

DIN EN ISO 15213-1



ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2021-11-03
Vorgesehen als
teilweiser Ersatz für
DIN EN ISO 7937:2004-11

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von
Clostridium spp. –
Zählung von sulfitreduzierenden Clostridium spp. durch
Koloniezählverfahren (ISO/DIS 15213-1:2021);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15213-1:2021**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. –
Part 1: Enumeration of sulfite-reducing Clostridium spp. by colony-count technique
(ISO/DIS 15213-1:2021);
German and English version prEN ISO 15213-1:2021

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Clostridium spp. –
Partie 1: Dénombrement de Clostridium spp. sulfite-réducteur par la technique par comptage
des colonies (ISO/DIS 15213-1:2021);
Version allemande et anglaise prEN ISO 15213-1:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-09-03 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 oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 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 62 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15213-1:2021) 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 Arbeitskreiss NA 057-01-06-02 AK „Sporenbildende Bakterien“ 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.

Auf internationaler Ebene ersetzen ISO 15213-1, ISO 15213-2 und ISO 15213-3 zusammen ISO 15213:2003 und ISO 7937:2004. Da nur DIN EN ISO 7937:2004-11 Bestandteil des deutschen Normenwerkes ist, werden untenstehend nur die Änderungen gegenüber dieser aufgeführt.

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

ISO 707	siehe	DIN EN ISO 707
ISO 6887 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 13307	siehe	DIN EN ISO 13307
ISO 14189	siehe	DIN EN ISO 14189
ISO 16140-2	siehe	DIN EN ISO 16140-2
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 17604	siehe	DIN EN ISO 17604
ISO 18593	siehe	DIN EN ISO 18593

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 7937:2004-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Anwendungsbereich wurde auf Proben aus dem Bereich der Primärproduktion erweitert;
- b) der Anwendungsbereich wurde von lebensfähigen *Clostridium perfringens* auf sulfitreduzierende Anaerobier und sulfitreduzierende *Clostridium* spp. geändert;
- c) das Nährmedium wurde von Sulfite-Cycloserin-Agar (SC) auf Eisensulfite-Agar (IS) geändert;
- d) die Konzentration von Sulfite im Eisensulfite-Agar (IS) wurde von 1,0 g/l auf 0,5 g/l gesenkt (im Vergleich zum Grundmedium des Sulfite-Cycloserin-Agars);
- e) die Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C ist optional, falls die Hintergrundflora sehr hoch ist oder falls ausschließlich Sporen von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. in der Probe gezählt werden;

- f) eine Beschreibung für die Bestätigung von typische Kolonien wurde hinzugefügt;
- g) die optionale Bestätigung von typische Kolonien wurde von Lactose-Sulfit-Medium und Nitrat-Beweglichkeits-Medium auf nicht selektiven Blutagar (z. B. Columbia-Blutagar) mit aerober und anaerober Bebrütung geändert;
- h) aktualisierte Leistungsmerkmale wurden in Anhang C hinzugefügt;
- i) Anhang D beschreibt eine spezifische Arbeitsvorschrift für die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. in Futtermitteln.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 707, *Milch und Milcherzeugnis — Leitfaden zur Probenahme*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

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

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 13307, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Primärproduktion — Probenahmetechniken*

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

DIN EN ISO 16140-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung eines genormten Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 17604, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahme von Schlachttierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 18593, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen*

