern/Quellen zu beziehen;
- bei der Installierung ist ein größerer Bereich von Prüforganismen zu verwenden (um den Bereich der gesuchten Organismen zu erfassen);
- die Wahl eines „Referenzmediums“ für Bewertungszwecke;
- geeignete Verfahren zur Qualitätssicherung bei der Verwendung als Referenzmedium.

Es könnte nicht notwendig sein, alle vorstehend angeführten Aspekte in die Bewertung der Eignung des Referenzmediums einzubeziehen. Das Laboratorium muss die Wahl des Verfahrens begründen.

Geeignete Prüforganismen, Kontrollverfahren und Annahmekriterien für das Referenzmedium Trypton-Soja-Agar (TSA) sind in den Anhängen E und F beschrieben. Andere nicht selektive Referenzmedien dürfen verwendet werden, wenn die vorstehend angeführten Kriterien erfüllt sind.

6.3.3 Mikrobielle Kontamination

Abhängig vom Umfang der Nährmediencharge muss eine geeignete Menge der Charge durch Bebrütung unter geeigneten Bedingungen auf das Fehlen von mikrobieller Kontamination (Sterilität) geprüft werden.

Als zu prüfende Proben muss bei kleinen Chargen (< 100 Einheiten) mindestens eine Platte oder ein Röhrchen genommen werden. Bei größeren Chargen müssen die Hersteller z. B. auf der Grundlage der Bestandteile der Medien, von Prozessparametern und -grenzen sowie Verpackungsarten, unter Anwendung annehmbarer Qualitätsgrenzen Spezifikationen erarbeiten. Zusätzliche Informationen sind in ISO 2859-1 [6], anderen nationalen Normen und anderen Quellen [9], [21] enthalten.

Für jedes Medium müssen Annahmekriterien ermittelt und begründet werden.

6.4 Allgemeine Anforderungen an die mikrobiologische Leistungsprüfung

6.4.1 Allgemeines

Zur Bewertung der Charge eines vollständigen Nährmediums, von Nährstoffen oder Supplementen muss das Wachstum auf geeignete Weise entweder durch quantitative oder qualitative Verfahren nach der Beschreibung in dieser Internationalen Norm beurteilt werden.

Mittels einer geeigneten Vorrichtung und unter Einhaltung der in betreffenden Internationalen Normen beschriebenen Beimpungsverfahren sind feste, halbfeste oder flüssige Nährmedien mit einem geeigneten Volumen (5.4.2.4) der Gebrauchskultur von jedem der definierten Prüfmikroorganismen zu beimpfen, siehe Anhänge E und F.

In der vorliegenden Internationalen Norm werden Beispiele für quantitative und qualitative Prüfverfahren für feste Nährmedien und flüssige Medien beschrieben. Jedes der beschriebenen Verfahren darf gewählt werden und nicht alle Verfahren müssen angewendet werden.

Wenn der Verwendungszweck von Nährmedien in der Bestimmung der Keimzahl besteht, müssen quantitative Prüfverfahren durchgeführt werden.

Wenn ein neues Mediums oder ein neuer Hersteller zu bewerten ist, werden quantitative Prüfverfahren empfohlen, um zusätzliche Informationen zur Absicherung des Wechsels zu erhalten.

In flüssigen Medien sind die Wechselwirkungen, die zum erfolgreichen Wachstum von Mikroorganismen führen, komplexer, infolgedessen ist die Festlegung von Verfahren zur Leistungsprüfung aufwendiger als bei festen Medien.

Für die Prüfung von Kombinationen aus festen Medien und Membranfiltern wird ISO 7704 verwendet.

Die genaue Kenntnis der allgemeinen mikrobiologischen Techniken wird vorausgesetzt, und deshalb werden die Verfahren nicht in allen Einzelheiten angegeben.

Geeignete Prüfmikroorganismen, Prüfverfahren und Annahmekriterien sind in den Anhängen E und F angegeben.

Die Prüfhäufigkeit muss vom Endanwender unter Berücksichtigung des Umfangs der Vorbereitung im Laboratorium des Endanwenders und des Niveaus der Qualitätssicherung vor Ort begründet werden.

6.4.2 Fertigmedien

Hersteller von handelsüblichen Fertigmedien werden, besonders, wenn sie nach ISO 9001 zertifiziert sind, über ein eigenes Qualitätssicherungsprogramm verfügen und dürften für die von ihnen gelieferten Medien ein Qualitätszertifikat ausstellen. Unter diesen Bedingungen braucht der Anwender unter Umständen keine umfangreiche Prüfung derartiger Medien durchzuführen, er muss jedoch sicherstellen, dass die vom Hersteller empfohlenen Lagerungsbedingungen eingehalten werden.

