

DIN EN ISO 7932



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 7932:2005-03

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* –
Koloniezählverfahren bei 30 °C
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, korrigierte Fassung 2020-08);
Deutsche Fassung EN ISO 7932:2004 + A1:2020**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* –
Colony-count technique at 30 degrees C
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, Corrected version 2020-08);
German version EN ISO 7932:2004 + A1:2020

Microbiologie des aliments –
Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs –
Technique par comptage des colonies à 30 degrés C
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, Version corrigée 2020-08);
Version allemande EN ISO 7932:2004 + A1:2020

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 7932:2004 + A1:2020) 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 (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-01-06-02 AK „Sporenbildende Bakterien“ des Arbeitsausschusses NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Dieses Dokument enthält die Änderung 1, angenommen von CEN am 2020-03-22.

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

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

ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 5725-2:1994	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12
ISO 6887-1:1999	siehe	DIN EN ISO 6887-1:1999-04
ISO 18465	siehe	DIN EN ISO 18465
ISO 20837	siehe	DIN EN ISO 20837
ISO 20838	siehe	DIN EN ISO 20838
ISO 22119	siehe	DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe	DIN EN ISO 22174
ISO/TS 11133-2:2003	siehe	DIN ISO/TS 11133-2:2004-10
ISO/TS 17919	siehe	DIN CEN ISO/TS 17919

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 7932:2005-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) neuer Unterabschnitt 9.5 hinzugefügt;
- b) neue informative Anhänge C, D, E und F hinzugefügt;
- c) Literaturhinweise ergänzt;
- d) Norm redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN 10198-1: 1992-08
DIN EN ISO 7932: 1998-02, 2005-03

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 17919, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Nachweis von Botulinum-Neurotoxin Typ A, B, E und F produzierenden Clostridien*

DIN EN ISO 6887-1:1999-04, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen (ISO 6887-1:1999); Deutsche Fassung EN ISO 6887-1:1999*

DIN EN ISO 18465, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Quantitative Bestimmung von emetischem Toxin (Cereulid) mittels LC-MS/MS*

DIN EN ISO 20837, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an die Proben-vorbereitung für den qualitativen Nachweis*

DIN EN ISO 20838, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN EN ISO 22174, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

DIN ISO/TS 11133-2:2004-10, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO/TS 11133-2:2003); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 11133-2:2003*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln —
Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem
Bacillus cereus —
Koloniezählverfahren bei 30 °C —
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, korrigierte Fassung 2020-08)

Microbiology of food and animal feeding stuffs —
Horizontal method for the enumeration of presumptive
Bacillus cereus —
Colony-count technique at 30 degrees C
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, Corrected version 2020-08)

Microbiologie des aliments —
Méthode horizontale pour le dénombrement de Bacillus
cereus présumptifs —
Technique par comptage des colonies à 30 degrés C —
(ISO 7932:2004 + Amd 1:2020, Version corrigée 2020-08)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 17. Juni 2004 angenommen.

Die Änderung A1 modifiziert die Europäische Norm EN ISO 7932:2004. Sie wurde vom CEN am 22. März 2020 angenommen.