<i>Titel de:</i>	Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Clostridium spp. — Teil 1: Zählung von Sulfit reduzierenden Clostridium spp. durch Koloniezählverfahren (ISO/DIS 15213-1:2021)
<i>Titel en:</i>	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing Clostridium spp. by colony-count technique (ISO/DIS 15213-1:2021)
<i>Titel fr:</i>	Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Clostridium spp. — Partie 1: Dénombrement de Clostridium spp. sulfito-réducteur par la technique par comptage des colonies (ISO/DIS 15213-1:2021)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort.....	5
Einleitung.....	7
1 Anwendungsbereich.....	8
2 Normative Verweisungen.....	8
3 Begriffe.....	9
4 Kurzbeschreibung.....	9
4.1 Allgemeines.....	9
4.2 Herstellung von Verdünnungen.....	10
4.3 Zählung.....	10
4.4 Bestätigung.....	10
5 Nährmedien und Reagenzien.....	10
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	10
7 Probenahme.....	11
8 Herstellung der Untersuchungsprobe.....	11
9 Durchführung.....	11
9.1 Allgemeines.....	11
9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen.....	11
9.3 Vorbehandlung durch Erwärmung zur Auswahl von Sporen.....	11
9.4 Beimpfung und Bebrütung.....	12
9.5 Zählung typischer Kolonien.....	12
9.6 Bestätigung sulfitreduzierender <i>Clostridium</i> spp.....	13
10 Darstellung der Ergebnisse.....	13
10.1 Allgemeines.....	13
10.2 Zählung sulfitreduzierender <i>Clostridium</i> spp.....	13
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens.....	14
11.1 Ringversuch.....	14
11.2 Wiederholgrenze.....	14
11.3 Vergleichsgrenze.....	15
12 Prüfbericht.....	15
13 Qualitätssicherung.....	16
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens.....	17
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien.....	19
B.1 Allgemeines.....	19
B.2 Eisensulfitagar (ISA, en: Iron Sulfite Agar).....	19
B.2.1 Zusammensetzung.....	19
B.2.2 Herstellung.....	19
B.3 Columbia-Blutagar (CBA).....	20
B.3.1 Columbia-Blutagar-Grundmedium.....	20
B.3.2 Defibriniertes Blut (Pferde- oder Schafsblut).....	20

B.3.3	Vollständiges Grundmedium	20
B.4	Leistungsprüfung	21
Anhang C (informativ) Verfahrenvalidierungsstudien und Leistungsmerkmale		22
Anhang D (informativ) Spezielles Protokoll für die Zählung von sulfitreduzierenden <i>Clostridium</i> spp. in Futtermitteln.....		27
D.1	Allgemeines	27
D.2	Kurzbeschreibung	27
D.3	Nährmedien und Reagenzien	27
D.3.1	Erstverdünnungsmittel	27
D.3.2	Verdünnungsmittel.....	28
D.3.3	Polyoxyethylen-80-Sorbitan-Monolaurat (CAS-Nr. 9005-65-6).....	28
D.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
D.5	Durchführung	29
D.5.1	Prüfmenge und Herstellung der Erstverdünnung	29
D.5.2	Schüttelverfahren.....	30
D.5.3	Beutel-Walk-Mischer-Verfahren	30
D.5.4	Erste Verdünnung	30
Literaturhinweise		31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15213-1:2021) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird ISO 15213:2003 und EN ISO 7937:2004 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15213-1:2021 wurde von CEN als prEN ISO 15213-1:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Vorwort

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, *Microbiology* erarbeitet.

Diese erste Ausgabe von ISO 15213-1, zusammen mit ISO 15213-2 und ISO 15213-3, ersetzt ISO 15213:2003 und ISO 7937:2004, welche technisch überarbeitet wurden. Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zu ISO 15213:2003 sind folgende:

- der Anwendungsbereich wurde auf Proben aus dem Bereich der Primärproduktion erweitert;
- der Anwendungsbereich des Verfahrens wurde von Bakterien zu *Clostridium* spp. geändert; daher werden die typischen Kolonien auf den Eisensulfit-Agarplatten bestätigt;
- die Konzentration von Sulfit im Eisensulfitagar (ISA, en: Iron Sulfite Agar) wurde von 1,0 g/l auf 0,5 g/l reduziert;
- die Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C ist im Falle einer hohen Begleitflora oder bei der ausschließlichen Zählung von Sporen von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. in der Probe optional;
- die Option zur Verwendung von Röhrchen wurde entfernt;
- die Option zur Bebrütung der Proben bei 50 °C für die Zählung von thermophilen, sulfitreduzierenden Bakterien wurde entfernt;

- es wird beschrieben, wie die Bestätigung typischer Kolonien durchgeführt werden muss;
- in Anhang C werden die Leistungsmerkmale angegeben;
- Anhang D enthält ein spezielles Protokoll für die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. in Futtermitteln.

Einleitung

Sulfitreduzierende *Clostridium* spp. sind anaerobe, grampositive, sporenbildende, stabförmige Bakterien, die zur Familie der *Bacillaceae* gehören. Die wichtigsten Spezies in dieser Gruppe sind *Clostridium* (*C.*) *perfringens*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes* und *C. botulinum*. Einige Spezies können lebensmittelbedingte Erkrankungen verursachen. Als ubiquitäre Bakterien sind sie überwiegend in der Natur zu finden.