Bei fertig zubereiteten Fertigmedien, denen Supplemente zugesetzt wurden und die vom Hersteller nach der vorliegenden Internationalen Norm kontrolliert wurden, wird mindestens eine qualitative Prüfung empfohlen.

Der Anwender muss sicherstellen, dass Hersteller von handelsüblichen Fertigmedien über ein Qualitätssicherungsprogramm für dieses Produktspektrum verfügen und Zertifikate über die Qualitätslenkung ausstellen, die die Anforderungen dieser Internationalen Norm erfüllen, wobei die erwarteten und erhaltenen Ergebnisse angegeben werden. Das Laboratorium des Anwenders muss außerdem den dokumentarischen Nachweis überprüfen, um sicherzustellen, dass die Annahmekriterien des Herstellers für die Leistungsprüfung den eigenen laborinternen Anforderungen entsprechen.

In regelmäßigen Zeitabständen sind Überprüfungen durchzuführen, um nachzuweisen, dass die Qualität der Medien im Verlauf des Transports beibehalten wurde.

Überprüfungen sind auch nach der Lagerung sowie der weiteren Handhabung im Laboratorium des Anwenders, z. B. Verflüssigen von festen Medien, durchzuführen. Die Häufigkeit muss begründet werden.

Bei unvollständigen Medien, zu denen im Laboratorium des Anwenders Supplemente hinzugefügt werden (siehe 3.3.5.1), sollte eine weitere Überprüfung erfolgen, entweder durch Prüfung der Produktionsaufzeichnungen oder durch Durchführung einer qualitativen Prüfung, zur Sicherstellung, dass das richtige Supplement hinzugefügt wurde.

6.4.3 Aus handelsüblichen Trockenformulierungen hergestellte Medien

Bei Zählmedien muss eine quantitative Prüfung durchgeführt werden. Bei anderen Medien kann eine qualitative Prüfung hinreichend sein. Quantitative Prüfungen geben eine größere Sicherheit hinsichtlich der Qualität der Medien.

Bei Medien, die nicht in den Anhängen E und F beschrieben sind, sollte die Qualitätslenkung entsprechend den folgenden Empfehlungen festgelegt werden.

Bei Medien, die keine Indikatoren oder Selektivsubstanzen enthalten, darf eine begrenzte Anzahl von Stämmen verwendet werden. Bei denjenigen Medien, die Indikatoren oder Selektivsubstanzen enthalten, sollten Stämme eingesetzt werden, mit denen das Funktionieren des (der) Indikators (Indikatoren) und die Selektivität nachweisbar sind. Bei komplexen Medien, d. h. mit zugesetzten Supplementen, sollte jede Charge mit Stämmen überprüft werden, die die in 5.2 aufgeführten Merkmale aufweisen.

6.4.4 Aus einzelnen Grundsubstanzen hergestellte Medien

Zusätzlich zu den in 6.4.3 angeführten Anforderungen sind quantitative Prüfungen durchzuführen, um die Qualitätstendenzen der Grundstoffe, die Produktivität des Mediums und die laboratoriumsinternen Herstellungsvorschriften zu überwachen.

6.5 Leistungsbewertung und Auswertung der Ergebnisse

Eine Charge eines Nährmediums zeigt eine zufriedenstellende Leistung, wenn alle verwendeten Prüfmikroorganismen eine Wachstumsleistung nach den gegebenen Festlegungen erbringen. Die Charge ist anzunehmen, wenn sowohl die allgemeinen als auch die mikrobiologischen Qualitätskriterien erfüllt sind.

Wenn keine zufriedenstellende Leistung erreicht wird, siehe Anhang H in Bezug auf mögliche Gründe.

6.6 Bestätigungsmedien und -reagenzien

6.6.1 Bestätigungsmedien

Die Leistung der für Bestätigungsprüfungen verwendeten Nährmedien muss vor dem Gebrauch verifiziert werden. Für eine Verifizierung sind positive und negative Prüforganismen auf ähnliche Weise zu verwenden wie in der spezifischen Internationalen Norm beschrieben [9], [16].  Geeignete Prüforganismen sind in Anhang K beschrieben. 