Diese Europäische Norm wurde korrigiert und vom CEN-CENELEC Management Centre am 26. August 2020 erneut herausgegeben.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen diese Europäische 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 CEN-CENELEC-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	3
▣ ^{A1} Europäisches Vorwort der Änderung ▣ ^{A1}	4
▣ ^{A1} Vorwort der Änderung ▣ ^{A1}	5
0 Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
5 Verdünnungsflüssigkeit, Nährmedien und Reagenzien	8
5.1 Verdünnungsflüssigkeit	8
5.2 Nährboden (siehe [1])	8
5.3 Schafblutagar	10
6 Geräte und Glasgeräte	10
7 Probenahme	11
8 Probenvorbereitung	11
9 Durchführung	11
9.1 Einwaage, Erstverdünnung und Verdünnungen	11
9.2 Beimpfung und Bebrütung	11
9.3 Zählen der Kolonien	12
9.4 Bestätigung	12
9.5 Optionale Prüfungen	13
10 Angabe der Ergebnisse	14
10.1 Zählen der präsumtiven <i>B. cereus</i> -Kolonien	14
10.2 Keine Kolonien	14
10.3 Präzision	14
11 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (normativ) Vertrauensgrenzen bei der Schätzung geringer Koloniezahlen	17
Anhang B (informativ) Ergebnisse von Ringversuchen	18
Anhang C (informativ) Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Varianten <i>cytK-1</i> bzw. <i>cytK-2</i> des Zytotoxin K codierenden Gens in isolierten Stämmen der <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe und zur Identifizierung von <i>Bacillus cytotoxicus</i>	21
Anhang D (informativ) Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis des <i>ces</i> -Gens, das für die Cereulid-Peptid-Synthetase in Stämmen der <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe codiert	28
Anhang E (informativ) Beweglichkeitsprüfung als ein Screeningverfahren	37
Anhang F (informativ) Parasporaler Kristall von <i>Bacillus thuringiensis</i> — Protokoll für die mikroskopische Untersuchung von Nasspräparaten	39
Literaturhinweise	48

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument EN ISO 7932:2004 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 Juni 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2005 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 7932:1997.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 7932:2004 wurde vom CEN als EN ISO 7932:2004 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

⌖ A1 Europäisches Vorwort der Änderung ⌖ A1

⌖ A1 Dieses Dokument (EN ISO 7932:2004/A1:2020) 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 7932:2004 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2020 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 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 7932:2004/Amd 1:2020, korrigierte Fassung 2020-08, wurde von CEN als EN ISO 7932:2004/A1:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ⌖ A1

A₁ Vorwort der Änderung **A₁**

A₁ ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

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

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

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

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN) Technisches Komitee CEN/TC 463, *Microbiology of the food chain*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung über technische Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese zweite korrigierte Fassung von ISO 7932:2004/Amd.1:2020 beinhaltet die folgenden Korrekturen:

- die Anhänge A, B, C und D wurden jeweils korrigiert zu Anhang C, Anhang D, Anhang E und Anhang F (gemäß der ersten korrigierten Fassung)
- in Tabelle D.2 wurde das Volumen je Reaktion für EM1F und EM1R von 2,5 auf 5 korrigiert.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden. **A₁**

0 Einleitung

0.1 Diese Internationale Norm dient als allgemeine Anleitung für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, die in den bestehenden Internationalen Normen nicht behandelt werden. Sie sollte von den Organisationen berücksichtigt werden, die mikrobiologische Untersuchungsverfahren für Lebensmittel oder Futtermittel erarbeiten. Wegen der Vielzahl von Produkten innerhalb dieses Anwendungsbereichs sind diese Anleitungen nicht immer bis ins Einzelne für bestimmte Produkte geeignet, und für manche kann die Anwendung anderer Untersuchungsverfahren erforderlich sein. Dennoch sollte stets versucht werden, den vorgegebenen Anleitungen möglichst zu folgen und nur dann davon abzuweichen, wenn es aus fachlichen Gründen unvermeidbar ist.

Bei der nächsten Überarbeitung dieser Internationalen Norm werden sämtliche dann zur Verfügung stehenden Informationen über die Akzeptanz dieser Norm und die Gründe für Abweichungen bei einzelnen Produkten berücksichtigt werden.

Die Harmonisierung von Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen. Für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen vorliegen, die diesen Anleitungen nicht entsprechen. In Fällen, in denen für das zu untersuchende Produkt bereits Internationale Normen vorliegen, sollten diese befolgt werden. Es ist jedoch anzustreben, sie bei einer Überarbeitung an diese Internationale Norm anzupassen, so dass es sich bei eventuell noch verbleibenden Abweichungen von diesen Anleitungen nur um solche handelt, die fachlich begründet sind.

