

DIN EN 15784

ICS 65.120

Entwurf

Einsprüche bis 2020-03-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 15784:2009-12

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Trennung und Zählung von mutmaßlichen *Bacillus* spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 15784:2019**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Isolation and enumeration of presumptive *Bacillus* spp.;
German and English version prEN 15784:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-01-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 36 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15784:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 5725-2 siehe DIN ISO 5725-2

Änderungen

Gegenüber DIN EN 15784:2009-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Norm bei der Überarbeitung des Verfahrens an das VDLUFA-Verfahren 28.2.2 „Bestimmung von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis*“ angepasst und mit Validierungsdaten aus Ringversuchen mit kommerziellen Futtermitteln ergänzt;
- b) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Trennung und Zählung von mutmaßlichen *Bacillus* spp.

*Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis — Isolation and enumeration of presumptive *Bacillus* spp.*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Verdünnungslösung und selektives Nährmedium	6
6 Geräte	7
7 Probenahme	8
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
9 Durchführung	9
9.1 Herstellung der Agarplatten	9
9.2 Herstellung der Erstverdünnung und der Dezimalverdünnungen	10
9.3 Beimpfung und Bebrütung der Platten	11
9.4 Zählung der Kolonien	11
9.5 Bestätigung	12
10 Auswertung	12
11 Präzision	13
11.1 Allgemeines	13
11.2 Ringversuche	13
11.3 Wiederholpräzision	13
11.4 Vergleichpräzision	13
12 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Anmerkungen zum Verfahren	15
Anhang B (informativ) Ergebnisse der Ringversuche	16
Literaturhinweise	17

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15784:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 15784:2009 ersetzen.

Einleitung

Diese Methodik wurde zur Zählung keimfähiger *Bacillus*-Sporen entwickelt, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, um die Europäische Kommission zu befähigen, die korrekte Kennzeichnung von Futtermitteln zu überwachen. Sie wurde erstmals im Rahmen des EU-Projekts SMT4-CT98-2235 – „Methods for the official control of probiotics (microorganisms) used in animals feeds“) [1] erstellt. Bei der Überarbeitung des Verfahrens wurde sie an die VDLUFA-Methode 28.2.2 Bestimmung von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* angepasst und mit Validierungsdaten aus Ringversuchen mit im Handel erhältlichen Futtermittelprodukten ergänzt [1]. Das Verfahren wird in diesem Projekt für zwei Stämme von *Bacillus subtilis* und einen Stamm von *Bacillus licheniformis* validiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Verfahren auch für andere *Bacillus* spp., die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, geeignet ist. Vegetative Zellen werden in diesem Verfahren nicht berücksichtigt, weil alle anerkannten Produkte der *Bacillus*-Arten gegenwärtig Sporen sind.

Sporen von *Bacillus*-Arten überleben eine Verdünnung mit 0,2%iger Natriumhydroxidlösung, und die für *Bacillus*-Arten charakteristische Koloniemorphologie der einzeln zugelassenen Stämme wird mit dem vorgeschlagenen Verfahren [2] geprüft.

Dieses Verfahren ist für *Bacillus*-Arten, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, nicht selektiv, es kann jedoch zur Zählung von *Bacillus*-Arten in Futtermitteln in der Annahme angewendet werden, dass die *Bacillus*-Arten in einer weit größeren Anzahl vorhanden sind als andere *Bacillus*-Arten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt allgemeine Regeln für die Zählung von *Bacillus*-Arten in Futtermitteln (Zusatzstoffe, Vormischungen und Mischfuttermittel einschließlich mineralischer Futtermittel) fest, die *Bacillus*-Arten als einzelnen mikrobiellen Bestandteil oder in einem Gemisch mit anderen Mikroorganismen enthalten. Es gibt unterschiedliche Kategorien von Futtermittelproben:

- a) Zusatzstoffe, die etwa 10^{10} koloniebildende Einheiten (KbE/g) enthalten;
- b) Vormischungen, die etwa 10^{11} KbE/kg enthalten;
- c) Mischfuttermittel, Mehl oder Pellets, die etwa 10^9 bis 10^{10} KbE/kg enthalten.

Die Nachweisgrenze ist in EN ISO 7218 festgelegt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

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

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Bacillus

Gattung der grampositiven, stäbchenförmigen Bakterien

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in dieser Norm eingesetzt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Bacillus*-Arten können entweder obligat aerob oder fakultativ anaerob sein. Kultivierte *Bacillus*-Arten sind Katalase-positiv, wenn sie in Gegenwart von Sauerstoff kultiviert werden.

Anmerkung 3 zum Begriff: *Bacillus*-Arten können ovale Endosporen bilden.