6.6.2 Bestätigungsreagenzien

Die Leistung von Gram-Färbelösungen, Reagenzien, wie z. B. Kovacs Reagens, VP (Voges-Proskauer), Nitrit, Oxidase, Katalase und anderen Reagenzien, die zum Nachweis biochemischer Eigenschaften verwendet werden, muss vor dem Gebrauch verifiziert werden. Für eine Verifizierung sind geeignete positive und negative Stämme zu verwenden und eine Haltbarkeitsdauer sollte ermittelt werden.  Geeignete Prüforganismen sind in Anhang K beschrieben.  Es wird empfohlen, dass bei Bestätigungsprüfungen analysenreine Reagenzien verwendet werden. Werden kommerziell hergestellte Reagenzien verwendet, sind die Anweisungen des Herstellers bezüglich Lagerung und Verwendung einzuhalten [18], [19].

7 Verfahren zur Leistungsprüfung von festen Nährmedien

7.1 Allgemeines

In diesem Abschnitt werden quantitative und qualitative Leistungsprüfungen für feste Nährmedien beschrieben, die in Normen für Lebensmittel und Wasser festgelegt sind. Dies sind für die meisten Nährmedien geeignete allgemeine Verfahren. Sie sind möglicherweise nicht für die Prüfung von einigen Arten von Medien zur Wiederfindung von Schimmelpilzen geeignet. Zusammenfassungen von jedem Verfahren in Form von Ablaufschemata sind in Anhang C enthalten.

7.2 Verfahren für quantitative Prüfungen

7.2.1 Verfahren für quantitative Prüfungen – Definitionen

7.2.1.1 Produktivität

Die Produktivität muss einen definierten Mindestgrenzwert erreichen (siehe die entsprechende spezifische Internationale Norm oder Anhänge E und F).

Hinsichtlich der Anwendung von Regelkarten bei der Überwachung der Leistung von festen Nährmedien mit dem nachstehend beschriebenen Verfahren siehe Anhang G.

Bei quantitativen Verfahren wird das Produktivitätsverhältnis P_R [21] nach folgender Gleichung (1) bestimmt:

$$P_R = \frac{N_S}{N_0} \quad (1)$$

Dabei ist

N_S die auf oder in dem zu prüfenden Nährmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien, z. B. Koloniezahl auf Platten;

N_0 die auf oder in dem festgelegten Referenz-Nährmedium erhaltene Gesamtzahl von Kolonien, erhalten von einer oder mehrerer Platten und etwa 100 KBE betragen muss, siehe 5.4.2.5.1.

Hinsichtlich der Auswertung der Ergebnisse siehe 7.2.2.1.2.

7.2.1.2 Selektivität

Selektive Nährmedien und ein nicht selektives Referenzmedium werden mit verschiedenen Verdünnungen des (von) Nicht-Zielorganismus (-organismen) beimpft.

Der Selektivitätsfaktor S_F [22] wird nach der folgenden Gleichung (2) berechnet:

$$S_F = D_0 - D_S \quad (2)$$

Dabei ist

D_0 die höchste Verdünnung, die auf dem nicht selektiven Referenzmedium ein Wachstum aufweist;

D_S die höchste Verdünnung, die auf dem geprüften selektiven Medium ein vergleichbares Wachstum zeigt.

S_F , D_0 und D_S werden in $\log_{10}$ -Einheiten angegeben.

ANMERKUNG Zum Beispiel wenn $D_0 \cdot 10^{-4} = \log_{10} 4,0$ und $D_S \cdot 10^{-3} = \log_{10} 3,0$ ist, dann ist der Selektivitätsfaktor $S_F = 1,0$.

Für die Auswertung der Ergebnisse siehe 7.2.2.1.2.

7.2.2 Quantitative Verfahren für feste Nährmedien

7.2.2.1 Allgemeines

Diese Vorschrift erfordert die Verwendung einer quantitativ bestimmten Bakteriensuspension (das kann ein quantitatives Referenzmaterial/eine quantitative Prüfsuspension sein) mit einer geeigneten Konzentration des Zielstammes. Die Wiederfindung von der neuen Charge des Nährmediums wird mit der Wiederfindung von einem nicht selektiven Nährmedium (Referenzmedium) oder, in Sonderfällen, einer zuvor angenommenen Charge mit der gleichen Medienzusammensetzung verglichen.