0.2 Es scheint, dass die Sporen vieler, wenn nicht der meisten Stämme von *B. cereus* auf der Oberfläche der für die Zählung verwendeten Nährböden leicht auskeimen. In den meisten Fällen ist keine Hitzeaktivierung erforderlich, um die Auskeimung anzuregen. Sie ist aber, z. B. für Sporenzählungen oder die Hemmung des Wachstums vegetativer Bakterienzellen, zu empfehlen. In solchen Fällen wird eine Behandlung bei 80 °C für die Dauer von 10 min empfohlen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein horizontales Verfahren zur Zählung vermehrungsfähiger Stämme von präsumtivem *Bacillus cereus* mittels des Koloniezählverfahrens bei 30 °C fest. Es gilt für

- Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind, und
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Behandlung von Lebensmitteln.

ANMERKUNG  1  Im Sinne der Praktikabilität des Untersuchungsverfahrens beschränkt sich die Bestätigungsuntersuchung auf den Nachweis typischer Aspekte auf MYP-Agar und auf den Hämolysetest. Resultierend daraus wird der Begriff „präsumtiv“ verwendet, wodurch anerkannt wird, dass die Bestätigungsuntersuchungen nicht geeignet sind, zwischen *B. cereus* und den anderen nahe verwandten, aber weniger häufig nachzuweisenden Bazillenarten, wie *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* und *B. mycoides* zu unterscheiden. Wenn die Anwesenheit von *B. anthracis* vermutet wird, kann eine zusätzliche Mobilitätsprüfung dazu dienen, *B. cereus* von *B. anthracis* zu unterscheiden.

 ANMERKUNG 2 Die Diversität in der *Bacillus cereus*-Gruppe ist mit 7 phylogenetischen Gruppen [21] [22] und einer wachsenden Anzahl von Spezies groß. 

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 6887-1:1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — 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 7218:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations*, and Amd.1:2001

ISO/TS 11133-2:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gilt der folgende Begriff:

3.1

präsumtiver *Bacillus cereus* (präsumtiver *B. cereus*)

Mikroorganismus, der auf der Oberfläche eines selektiven Nährbodens typische Kolonien bildet und der unter den in dieser Internationalen Norm festgelegten Bedingungen positive Bestätigungsreaktionen zeigt

ANMERKUNG Siehe Anmerkung Abschnitt 1.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Ein fester, selektiver, in Petrischalen gegossener Nährboden wird mit einer festgelegten Menge der zu untersuchenden Probe, sofern das Ausgangsprodukt flüssig ist, oder mit einer festgelegten Menge einer Erstverdünnung bei anderen Produkten beimpft.

Weitere Platten werden unter den gleichen Bedingungen mit dezimalen Verdünnungen der Probe oder der Erstverdünnung behandelt.

4.2 Die Platten werden bei 30 °C für 18 h bis 48 h unter aeroben Bedingungen bebrütet.

4.3 Die Anzahl *B. cereus* je Gramm oder Milliliter einer Probe wird aus der Anzahl bestätigter Kolonien, die auf den Platten der Verdünnungsstufen erhalten werden und die so ausgewählt werden, dass sie ein verwertbares Ergebnis liefern, berechnet und nach den festgelegten Bedingungen bestätigt.

5 Verdünnungsflüssigkeit, Nährmedien und Reagenzien

Zur üblichen Laboratoriumspraxis siehe ISO 7218.

ANMERKUNG Es dürfen kommerziell hergestellte gebrauchsfertige Reagenzien verwendet werden.

5.1 Verdünnungsflüssigkeit

Siehe ISO 6887-1 und jede spezielle Norm, die das zu untersuchende Produkt behandelt.

5.2 Nährboden (siehe [1])

5.2.1 Grundnährboden

5.2.1.1 Zusammensetzung

Fleischextrakt	1,0 g
Casein, enzymatisch verdaut	10,0 g
D-Mannit	10,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	10,0 g
Phenolrot	0,025 g
Agar	12 g bis 18 g ^a
Wasser	900 ml
^a Je nach Gelieeigenschaften.	