Sulfitreduzierende *Clostridium* spp., einschließlich *C. perfringens*, werden häufig als mikrobielle Indikatoren für Clostridienkontaminationen in der Herstellung von Lebensmitteln (z. B. Fleischproduktion) verwendet. Diese haben die Fähigkeit, wärmebeständige Sporen zu produzieren. Außerhalb der Milchindustrie ist die Verwendung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. als mikrobieller Indikator auf eine relativ geringe Anzahl von Lebensmitteln beschränkt. Derzeit werden sie in nicht milchhaltigen Lebensmitteln entweder als Indikator für fäkale Verunreinigung (insbesondere *C. perfringens*, siehe auch ISO 15213-2 und ISO 15213-3) und/oder als Indikator für die Desinfektions-/Prozessüberwachung im Zusammenhang mit dem potenziellen Wachstum und Überleben von anaeroben sporenbildenden Bakterien angewendet.

Dieser Teil von ISO 15213 beschreibt das horizontale Verfahren für die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. in Lebensmitteln, Futtermitteln, Umgebungsproben und Proben aus der Primärproduktion. Das Verfahren für die Zählung von *C. perfringens* ist in Teil 2 beschrieben. Teil 3 beschreibt das Verfahren für den Nachweis von *C. perfringens*. Diese drei Teile sind in einer Reihe Internationaler Normen veröffentlicht, da die Verfahren eng miteinander verbunden sind. Diese Verfahren werden häufig in Verbindung miteinander in einem Labor durchgeführt und die Medien und ihre Leistungsmerkmale können ähnlich sein.

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen technischen Änderungen gegenüber ISO 15213:2003, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als erheblich (siehe ISO 17468).

Diese Änderungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Leistungsmerkmale des Verfahrens.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Zählung von sulfitreduzierenden Anaerobiern und sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. mit dem Koloniezählverfahren fest. Dieser Teil von ISO 15213 gilt für

- Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Erzeugnisse, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln und
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieses horizontale Verfahren wurde ursprünglich für die Untersuchung aller Proben aus der Lebensmittelkette entwickelt. Basierend auf den zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments verfügbaren Informationen wird dieses Verfahren als für die Untersuchung aller Proben aus der Lebensmittelkette uneingeschränkt geeignet angesehen. Aufgrund der großen Produktvielfalt in der Lebensmittelkette ist es jedoch möglich, dass dieses horizontale Verfahren nicht bis ins Detail für alle Produkte geeignet ist. Dennoch wird erwartet, dass die erforderlichen Änderungen so gering sind, dass sie nicht zu einer signifikanten Abweichung von diesem horizontalen Verfahren führen.

Dieses Verfahren ist für die Zählung von Mikroorganismen in Untersuchungsproben geeignet, aber nicht darauf beschränkt, und basiert auf einer Anzahl von mindestens 10 gezählten Kolonien auf einer Platte. Dies entspricht einem erwarteten Kontaminationsgrad, der bei flüssigen Proben höher als 10 KBE/ml und bei festen Proben höher als 100 KBE/g ist.

ANMERKUNG Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch für die folgenden Lebensmittelkategorien validiert:

- 1) verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte;
- 2) Eier und Eiprodukte (Derivate);
- 3) verarbeitetes Obst und Gemüse;
- 4) Säuglingsnahrung und Getreideprodukte für Kleinkinder;
- 5) Mehrkomponenten-Lebensmittel bzw. Mahlzeitkomponenten;

und für die folgenden anderen Kategorien: (Heim-)Tierfuttermittel, Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion).

Da dieses Verfahren für mindestens fünf Lebensmittelkategorien validiert wurde, ist es für ein breites Spektrum von Lebensmitteln anwendbar. Da das Verfahren üblicherweise nicht für Proben in der Primärproduktion verwendet wird, wurde diese Kategorie nicht in die Validierungsstudie aufgenommen. Daher wurden für diese Kategorie keine Leistungsmerkmale ermittelt. Abschnitt 11 und Anhang C enthalten detaillierte Informationen zur Validierung.

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).

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

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

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

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:

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

3.1

sulfitreduzierende *Clostridium* spp.

Gattung von Mikroorganismen aus der Familie der *Clostridiaceae*, die üblicherweise in der Lage sind, in/auf Eisensulfitagar (ISA, en: Iron Sulfite Agar) unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, typische oder weniger typische Kolonien bilden und bei biochemischen Bestätigungsprüfungen bestimmte Merkmale aufweisen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die biochemischen Bestätigungsprüfungen sind in 9.6 beschrieben.

3.2

Zählung sulfitreduzierender *Clostridium* spp.

Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) von sulfitreduzierenden *Clostridium*-spp.-Bakterien (sulfitreduzierende *Clostridium* spp., 3.1) je ml oder je g oder Probe, wenn die festgelegte Prüfung durchgeführt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die festgelegte Prüfung ist in Abschnitt 9 beschrieben.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Zur Bildung einer gegossenen Platte wird eine festgelegte Menge einer Untersuchungsprobe bzw. bei anderen Produkten einer Erstverdünnung in einer leeren Petrischale aufgetragen und mit einem festgelegten geschmolzenen Nähragar gut vermischt. Unter gleichen Bedingungen und unter Anwendung von Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe werden weitere Platten vorbereitet. Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, muss vor dem Ausplattieren eine Wärmebehandlung von 10 min bei 80 °C durchgeführt werden.

Wenn erwartet wird, dass die Anzahl der KBE an oder nahe der Bestimmungsgrenze des Verfahrens liegt, werden vorzugsweise zwei Platten verwendet. Wenn zwei Platten verwendet werden, sollte die Summe der Kolonien mindestens 10 betragen. In diesem Fall wird erwartet, dass der Kontaminationsgrad bei flüssigen Proben höher als 5 KBE/ml und bei festen Proben höher als 50 KBE/g ist.

Ein Plattengussverfahren ist insbesondere für die Zählung von Produkten geeignet, von denen erwartet wird, dass sie sich ausbreitende Kolonien enthalten, die die Kolonien der Zielmikroorganismen verdecken können.

Für die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. sind vier aufeinanderfolgende Verfahrensschritte erforderlich, wie in Anhang A angegeben.

4.2 Herstellung von Verdünnungen

Für die Herstellung von Dezimalverdünnungen aus der Prüfmengung wird das in ISO 6887 (alle Teile) festgelegte Verfahren befolgt.

4.3 Zählung

Die Platten werden unter anaeroben Bedingungen 48 h bei 37 °C bebrütet. Nach der Bebrütung wird die Anzahl der typischen Kolonien, die eine schwarze oder graue bis gelbbraune Färbung aufweisen, gezählt. Die Färbung der Kolonien und des umgebenden Bereichs beginnt durch die Bildung von Eisen(II)-sulfid als Ergebnis der Reaktion zwischen Sulfidionen und im Medium vorhandenem dreiwertigem Eisen [Fe(III)].

4.4 Bestätigung

Typische Kolonien werden für die Bestätigung ausgewählt.

ANMERKUNG Wenn keine Bestätigung durchgeführt wird, können die Ergebnisse als „anaerobe sulfitreduzierende Bakterien“ angegeben werden.

5 Nährmedien und Reagenzien

Es werden aktuelle Laborpraktiken nach ISO 7218 befolgt. Die Zusammensetzung von Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung sind in Anhang B festgelegt. Für die Leistungsprüfung von Nährmedien werden die Verfahren nach ISO 11133 und/oder Anhang B befolgt.

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Ausstattung zum Einmalgebrauch mit geeigneten Kennwerten ist eine annehmbare Alternative zu Mehrweg-Glasgeräten. Übliche Grundausstattung mikrobiologischer Labore (siehe ISO 7218) und insbesondere Folgendes:

- 6.1 Geeignete Geräte zum Herstellen einer anaeroben Atmosphäre.
- 6.2 Geräte für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav).
- 6.3 Umluft-Trocken- oder Wärmeschrank, geeignet für den Betrieb bei 25 °C bis 50 °C.
- 6.4 Brutschrank, geeignet für den Betrieb bei 37 °C $\pm$ 1 °C.
- 6.5 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20 °C bis 25 °C.
- 6.6 Kühlschrank, geeignet für den Betrieb bei 5 °C $\pm$ 3 °C.
- 6.7 Sterile Röhrchen, Flaschen oder Glaskolben, mit geeignetem Nennvolumen. Es dürfen Flaschen, Kolben oder Röhrchen mit ungiftigen Schraubverschlüssen aus Metall oder Kunststoff verwendet werden.
- 6.8 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten, mit 10 ml und 1 ml Nennvolumen.
- 6.9 Sterile Impfösen, mit einem Volumen von ungefähr 1 μ l, oder Impfnadel oder Impfdraht.
- 6.10 Sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von ungefähr 90 mm und (optional) großer Größe (Durchmesser etwa 140 mm).