Anmerkung 4 zum Begriff: *Bacillus*-Arten bilden Kolonien auf der Oberfläche von Soja-Casein-Pepton-Agar (TSA, en: Tryptone Soy Agar) nach Bebrütung für 16 h bis 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen, die der Beschreibung in 9.3 entsprechen.

4 Kurzbeschreibung

- a) Herstellung von sterilen und trockenen Agarplatten;
- b) eine repräsentative Untersuchungsprobe wird unter aseptischen Bedingungen entnommen;
- c) eine Erstverdünnung wird mit einer temperierten Verdünnung mit 0,2%iger Natriumhydroxidlösung hergestellt, um eine homogene Verteilung der Bakterienzellen aus der Prüfmenge zu erhalten und die vegetative Bakterienflora in der Verdünnung zu reduzieren;
- d) die Anzahl der Mikroorganismen je Volumeneinheit wird durch die Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen aus der Erstverdünnung reduziert, um eine zählbare Anzahl von Kolonien auf den Zählmedien zu erhalten;
- e) Beimpfen der vorbereiteten Platten mit einem Aliquot der optimalen Verdünnungen und Verteilung der Impfkultur mit einem sterilen Ausstrichspatel;
- f) die beimpften Platten werden für 16 h bis 24 h bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ unter aeroben Bedingungen bebrütet;
- g) Zählung der typischen Kolonien unter Beachtung der in Punkt 3 aufgelisteten typischen Eigenschaften der *Bacillus*-Arten;
- h) Bestätigung exemplarischer Isolate durch Mikroskopie oder biochemische Eigenschaften, falls erforderlich;
- i) Berechnung der koloniebildenden Einheiten von *Bacillus* spp. je g oder kg der Futtermittelprobe.

5 Verdünnungslösung und selektives Nährmedium

5.1 Verdünnungslösung

Diese Verdünnungslösung wird zur Herstellung der Erstverdünnung und zur Herstellung weiterer Dezimalverdünnungen verwendet.

Tabelle 1 — 0,2%ige Natriumhydroxidlösung

Natriumhydroxid (NaOH)	2,0 g
Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween® ¹ 80)	1 ml
Wasser, destilliert oder deionisiert	1 000 ml

Die Bestandteile werden in Wasser aufgelöst, die Lösung in geeignete Behälter (z. B. Flaschen oder Kolben, Kulturröhrchen) gefüllt und 15 min lang bei $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sterilisiert. Um einen Verlust während des Autoklavierens zu verhindern, werden Flaschen mit Schraubverschluss empfohlen.

Für den sofortigen Verbrauch wird die Lösung bei $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ in einem Wasserbad oder Brutschrank aufbewahrt.

1 Tween® ist ein Beispiel für ein geeignetes im Handel erhältliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2 Zählmedium Trypton-Soja-Agar (TSA)²

5.2.1 Zusammensetzung

Tabelle 2 — Zusammensetzung von TSA-Agar

Trypton	15,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Sojapepton	5,0 g
Agar	12 g bis 15 g ^a
Wasser, destilliert oder deionisiert	1 000 ml
pH 7,3 ± 0,2 bei 25 °C	
^a In Abhängigkeit von den Gelieigenschaften des Agars.	

5.2.2 Vorbereitung

Alle Bestandteile (siehe 5.2.1) werden unter Erwärmung in Wasser aufgelöst und in geeignete Behälter (z. B. Flaschen oder Kolben mit ungiftigen Metallschraubverschlüssen) gefüllt. Falls erforderlich, wird der endgültige pH-Wert so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren bei 25 °C 7,3 ± 0,2 beträgt. Für 15 min wird bei 121 °C ± 1 °C sterilisiert.

6 Geräte

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Laboratoriums und insbesondere die folgenden:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluftsterilisator) und Dampfsterilisation (Autoklav)

Nach EN ISO 7218.

6.2 Brutschrank

Geeignet, eine Temperatur von 30 °C ± 1 °C aufrechtzuerhalten. Optional auch geeignet, eine Temperatur von 40 °C ± 1 °C und/oder 44 °C bis 47 °C aufrechtzuerhalten.

6.3 Wasserbad

Geeignet, eine Temperatur von 44 °C bis 47 °C und 40 °C ± 1 °C aufrechtzuerhalten.

6.4 Labormixer

Die folgende Geräteausstattung darf verwendet werden (EN ISO 7218):

- ein Rotations-Walkmischer (Mischer) mit einer variablen Nenndrehzahl von 3 000 min⁻¹ bis 10 000 min⁻¹ sowie aseptische Glas- oder Metallschüsseln, die mit Abdeckungen ausgestattet sind; oder
- ein Beutel-Walkmischer mit sterilen Beuteln (Rührer), möglicherweise mit der Option, die Mischgeschwindigkeit und -zeit anzupassen; oder

² Das fertig hergestellte Nährmedium ist im Handel von verschiedenen Herstellern erhältlich.

