

DIN ISO 16649-1



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2019-07-10
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO 16649-1:2009-12

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
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-beta-D-Glucuronid (ISO 16649-1:2018);
Text Deutsch und Englisch**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* –
Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl
beta-D-glucuronide (ISO 16649-1:2018);
Text in German and English

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive –
Partie 1: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de
5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide (ISO 16649-1:2018);
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-05-10 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 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort.....	3
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
4.1 Einwaage, Erstverdünnung, Verdünnungen und Wiederbelebungs-schritt	8
4.2 Kultur auf Selektivmedium	8
4.3 Berechnung.....	8
5 Nährmedien und Reagenzien	8
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	8
7 Probenahme	9
8 Herstellung der Prüfprobe.....	9
9 Durchführung.....	10
9.1 Allgemeines	10
9.2 Einwaage, Erstverdünnung und Verdünnungen	10
9.3 Wiederbelebung.....	10
9.4 Transfer auf Selektivmedium und Bebrütung	10
9.5 Zählung der koloniebildenden Einheiten (KbE)	10
9.6 Berechnung.....	11
10 Angabe der Ergebnisse	11
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens.....	11
12 Prüfbericht.....	11
13 Qualitätssicherung.....	11
Anhang A (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Nährmedien und Reagenzien	12
A.1 Allgemeines	12
A.2 Wiederbelebungsmedium: Mineralien-modifizierter-Glutamat-Agar (MMGA) [12] [14].....	12
A.2.1 Zusammensetzung	12
A.2.2 Herstellung.....	13
A.2.3 Herstellung der Agarplatten.....	13
A.3 Selektivmedium: Trypton-Galle-X-Glucuronid-(TBX-)Agar	13
A.3.1 Zusammensetzung	13
A.3.2 Herstellung.....	13
A.3.3 Herstellung der Agarplatten.....	14
A.4 Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und der Membran.....	14
Literaturhinweise.....	16

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die deutsche Übersetzung der Internationalen Norm ISO 16649-1:2018, die vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet wurde, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche/nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ 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 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 707	siehe	DIN EN ISO 707
ISO 13307	siehe	DIN EN ISO 13307
ISO 16649-2	siehe	DIN ISO 16649-2
ISO 16649-3	siehe	DIN EN ISO 16649-3
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 17604	siehe	DIN EN ISO 17604
ISO/TS 17728	siehe	DIN CEN ISO/TS 17728
ISO 18593	siehe	DIN EN ISO 18593

Änderungen

Gegenüber DIN ISO 16649-1:2009-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Umgebungsproben und Proben aus der Primärproduktion wurden im Anwendungsbereich hinzugefügt;
- b) eine Mindestdauer für die Bebrütung (20 h) von Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar (TBX) während der selektiven Isolierung wurde aufgenommen;
- c) Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde hinzugefügt;
- d) um die Sicherheit der Anwender zu erhöhen, wird zur Lösung des chromatogenen Bestandteils (BCIG) die Verwendung des Verdünnungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) nicht mehr empfohlen;
- e) die Zusammensetzung des Mineralien-modifizierten Glutamat-Agars (MMGA) wurde entsprechend der ursprünglichen Rezeptur korrigiert (Asparaginsäure 0,024 g und Arginin 0,02 g).

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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 707, *Milch und Milcherzeugnisse — Leitfaden zur Probenahme*

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

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 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 CEN ISO/TS 17728, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel- und Futtermittelproben*

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

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*

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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 zum freiwilligen Charakter von Normen, die Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 16649-1:2001), die mit den folgenden wesentlichen Änderungen technisch überarbeitet wurde.

- Proben aus der Umgebung und der Stufe der Primärproduktion wurden in den Anwendungsbereich aufgenommen;
- die Mindestdauer der Bebrütung (20 h) für den Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar (en: tryptone-bile X-glucuronide, TBX) während der Kultur auf Selektivmedium wurde aufgenommen;
- die Leistungsprüfung von Nährmedien und der Membran für den Transfer wurde hinzugefügt;
- um die Sicherheit des Anwenders zu erhöhen, wird zum Auflösen des chromogenen Substrats (BCIG) das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) nicht mehr empfohlen;
- die Zusammensetzung des Mineralien-modifizierten Glutamat-Agars (MMGA) wurde auf die Werte der Originalformulierung korrigiert (Asparaginsäure 0,024 g und Arginin 0,02 g) [12].