5.2.1.2 Herstellung

Die Bestandteile bzw. das vollständige Trockenmedium werden, bei Bedarf unter Erwärmen, in Wasser gelöst.

Im Bedarfsfall wird der pH-Wert des vollständigen Nährbodens (5.2.4) bei 25 °C nach dem Sterilisieren auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt.

Jeweils 90 ml des Nährmediums werden in Kulturkolben mit geeignetem Fassungsvermögen überführt.

Anschließend wird es 15 min im Autoklaven (6.1) bei 121 °C sterilisiert.

5.2.2 Polymyxin-B-Lösung

5.2.2.1 Zusammensetzung

Polymyxin-B-Sulfat	10 ⁶ IE
Wasser	100 ml

5.2.2.2 Herstellung

Das Polymyxin-B-Sulfat wird in Wasser gelöst und die Lösung sterilfiltriert.

5.2.3 Eigelb-Emulsion

Es müssen frische Hühnereier mit unversehrten Schalen verwendet werden. Die Eier werden in einem flüssigen Reinigungsmittel mit einer Bürste gewaschen, unter fließendem Wasser abgespült, 30 s in 95 %iges (Volumenkonzentration) Ethanol eingetaucht und getrocknet. Die Eier werden unter aseptischen Bedingungen aufgeschlagen und Eigelb und Eiweiß durch wiederholtes Überführen des Eigelbs von der einen Hälfte der Eierschale zur anderen getrennt. Das Eigelb wird in einen sterilen Messzylinder gegeben und vier Volumenanteile steriles Wasser werden hinzugefügt. Der Inhalt wird aseptisch in einen sterilen Kulturkolben überführt und kräftig gemischt.

Das Gemisch wird 2 h in einem auf 44 °C bis 47 °C eingestellten Wasserbad (6.4) erwärmt. Dann wird das Gemisch 18 h bis 24 h bei 5 °C ± 3 °C stehen gelassen, damit sich ein Niederschlag bilden kann.

Die Emulsion (Überstand) wird unter aseptischen Bedingungen gewonnen.

Die Emulsion darf höchstens 72 h bei 5 °C ± 3 °C aufbewahrt werden.

5.2.4 Vollständiger Nährboden (MYP-Agar)

5.2.4.1 Zusammensetzung

Grundnährboden (5.2.1)	90 ml
Polymyxin-B-Sulfat-Lösung (5.2.2)	1,0 ml
Eigelb-Emulsion (5.2.3)	10,0 ml

5.2.4.2 Herstellung

Der Grundnährboden wird geschmolzen und in einem auf 44 °C bis 47 °C eingestellten Wasserbad (6.4) abgekühlt.

Die anderen Flüssigkeiten werden zugegeben und dabei wird jeweils gründlich gemischt.

Der vollständige Nährboden wird in einem auf 44 °C bis 47 °C eingestellten Wasserbad (6.4) abgekühlt.

5.2.5 Herstellung der Agarplatten

15 ml bis 20 ml des vollständigen Nährmediums (5.2.4) werden jeweils in sterile Petrischalen (6.6) überführt und zum Verfestigen stehengelassen.

Die Platten dürfen vor dem Trocknen bis zu 4 Tage bei 5 °C ± 3 °C aufbewahrt werden.

Unmittelbar vor der Verwendung werden die Platten, vorzugsweise ohne Deckel und mit der Agaroberfläche nach unten, in einer auf 37 °C bis 55 °C eingestellten Trocknungskammer oder in einem Brutschrank (6.2) aufbewahrt, bis die Agaroberfläche trocken ist.

5.2.6 Leistungsprüfung

Siehe ISO/TS 11133-2:2003, Anhang B.