6.11 Wasserbad, auf 44 °C bis 47 °C und 80 °C $\pm$ 2 °C einstellbar.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Es wird die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, befolgt. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, die sich mit der Probenahme des betreffenden Produkts befasst, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Empfohlene Probenahmeverfahren sind angegeben in:

- ISO/TS 17728 für Lebensmittel und Futtermittel;
- ISO 707 für Milch und Milcherzeugnisse;
- ISO 6887-3 für Fisch und Fischereierzeugnisse;
- ISO 13307 für Primärproduktion;
- ISO 17604 für Schlachttierkörper;
- ISO 18593 für Oberflächen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Probe erhält. Die Probe sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

8 Herstellung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird aus der Laborprobe in Übereinstimmung mit der spezifischen Internationalen Norm zu dem betreffenden Produkt hergestellt: Die in ISO 6887 (alle Teile) festgelegten Verfahren werden befolgt. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Das Verfahren wird in Anhang A dargestellt.

9.2 Prüfmenge, Erstverdünnung und Verdünnungen

Siehe ISO 6887 (alle Teile) und die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Ein Vorschlag zur Herstellung der Erstverdünnung von Futtermittelproben ist in Anhang D angegeben.

9.3 Vorbehandlung durch Erwärmung zur Auswahl von Sporen

Wenn beabsichtigt ist, nur die Sporen zu zählen, wird die Dezimalverdünnungsreihe in einem Wasserbad 10 min $\pm$ 1 min auf 80 °C erwärmt. Die Wärmebehandlung muss innerhalb von 15 min nach Herstellung der Erstverdünnung erfolgen, um eine Keimung von Sporen zu vermeiden. Die Temperatur sollte überwacht werden, indem ein geeignetes Thermometer in eine Referenzflasche von gleicher Größe wie die Probenflasche gestellt wird, die das gleiche Wasservolumen mit der gleichen Ausgangstemperatur wie die behandelte Probe enthält. Die zum Erreichen von 80 °C benötigte Zeit darf 15 min nicht überschreiten und kann minimiert werden, indem sichergestellt wird, dass der Wasserspiegel mindestens 4 cm über dem

Niveau der Probe liegt und dass das Wasser im Wasserbad zirkuliert, um die Wärmeübertragung zu maximieren.

Die Erwärmungszeit (10 min) wird gestartet, wenn die Temperatur der Referenzprobe 80 °C erreicht hat. Nach der Wärmebehandlung sollten die Proben sofort auf ungefähr 20 °C abgekühlt werden.

Die Wärmebehandlung sollte auch die konkurrierende Flora in einigen Matrices reduzieren, die ein hohes Maß an Begleitflora enthalten (z. B. Flüssigmolke, Futtersilage).

9.4 Beimpfung und Bebrütung

9.4.1 Es werden zwei sterile Petrischalen (6.10) genommen. Mithilfe einer sterilen Pipette (6.8) wird in beide Petrischalen bei flüssigen Produkten jeweils 1 ml der Untersuchungsprobe bzw. bei anderen Produkten 1 ml der Erstverdünnung (10^{-1} -Verdünnung) gegeben. Wenn für mehr als eine Verdünnung Platten vorbereitet werden, darf dies auf eine Petrischale reduziert werden (siehe ISO 7218).

9.4.2 Es wird eine weitere sterile Petrischale (6.10) genommen. Mit einer weiteren sterilen Pipette (6.8) wird 1 ml der 10^{-1} -Verdünnung (bei flüssigem Produkt) bzw. 10^{-2} -Verdünnung (bei anderen Produkten) aufgetragen.

9.4.3 Gegebenenfalls wird das Verfahren mit weiteren Verdünnungen wiederholt, wobei für jede Dezimalverdünnung eine neue sterile Pipette verwendet wird.

9.4.4 Wenn angemessen und möglich, werden nur die entscheidenden Verdünnungsstufen (mindestens zwei aufeinanderfolgende Dezimalverdünnungen), welche eine Koloniezahl zwischen 10 und 150 Kolonien je Platte (in Petrischalen von 90 mm Durchmesser) bzw. zwischen 10 und 360 Kolonien je Platte (in Petrischalen von 140 mm Durchmesser) ergeben, für die Beimpfung der Petrischalen ausgewählt.