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 16649 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

Wegen der großen Vielfalt von Lebensmittel- und Futtermittelprodukten ist dieses horizontale Verfahren möglicherweise für bestimmte Produkte nicht bis ins Einzelne geeignet. In diesem Fall dürfen andere Verfahren, die spezifisch für diese Produkte sind, angewendet werden, sofern dies aus berechtigten technischen Gründen absolut erforderlich ist. Nichtsdestotrotz sollte alles versucht werden, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich anzuwenden.

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen Änderungen zu ISO 16649-1:2001, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als geringfügig (siehe ISO 17468 [5]).

Bei der nächsten Überarbeitung dieses Dokuments werden alle zu dem Zeitpunkt verfügbaren Informationen hinsichtlich des Ausmaßes, in dem dieses horizontale Verfahren befolgt wurde, sowie die Gründe für Abweichungen von diesem Verfahren im Falle bestimmter Produkte berücksichtigt.

Die Harmonisierung von Prüfverfahren kann nicht sofort erfolgen, und für bestimmte Produktgruppen liegen möglicherweise bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen vor, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist jedoch anzustreben, dass solche Normen bei einer Überarbeitung verändert werden, um diesem Dokument zu entsprechen, sodass es sich bei schließlich noch verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren nur um solche handelt, die aus berechtigten technischen Gründen erforderlich sind.

Es gibt drei horizontale Verfahren (ISO 16649-1, ISO 16649-2 und ISO 16649-3) für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* [3] [4].

Der Anwender kann ISO 16649-1, ISO 16649-2 oder ISO 16649-3 wählen. Alle drei Teile sind für die allgemeine Anwendung bestimmt. Bei Lebensmitteln, die wahrscheinlich Zellen enthalten, die infolge bestimmter Eigenschaften der Lebensmittel oder bestimmter Bedingungen bei der Verarbeitung subletal verletzt worden sind, sollte allerdings vorzugsweise ISO 16649-1 oder ISO 16649-3 angewendet werden, da beide Verfahren einen Wiederbelebungs-schritt enthalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* durch ein Koloniezählverfahren nach Wiederbelebung fest; dabei werden Membranen verwendet und eine Bebrütung bei 44 °C auf einem festen Medium durchgeführt, das einen chromogenen Inhaltsstoff zum Nachweis des Enzyms β -Glucuronidase enthält [9] [10] [13] [14] [17] [18] [19] [20]. Es gilt für

- Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind,
- Erzeugnisse, die als Futtermittel bestimmt sind,
- Umgebungsproben aus den Bereichen Lebensmittelproduktion und Lebensmittelverarbeitung sowie
- Proben aus der Stufe der Primärproduktion, beispielsweise Kotproben von Tieren, Staubproben und Abstrichproben.

WARNUNG — Einige Stämme von *Escherichia coli* vermehren sich in bei 44 °C bebrüteten Nährmedien nur schwach oder gar nicht. Dazu gehören u. a. die Stämme *E. coli* 0157:H7 und 0157:H-. Außerdem sind einige *Escherichia coli*-Stämme, insbesondere diejenigen des Serotyps 0157:H7, meistens β -Glucuronidase-negativ [11]. Folglich werden einige Stämme von *E. coli*, u. a. auch pathogene, durch dieses Verfahren nicht nachgewiesen. Einige andere bestimmte Vertreter der *Enterobacteriaceae*, insbesondere *Shigella* [15] und *Salmonella* [16], können bei 44 °C ebenfalls eine β -Glucuronidase-Aktivität zeigen.

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:

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

3.1

β-Glucuronidase-positive *Escherichia coli*^{N1)}

Bakterien, die bei 44 °C auf Trypton-Galle-X-Glucuronid-(TBX-)Agar unter den in diesem Dokument festgelegten Bedingungen typische blaue oder blau-grüne Kolonien bilden

3.2

Zählung der β-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*

Bestimmung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) der β-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* (3.1) pro Gramm der Probe, pro Milliliter, pro Quadratzentimeter oder pro Probenahmegerät, wenn die Analyse in Übereinstimmung mit diesem Dokument durchgeführt wird

4 Kurzbeschreibung

4.1 Einwaage, Erstverdünnung, Verdünnungen und Wiederbelebungsschritt

Auf einem Mineralien-modifizierten Glutamat-Agar (MMGA) aufgelegte Membranen werden mit einer festgelegten Menge der Prüfprobe, der Erstverdünnung oder dezimaler Verdünnungen, beimpft und anschließend bei 37 °C für 4 h bebrütet [13] [14].

4.2 Kultur auf Selektivmedium

Zur Isolierung werden die Membranen nach dem Wiederbelebungsschritt auf MMGA auf den Trypton-Galle-X-Glucuronid-(TBX-)Agar transferiert und anschließend für 20 h bis 24 h bei 44 °C bebrütet.