5.3 Schafblutagar

5.3.1 Grundnährboden: Blutagar-Basis Nr. 2

5.3.1.1 Zusammensetzung

Proteose-Pepton oder gleichwertiges Pepton	15 g
Leber-Verdauungsprodukt	2,5 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Agar	12 g bis 18 g ^a
Wasser	1 000 ml
^a Je nach Geliereigenschaften.	

5.3.1.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter Aufkochen im Wasser gelöst.

Im Bedarfsfall wird der pH-Wert bei 25 °C nach dem Sterilisieren auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt.

Das Medium wird in Kolben abgefüllt und 15 min bei 121 °C sterilisiert.

5.3.2 Defibriniertes Schafblut

5.3.2.1 Vollständiger Nährboden

5.3.2.1.1 Zusammensetzung

Grundnährboden (5.3.1)	100 ml
Defibriniertes Schafblut	5 ml bis 7 ml

5.3.2.1.2 Herstellung

Nach Abkühlen auf 44 °C bis 47 °C wird zum Grundnährboden (5.3.1) das defibrinierte Schafblut zugegeben und durchmischt.

Mindestens 12 ml des vollständigen Nährmediums werden jeweils in sterile Petrischalen (6.6) überführt und zum Verfestigen stehen gelassen.

6 Geräte und Glasgeräte

ANMERKUNG Einweggeräte mit geeigneter Spezifikation sind eine geeignete Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors und insbesondere die folgenden Geräte:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Wärmeschränk) oder Dampfsterilisation (Autoklav).

Siehe ISO 7218.

6.2 Trocknungskammer oder Brutschrank zum Trocknen der Agarplatten, Wärmeübertragung durch Umluft, zwischen $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ regulierbar.

6.3 Brutschrank, regulierbar auf $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Wasserbad, regulierbar auf 44 °C bis 47 °C .

6.5 pH-Messgerät, kalibrierbar auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25 °C .

6.6 Petrischalen aus Glas oder Kunststoff mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm, oder bei Bedarf von 140 mm.

6.7 Messpipetten, kalibriert, ausschließlich für bakteriologische Zwecke mit einem Nennvolumen von 10 ml und 1 ml, abgestuft in 0,5-ml- und 0,1-ml-Skaleneinteilungen, und mit einer Auslauföffnung mit einem Nenndurchmesser von 2 mm bis 3 mm.

6.8 Spatel (Hockeyschlägertyp) aus einem Glas- oder Kunststoffstab von etwa 3,5 mm Durchmesser und 20 cm Länge und etwa 3 cm vom Ende im rechten Winkel gebogen; die Schnittenden müssen durch Erhitzen geglättet sein.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine wirklich repräsentative Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden ist.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Liegt keine entsprechende Internationale Norm vor, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

8 Probenvorbereitung

Die Probe wird nach der speziellen Internationalen Norm vorbereitet, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst.

Liegt keine entsprechende Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Einwaage, Erstverdünnung und Verdünnungen

Siehe ISO 6887-1 und die spezielle Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst.

9.2 Beimpfung und Bebrütung

9.2.1 Mit Hilfe einer sterilen Pipette (6.7) werden 0,1 ml der Probe, sofern das Ausgangsprodukt flüssig ist, oder der Erstverdünnung bei anderen Produkten, auf beide Agarplatten (5.2.5) überführt. Das Verfahren ist bei Bedarf mit weiteren dezimalen Verdünnungen zu wiederholen.

9.2.2 Sofern es bei bestimmten Produkten erforderlich ist, geringe Zahlen an *B. cereus* zu erfassen, kann die Nachweisgrenze um den Faktor 10 erhöht werden, indem bei flüssigen Produkten 1,0 ml der Probe oder bei anderen Proben 1,0 ml der Erstverdünnung untersucht wird. 1 ml des Inokulums wird mit einem sterilen Spatel (6.8) entweder auf der Oberfläche einer großen Petrischale (140 mm) oder über die Oberfläche von drei kleinen Petrischalen (90 mm) verteilt. In beiden Fällen werden Parallelansätze auf zwei großen bzw. sechs kleinen Petrischalen vorgenommen.