9.4.5 In jede Petrischale werden etwa 12 ml bis 15 ml des bei 44 °C bis 47 °C geschmolzenen und temperierten (6.11) Eisensulfit-Agarmediums (siehe B.2) gegossen. Die Zeit zwischen dem Ende der Herstellung der Erstverdünnung (bzw. der 10^{-1} -Verdünnung bei flüssigem Produkt) und dem Moment, in dem das Inokulum mit dem Nährmedium in Kontakt kommt (siehe B.2), sollte idealerweise weniger als 20 min betragen und darf 45 min nicht überschreiten, es sei denn, in der entsprechenden Internationalen Norm sind spezifische Bedingungen, wie z. B. das Einweichen dehydrierter Proben zur Verringerung von osmotischem Stress, angegeben.

9.4.6 Das Inokulum wird durch Drehen der Petrischalen vorsichtig mit dem Medium gemischt, und das Gemisch wird zum Verfestigen in den Petrischalen auf einer kalten horizontalen Fläche stehen gelassen.

9.4.7 Nach der vollständigen Verfestigung werden ungefähr 5 ml Medium (siehe B.2) als Überschichtung eingegossen, um die Entwicklung von sich ausbreitenden Kolonien auf der Oberfläche des Mediums zu verhindern. Das Medium wird zum Festwerden wie in 9.4.6 festgelegt stehen gelassen.

9.4.8 Die Platten werden umgedreht, in anaerobe Behälter (6.1) gelegt und bei 37 °C 48 h $\pm$ 2 h in einer anaeroben Atmosphäre bebrütet (6.4).

9.5 Zählung typischer Kolonien

9.5.1 Nach 48 h $\pm$ 2 h Bebrütung werden die Platten (9.4.7) auf präsumtive sulfitreduzierende *Clostridium* spp. untersucht.

Typische Kolonien, die auf dem Eisensulfit-Agarmedium eine schwarze oder graue bis gelbbraune Färbung aufweisen, werden gezählt.

Da die Farbe der Kolonien schnell verblasst und schließlich verschwindet, müssen die Platten innerhalb von 30 min nach Abschluss der anaeroben Bebrütung gezählt werden. Wenn mehrere anaerobe Behälter verwendet werden, sollten die Platten Behälter für Behälter oder in kleinen Partien überprüft werden, wenn die Bebrütung in einem anaeroben Brutschrank (6.1, 6.4) durchgeführt wurde.

ANMERKUNG Es kann eine diffuse, unspezifische Schwärzung des Mediums auftreten. Das Wachstum von anaeroben Bakterien, die Wasserstoff (nicht H_2S) produzieren, kann auch das vorhandene Sulfid reduzieren und zu einer allgemeinen Schwärzung des Mediums führen, was die Zählung typischer Kolonien erschwert.

9.5.2 Platten (9.5.1), die weniger als 150 präsumtive Kolonien (bei Petrischalen von 90 mm Durchmesser) oder weniger als 360 Kolonien (bei Petrischalen von 140 mm Durchmesser) enthalten, werden ausgewählt; diese Kolonien werden gezählt und die Anzahl der präsumtiven Kolonien je Platte wird aufgezeichnet. Dann werden nach dem Zufallsprinzip fünf solcher Kolonien aus jeder Schale zur Bestätigung (9.6) ausgewählt. Zur Zählung von Platten mit geringer oder hoher Anzahl präsumtiver Kolonien siehe ISO 7218.

9.6 Bestätigung sulfitreduzierender *Clostridium* spp.

9.6.1 Zur Bestätigung werden fünf präsumtive Kolonien aus jeder der Schalen genommen, die zur Zählung (9.5.2) zurückbehalten wurden. Wenn unter den Kolonien mehr als eine Morphologie vorhanden ist, wird eine von jeder Morphologie zur Anlage einer Subkultur und zur Bestätigung ausgewählt.

9.6.2 Jede der ausgewählten Kolonien wird mit einer sterilen Schlaufe (6.9) auf zwei nicht selektive Blutagarplatten, z. B. Columbia-Blutagar (B.3) gestrichen. Wenn kein Blut zur Verfügung steht, kann Columbia-Agar oder ein anderer nährstoffreicher Agar (z. B. Trypton-Soja-Agar oder Hirn-Herz-Infusionsagar) mit oder ohne Blut verwendet werden.

Mehrere Isolate können auf identifizierte Sektoren jeder der beiden nicht selektiven Agarplatten gestrichen werden. Ausstriche sollten eine Beobachtung der typischen Morphologie ermöglichen. Andere Ausstreichverfahren können verwendet werden.