7.2.2.1.1 Durchführung

- a) Es sind Gebrauchskulturen und Inokula mit einer bekannten geeigneten Konzentration des Zielstammes und gegebenenfalls auch des Nicht-Zielstammes wie in 5.3.2 beschrieben oder ein geeignetes RM zu verwenden.
- b) Je Organismus sollten eine oder mehrere Platten verwendet werden. Die verwendete Anzahl hängt vom Umfang der Charge, dem Vertrauen in die Qualitätssicherung des Herstellverfahrens und der Zuverlässigkeit und dem Organismengehalt in der Prüfsuspension ab. Das Laboratorium des Anwenders muss die verwendete Anzahl begründen.
- c) Es ist sicherzustellen, dass die Oberflächen der Platten angemessen getrocknet sind, siehe 4.5.5.
- d) Das Beimpfen erfolgt durch Ausstreichen des Inokulums auf den Medien oder durch Membranfiltration, so dass Keimzahlen erreicht werden, die innerhalb der in 5.4.2.5.1 empfohlenen Grenzen für die quantitative Prüfung liegen.

Das modifizierte Miles-Misra-Oberflächen-Tropfverfahren und andere Tropfsysteme oder das Spiralplattenverfahren dürfen ebenso verwendet werden, um zählbare Kolonien auf den Platten zu erhalten.

- Für üblicherweise zur Zählung im Plattengussverfahren eingesetzte Nährmedien muss das Plattengussverfahren angewendet werden.
- Das Referenzmedium oder Platten aus einer zuvor angenommenen Charge sind auf dieselbe Weise zu beimpfen.
- Die Platten sind unter den Bedingungen zu bebrüten, die in den einzelnen Internationalen Normen festgelegt sind.
- Die auf jeder Platte gewachsenen Kolonien sind zu zählen. Größe und Aussehen der Kolonien auf oder in dem zu prüfenden Medium sind durch Vergleich mit der Wiederfindung auf einem nicht selektiven Nährmedium (Referenzmedium) oder einer zuvor angenommenen Charge der gleichen Medienzusammensetzung zu beurteilen.

7.2.2.1.2 Berechnung und Auswertung der Ergebnisse

Bei einem quantitativen Zählverfahren sind etwa 100 KBE notwendig, um eine hinreichende Präzision zu erreichen (siehe Tabelle 1). Das kann die Verwendung von mehr als einer Platte je Wiederholung erfordern.

Die Ergebnisse werden als gültig angenommen, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- Jede Wiederholung muss zu einem positiven quantitativen Ergebnis (angestrebtes Bakterienwachstum) führen;
- Jedes einzelne im Prüfbericht angeführte Ergebnis wird in den genormten Analysenbereich einbezogen (bis zu 100 Kolonien bei Filtrationsverfahren und bis zu 150 Kolonien bei Oberflächenverfahren).

Zur Auswertung der Ergebnisse sind das Produktivitätsverhältnis P_R (siehe 7.2.1.1) und im gegebenen Fall der Selektivitätsfaktor S_F (siehe 7.2.1.2) zu berechnen.

- a) Das P_R muss beim Vergleich eines selektiven Mediums mit einem nicht selektiven Referenzmedium, festgelegt in den Anhängen E und F, $\geq 0,50$ sein. Das P_R muss beim Vergleich eines nicht selektiven Mediums mit einem nicht selektiven Referenzmedium $\geq 0,70$ betragen oder wie in der Norm oder den Anhängen E und F festgelegt. Das gilt auch für Sonderfälle, in denen ein Vergleich mit der vorherigen Charge erfolgt.
- b) Wenn P_R größer ist als 1,4, ist der Grund dafür zu ermitteln.
- c) Der S_F von Nicht-Zielmikroorganismen beträgt mindestens 2.

In Bezug auf Sonderfälle siehe Anhänge E, F und J. Diese Kriterien gelten möglicherweise nicht für Medien, die nicht in den Anhängen E und F angeführt sind, z. B. Medien, die in nationalen Normen beschrieben sind.

7.2.2.2 Anwendung der Wiederfindung von Referenzmaterialien

Bei dieser Vorschrift werden Referenzmaterialien (RM), zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM, en: CRM) oder laborintern hergestellte RM verwendet, um eine stabile Bakteriensuspension mit einer bekannten Anzahl koloniebildender Einheiten des Zielstammes oder des unerwünschten Stammes zu erhalten. Die Wiederfindung von einer neuen Charge des Nährmediums wird mit der erwarteten Anzahl von KBE vom RM, ZRM oder laborintern hergestellten RM verglichen.

Zur Berechnung von Toleranzgrenzen darf die kritische Differenz angewendet werden (siehe ISO 5725-6 [34]). Siehe Tabelle 1.

Hinsichtlich der Herstellung und Beurteilung von laborintern hergestellten RM siehe Verweisungen [21] und [29].

Die Qualität des RM muss anhand des Referenzmediums verifiziert werden.