9.2.3 Das Inokulum wird mit dem Spatel (6.8) vorsichtig und so schnell wie möglich auf der Oberfläche der Agarplatten verteilt, ohne die Seiten der Petrischale mit dem Spatel zu berühren. Für jede Platte wird ein

frischer steriler Spatel verwendet. Die Agarplatten werden etwa 15 min mit aufgesetztem Deckel bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit das Inokulum in den Agar eindringen kann.

9.2.4 Die vorbereiteten Platten (9.2.3) werden umgedreht und 18 h bis 24 h im Brutschrank (6.3) bei 30 °C bebrütet. Falls sich keine deutlich sichtbaren Kolonien entwickelt haben, werden die Platten vor dem Auszählen weitere 24 h bebrütet.

9.3 Zählen der Kolonien

Nach der Bebrütung (9.2.4) werden vorzugsweise Platten aus zwei aufeinander folgenden Verdünnungen ausgewählt, die weniger als 150 Kolonien enthalten.

Auf jeder Platte werden die verdächtigen *B. cereus*-Kolonien gezählt. Diese sind groß, rosa (fehlende Mannitfermentation, siehe Anmerkung 1) und im Allgemeinen von einem Präzipitathof umgeben (Bildung von Lecithinase, siehe Anmerkung 2).

Falls auf den mit dem flüssigen Produkt oder der niedrigsten Verdünnung bei anderen Produkten beimpften Platten weniger als 15 typische Kolonien gewachsen sind, kann eine Schätzung der Keimzahl nach Abschnitt 10 vorgenommen werden.

ANMERKUNG 1 Falls die Platten einen hohen Gehalt an mannitvergärenden Mikroorganismen aufweisen, der zur Säurebildung führt, kann die typische rosa Färbung der *B. cereus*-Kolonien abgeschwächt sein oder völlig verschwinden.

ANMERKUNG 2 Einige *B. cereus*-Stämme zeigen nur eine schwache oder keine Lecithinasebildung. Kolonien dieser Stämme haben keinen Präzipitathof. Derartige Kolonien sollten ebenfalls bestätigt werden.

Falls ein Inokulum von 1,0 ml über drei Platten verteilt worden ist (siehe 9.2.2), sind diese Platten bei allen nachfolgenden Zähl- und Bestätigungsverfahren als eine Einheit zu behandeln.

9.4 Bestätigung

9.4.1 Auswahl und Reinigung der Kolonien für die Bestätigung

Von jeder nach 9.3 ausgewählten Platte werden fünf verdächtige Kolonien ausgewählt. Falls auf der Platte weniger als fünf Kolonien gewachsen sind, werden alle verdächtigen Kolonien berücksichtigt. Diese Kolonien werden nach den Festlegungen in 9.4.2 und 9.4.3 bestätigt.

Falls die Platten überwachsen sind und es nicht möglich ist, gut voneinander abgesetzte einzelne Kolonien auszuwählen, werden fünf verdächtige Kolonien auf Platten mit vollständigem Nährboden (5.2.4) ausgestrichen. Sie werden 18 h bis 24 h im Brutschrank (6.3) bei 30 °C bebrütet.

Von jeder Platte wird mindestens eine gut abgesetzte rosa gefärbte Kolonie ausgewählt. Diese Kolonie wird nach den Festlegungen in 9.4.2 und 9.4.3 bestätigt.

9.4.2 Hämolyseprüfung auf Schafblutagar

Die ausgewählten Kolonien (9.4.1) werden auf der Oberfläche von Schafblutagar-Platten (5.3) so ausgestrichen, eingestochen oder aufgetropft, dass eine gute Auswertung der Hämolysereaktion ermöglicht wird.

Nach einer Bebrütung über 24 h ± 2 h bei 30 °C wird die Hämolysereaktion ausgewertet.