Von jedem Plattenpaar wird eine Platte in aerober Atmosphäre und die andere in anaerober Atmosphäre (6.1) bei $37\text{ °C } 20\text{ h} \pm 2\text{ h}$ (6.4) bebrütet.

10 Darstellung der Ergebnisse

10.1 Allgemeines

Für die Berechnung der Ergebnisse wird (werden) das (die) Verfahren nach ISO 7218 befolgt. Die Ergebnisse werden als die Anzahl sulfitreduzierender Bakterien bzw. sulfitreduzierender *Clostridium* spp. in KBE je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmeverrichtung berechnet und angegeben.

10.2 Zählung sulfitreduzierender *Clostridium* spp.

Typische Kolonien werden bestätigt (9.6).

- Wenn Wachstum einer typischen Kolonie auf der anaerob bebrüteten Blutagarplatte auftritt und nicht auf der aerob bebrüteten Blutagarplatte, gehört die Kolonie zur Gattung *Clostridia*. Diese Kolonie und andere Kolonien mit der gleichen Morphologie auf ISA werden als sulfitreduzierende *Clostridium* spp. gezählt.
- Wenn Wachstum einer typischen Kolonie sowohl auf der anaerob als auch auf der aerob bebrüteten Blutagarplatte auftritt, gehört die Kolonie nicht zur Gattung *Clostridia*. Daher können diese Kolonie und andere Kolonien mit der gleichen Morphologie auf ISA nicht als sulfitreduzierende *Clostridium* spp. gezählt werden.

ANMERKUNG Andere alternative Verfahren können verwendet werden, um zu bestimmen, ob die typischen Kolonien (9.5) zur Gattung *Clostridia* gehören, sofern die Eignung des alternativen Verfahrens verifiziert wurde (siehe ISO 7218).

Die Ergebnisse werden nach ISO 7218 als die Anzahl sulfitreduzierender *Clostridium* spp. in KBE je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmeverrichtung berechnet und angegeben.

In Fällen, in denen keine typischen Kolonien von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. nachgewiesen werden, oder wenn keine typischen Kolonien als sulfitreduzierende *Clostridium* spp. bestätigt werden, wird ISO 7218 für die Darstellung der Ergebnisse in Sonderfällen befolgt.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Ringversuch

Ergebnisse des Ringversuchs zur Bestimmung der Präzision des Verfahrens sind in Anhang C zusammengefasst. Wiederhol- und Vergleichsgrenzen wurden mit 5 Nahrungsmitteltypen, Umweltabstrichen und gering kontaminierter Futtersilage ermittelt. Die aus dem Ringversuch abgeleiteten Werte sind möglicherweise nicht auf andere Konzentrationsbereiche und Nahrungsmitteltypen als die in Anhang C angegebenen anwendbar.

ANMERKUNG 1 In diesem Dokument sind die Worte „Kategorie“, „Typ“ und/oder „Einheit“ manchmal mit „(Nahrungsmittel)“ kombiniert, um die Lesbarkeit zu verbessern. Das Wort „Nahrungsmittel“ ist jedoch mit „Futtermittel“ und anderen Bereichen der Lebensmittelkette austauschbar, wie in Abschnitt 1 erwähnt.

ANMERKUNG 2 Im Ringversuch wurden die Wiederholpräzision und Vergleichpräzision nur im niedrigen Bereich ermittelt, da die Zählung von sulfitreduzierenden *Clostridium* spp. als Hygieneindikator und bei niedrigen Gehalten durchgeführt wird (z. B. liegt das höchste annehmbare Maß für Säuglingsnahrung zwischen 10 und 30 KBE/g).

11.2 Wiederholgrenze

Die absolute Differenz von zwei voneinander unabhängigen ($\log_{10}$ -transformierten) Einzelprüfergebnissen (Anzahl der KBE je Gramm bzw. je Milliliter) oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Prüfergebnisse auf der üblichen Skala, die/das nach dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial im selben Laboratorium durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in möglichst kurzen Zeitabständen ermittelt wird, darf nicht in mehr als 5 % der Fälle größer sein als die Wiederholgrenze r .

Als allgemeiner Indikator für die Wiederholgrenze r dürfen bei der Untersuchung von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Gesamtwerte (berechnet aus den Daten in Anhang C) verwendet werden:

$r = 0,20$ (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Prüfergebnissen), oder

$r = 1,57$ (angegeben als ein Verhältnis zwischen Prüfergebnissen).