7.3 Prüfung von Nährmedien, die für die Membranfiltration verwendet werden

Die Qualität der eingesetzten Membranfilter muss im Vorfeld bewertet werden, um deren Gebrauchstauglichkeit nachzuweisen; es wird ISO 7704 angewandt.

Zur Prüfung der Leistung eines Nährmediums für die Verwendung bei der Membranfiltration sind Gebrauchskulturen und Inokula nach der Beschreibung in 5.4.2 zu verwenden. Das Suspensionsmedium, z. B. Verdünnungsflüssigkeit, steriles Wasser, ist mit einem geeigneten Inokulum-Gehalt, wie in 5.4.2.5 angegeben, zu beimpfen.

Die Flüssigkeit ist entsprechend den Anforderungen der spezifischen Internationalen Norm zu filtrieren. Die Membran ist auf die Oberfläche des zu prüfenden Agars aufzulegen. Es sind hinreichend Membranen/Platten

zu beimpfen, um für die Produktivitätsprüfung eine Gesamtzahl von etwa 100 KBE zu erhalten. Der Vorgang ist mit einer neuen Membran zu wiederholen, die zweite Membran ist auf die Oberfläche des Referenzmediums zu geben, wobei für die Selektivitätsprüfung bei Bedarf Verdünnungen zu verwenden sind. Die Platten sind nach der spezifischen Norm zu bebrüten.

Der Prozess ist jedes Mal zu wiederholen, wenn sich die Charge der Membranen ändert, ebenso bei jeder neuen Charge des Mediums.

Falls es notwendig ist, den Einfluss der Membran auf das Ergebnis zu bewerten, ist das Prüfinokulum außerdem ohne Membranen auf dem zu prüfenden Medium und auf dem Referenzmedium auszustreichen.

[A1] Bei Prüfungen mit Membranfiltern sollte das Laboratorium die Abweichungen zwischen den Ergebnissen bewerten, wenn die Kriterien in Tabelle F.1 nicht erfüllt werden. **[A1]**

7.4 Verfahren für qualitative Prüfungen

7.4.1 Qualitatives Ausstrichverfahren

7.4.1.1 Durchführung

Es sind Gebrauchskulturen und Inokula wie in 5.4.2 beschrieben zu verwenden.

Zur Prüfung der Produktivität und Spezifität ist eine Platte mit dem Prüfmedium zu verwenden und jeder Prüfmikroorganismus ist auf eine Weise auszustreichen, dass einzeln wachsende Kolonien erhalten werden.

Zur Prüfung der Selektivität ist eine Platte mit dem Prüfmedium zu verwenden und jeder Prüfmikroorganismus ist mit einer 1-µl-Öse in einer einzelnen geraden Linie auf der Oberfläche des Prüfmediums auszustreichen. Es können mehrere Prüfmikroorganismen als parallele Linien auf der gleichen Platte ausgestrichen werden, sie dürfen sich aber nicht überkreuzen; die Ausstriche sollten unterscheidbar sein, um die Betrachtung der typischen Morphologie zu ermöglichen. Andere standardisierte Ausstrichverfahren können angewendet werden.

Die Platten sind unter den in der spezifischen Internationalen Norm festgelegten Bedingungen zu bebrüten.

7.4.1.2 Auswertung der Ergebnisse

Der Wachstumsumfang auf den Platten nach der Bebrütung wird wie folgt bewertet:

- 0 entspricht keinem Wachstum;
- 1 entspricht schwachem Wachstum (entweder ein verringerter Wachstumsumfang oder eine verringerte Koloniegröße); und
- 2 entspricht gutem Wachstum.

Zielmikroorganismen müssen einen Punktwert von 2 haben und deren Aussehen, Größe und Morphologie der Kolonien müssen typisch sein. Bei Selektivitätsprüfungen hängt der Grad der Hemmung von der Art des Mediums ab. Das Wachstum der Nicht-Zielmikroorganismen muss teilweise oder vollständig gehemmt sein.

7.4.2 Bestimmung der Spezifität

Eine Definition der Spezifität ist in 3.2.6 angeführt. Die Spezifität eines Nährmediums wird durch grundlegende kennzeichnende physiologische Merkmale zur Unterscheidung der betreffenden Organismen nach Vorhandensein, Fehlen und/oder Grad der Ausprägung von biochemischen Reaktionen sowie Größe und Morphologie der Kolonien angezeigt. Hinsichtlich der Anforderungen an die Gebrauchskultur und Inokula siehe 5.4.2.