- ein Vibrationsmischgerät mit sterilen Beuteln; oder
- jedes andere Homogenisierungssystem mit gleichwertiger Effizienz (z. B. ein Handmixer mit aseptischem Becherglas).

6.5 Mechanisches Mischgerät

Ein mechanischer Mischer, z. B. Vortex-Mischer (siehe EN ISO 7218), oder gleichwertiges Gerät.

6.6 Waage

Waagen mit dem erforderlichen Bereich und der erforderlichen Genauigkeit nach EN ISO 7218 für die verschiedenen zu wiegenden Produkte.

6.7 Kolben oder Schraubflaschen mit entsprechenden Fassungsvermögen

6.8 Kulturröhrchen mit entsprechenden Fassungsvermögen

6.9 Pipetten oder Pipettierer und sterile Spitzen zur Abgabe von 100 µl bis 1 ml

6.10 Sterile 5-ml-Messpipetten

Für Vollausschlag mit breiten (ca. 3 mm) Spitzen (z. B. serologische Pipette; alternativ: 5-ml-Messpipetten ohne Spitzen).

6.11 Sterile Ausstrichspatel

Sterile L-förmige oder dreieckig geformte Ausstrichspatel aus Glas oder Metall oder sterile Ausstrichspatel aus Kunststoff zum Einmalgebrauch.

Alternativ ist die Verwendung eines Spiralplattengeräts mit einem desinfizierten Dosiersystem oder von Einweg-Mikrospritzen möglich.

6.12 Sterile Petrischalen mit Nocken, 90 mm im Durchmesser

6.13 Laminarbox

6.14 Mikroskop

Geeignet für die Phasenkontrastmikroskopie bei 600facher bis 1 000facher Vergrößerung.

6.15 pH-Messgerät

Mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ -pH-Einheiten bei 20 °C bis 25 °C.

7 Probenahme

Das Probenahmeverfahren ist nach der spezifischen Norm für das entsprechende Produkt durchzuführen. Liegt keine derartige spezifische Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen. Allgemeine Regeln [1] für die amtliche Kontrolle der Probenahme von Futtermitteln sind anzuwenden.

ANMERKUNG Die Probenahme kann nach ISO 6497 [7] erfolgen. Obwohl EN ISO 6497 nicht für Mikroorganismen vorgesehen ist, scheint das in dieser Norm beschriebene Verfahren das am besten geeignete zu sein, das für Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoffe in Betracht gezogen wird, da keine anderen geeigneten Referenzen bestehen.

WARNUNG — Es ist darauf zu achten, eine mögliche Kreuzkontamination der Proben mit Mikroorganismen zu vermeiden, besonders nach der Probenahme von mit Mikroorganismen angereicherten Zusatzstoffen und Vormischungen. Falls erforderlich, wird Ausrüstung für die Probenahme vor jeder Probenahme gereinigt und desinfiziert, besonders nach der Probenahme von Mikroorganismen enthaltenden Zusatzstoffen und Vormischungen. Die Probe ist in einem sterilen Behälter aufzubewahren.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Vorbereitung der Untersuchungsprobe muss nach EN ISO 6498 und der entsprechenden Produktnorm erfolgen. EN ISO 6498 enthält allgemeine Richtlinien für die Vorbereitung der Untersuchungsprobe.

9 Durchführung

9.1 Herstellung der Agarplatten

Das Nährmedium wird wie in 5.2.2 beschrieben oder nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen in einem Wasserbad auf eine Temperatur von etwa 44 °C bis 47 °C werden Anteile von etwa 15 ml unter sterilen Bedingungen in jede Petrischale (6.12) gegossen und verteilt, um eine gleichmäßige Schicht zu erhalten.

Wenn das Nährmedium erstarrt ist, werden vier umgedrehte Platten aufeinandergestapelt und bei Raumtemperatur oder in einem Brutschrank bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für etwa 12 h oder über Nacht getrocknet. Alternativ sind die Agarplatten in der Laminarbox auszubreiten, um die Agaroberfläche für 30 min mit partiell abgehobenen Deckeln zu trocknen.

Die getrockneten Platten sind auf Sterilität zu überprüfen. Bei entsprechendem Schutz vor Austrocknung dürfen getrocknete Platten bis zu zwei Wochen lang in einem Kühlschrank bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ gelagert werden. Die Platten sind auf Raumtemperatur zu bringen, bevor sie verwendet werden.

WARNUNG — Auf Agarplatten mit nasser Oberfläche oder wenn die eingefüllte Menge an Nährmedium größer als 15 ml je Petrischale ist, können *Bacillus*-Arten sehr häufig schwärmende Kolonien auf der gesamten Platte bilden, was die Ermittlung der Koloniezahl auf diesen Platten unmöglich macht.