BEISPIEL In einem bestimmten Labor wurde ein Prüfergebnis von 10 000 bzw. $1,0 \times 10^4$ bzw. $\log_{10} 4,0$ KBE je Gramm Probenmaterial ermittelt. Unter Bedingungen der Wiederholpräzision soll die Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Ergebnissen nicht größer als $\pm 0,20 \log_{10}$ -Einheiten sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis einer zweiten Prüfung der gleichen Probe zwischen 3,80 ($4,0 - 0,20$) und 4,20 ($4,0 + 0,20$) $\log_{10}$ -Einheiten liegt.

Bei nicht $\log$ -transformierten Ergebnissen soll das Verhältnis zwischen dem ersten Prüfergebnis und dem zweiten Prüfergebnis aus derselben Probe nicht größer als 1,57 sein. Es wird also erwartet, dass das zweite Prüfergebnis zwischen 6 370 ($= 10\,000 / 1,57$) und 15 700 ($10\,000 \times 1,57$) KBE je Gramm liegt.

11.3 Vergleichsgrenze

Die absolute Differenz von zwei voneinander unabhängigen ($\log_{10}$ -transformierten) Einzelprüfergebnissen (Anzahl der KBE je Gramm bzw. je Milliliter) oder das Verhältnis des höheren zum niedrigeren der beiden Prüfergebnisse auf der üblichen Skala, die/das nach dem gleichen Verfahren an identischem Untersuchungsmaterial in verschiedenen Laboratorien durch verschiedene Bearbeiter mit unterschiedlicher Geräteausrüstung ermittelt wird, darf nicht in mehr als 5 % der Fälle größer sein als die Vergleichsgrenze R .

Als allgemeiner Indikator für die Vergleichsgrenze R dürfen bei der Untersuchung von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Gesamtwerte (berechnet aus den Daten in Anhang C) verwendet werden:

$R = 1,36$ (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Prüfergebnissen), oder

$R = 22,68$ (angegeben als ein Verhältnis zwischen Prüfergebnissen).

ANMERKUNG Das ermittelte R ist hoch, da die verschiedenen Teilnehmer große Varianzen für Corned Beef in Dosen festgestellt haben.

BEISPIEL 1 In einem ersten Labor wurde ein Prüfergebnis von 10 000 bzw. $1,0 \times 10^4$ bzw. $\log_{10} 4,0$ KBE je Gramm Probenmaterial ermittelt. Unter Bedingungen der Vergleichspräzision soll die Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Ergebnissen nicht größer als $\pm 1,36 \log_{10}$ -Einheiten sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis eines zweiten Laboratoriums zwischen 2,64 ($4,0 - 1,36$) und 5,36 ($4,0 + 1,36$) $\log_{10}$ -Einheiten liegt.

Bei nicht $\log$ -transformierten Ergebnissen soll das Verhältnis zwischen dem Prüfergebnis des ersten Laboratoriums und dem eines zweiten Laboratoriums nicht größer als 22,68 sein. Es wird also erwartet, dass das Ergebnis des zweiten Laboratoriums zwischen 440 ($= 10\,000 / 22,68$) und 226 800 ($10\,000 \times 22,68$) KBE je Gramm liegt.

BEISPIEL 2 Ein Laboratorium möchte den höchsten Wert einer Probe ermitteln, der noch einen vorgegebenen Grenzwert einhält (z. B. einen Grenzwert von 1 000 oder $\log_{10} 3$). Dazu muss der R -Wert (auf der logarithmischen Skala) mit einem Faktor von 0,59 multipliziert werden.

Der Faktor 0,59 spiegelt die Tatsache wider, dass eine Prüfung mit einem einseitigen 95%-Intervall verwendet wird, um zu prüfen, ob der Grenzwert überschritten wird; er ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

Der höchste Wert beträgt 0,80 ($1,36 \times 0,59$) als Differenz zwischen $\log_{10}$ -transformierten Prüfergebnissen bzw. 6,31 ($10^{0,80}$) als Verhältnis zwischen Prüfergebnissen. Ergebnisse bis zu $\log_{10} 3,80$ ($\log_{10} 3 + \log_{10} 0,80$) bzw. 6 310 ($1\,000 \times 6,31$) zeigen also die Einhaltung des Grenzwertes an.

12 Prüfbericht

Im Prüfbericht muss Folgendes angegeben werden:

- das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 15213-1;
- das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt;
- die Größe der Prüfmenge und/oder die Art der untersuchten Objekte;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Vorkommnissen, die das (die) Prüfergebnis(se) beeinflusst haben könnten;