4.3 Berechnung

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) der β-Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* pro Gramm oder pro Milliliter der Probe wird anhand der typisch blau oder blau-grün gefärbten Kolonien pro Platte berechnet.

5 Nährmedien und Reagenzien

Siehe ISO 7218 und ISO 11133 zur derzeitigen Laborpraxis.

Die Zusammensetzung von Nährmedien und Reagenzien, sowie deren Vorbereitung bzw. Herstellung werden in Anhang A beschrieben.

Siehe ISO 11133 und Anhang A zur Leistungsprüfung der Nährmedien und der für den Transfer verwendeten Membran.

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Einweg-Geräte sind eine zulässige Alternative zu Mehrweg-Glasgeräten, wenn sie geeignete Kennwerte aufweisen.

Die üblichen mikrobiologischen Laborgeräte (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Wärmeschränk) oder Dampfsterilisation (Autoklav). Wie in ISO 7218 festgelegt.

N1) Nationale Fußnote: Es handelt sich um präsumtiv bestimmte β-Glucuronidase-positive *Escherichia coli*, da einige Vertreter der Enterobacteriaceae, insbesondere *Shigella* [15] und *Salmonella* [16], bei 44 °C ebenfalls eine β-Glucuronidase-Aktivität zeigen können.

6.2 Trockenschrank oder **belüfteter Wärmeschrank**, der auf eine Temperatur zwischen 25 °C und 50 °C eingestellt werden kann, oder eine Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom.

6.3 Brutschrank, geeignet für den Betrieb bei 37 °C ± 1 °C.

6.4 Brutschrank, geeignet für den Betrieb bei 44 °C ± 1 °C.

6.5 Wasserbad, geeignet für den Betrieb bei 47 °C bis 50 °C.

6.6 Kühlschrank (zur Lagerung der vorbereiteten Medien), geeignet für den Betrieb bei 5 °C ± 3 °C.

6.7 Stumpfe Pinzette, steril, ungefähr 12 cm lang.

6.8 Sterile und nicht-inhibitorische Membranen, aus Celluloseacetat oder Cellulose-Mischester, mit einer Porengröße von 0,45 µm bis 1,2 µm und einem Durchmesser von 85 mm.

6.9 pH-Messgerät, geeignet zum Ablesen auf 0,01 pH-Wert-Einheiten bei 25 °C, das in der Lage ist, Messungen mit einer Fehlergrenze von ±0,1 pH-Einheiten durchzuführen.

6.10 Sterile graduierte Pipetten oder **automatische Pipetten** mit einem Nennvolumen von 1 ml.

6.11 Sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von etwa 90 mm.

6.12 Sterile Verteilinstrumente, aus Glas oder Kunststoff, zum Beispiel ein Stab von ca. 3,5 mm Durchmesser und 20 cm Länge, der 3 cm vom einen Ende in rechtem Winkel in die Form eines Hockeyschlägers gebogen wurde und bei dem die abgeschnittenen Enden durch Erhitzen geglättet wurden.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Siehe die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Wenn keine spezifische Internationale Norm vorliegt, die die Probenahme zu dem betreffenden Produkt festlegt, wird empfohlen, dass die Beteiligten diesbezüglich eine Vereinbarung treffen.

Empfohlene Probenahmeverfahren sind in den folgenden Dokumenten angegeben:

- ISO/TS 17728 [7] für Lebensmittel und Futtermittel;
- ISO 707 [1] für Milch und Milcherzeugnisse;
- ISO 13307 [2] für die Probenahme auf Stufe der Primärproduktion;
- ISO 17604 [6] für die Probenahme bei Schlachttieren;
- ISO 18593 [8] für die Probenahme von Oberflächen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Probe des Produkts empfängt, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

8 Herstellung der Prüfprobe

Die Prüfprobe ist aus der Laborprobe herzustellen, wobei das in der spezifischen Internationalen Norm zu dem betreffenden Produkt beschriebene Verfahren zu befolgen ist: siehe ISO 6887 (alle Teile). Wenn keine spezifische Internationale Norm vorliegt, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeines

Siehe ISO 7218 für allgemeine Gesichtspunkte.

9.2 Einwaage, Erstverdünnung und Verdünnungen

Es ist das in dem zutreffenden Dokument der Normenreihe ISO 6887 (alle Teile) und ggf. einer spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, festgelegte Verfahren anzuwenden.

Bei flüssigen Produkten wird aus der Prüfprobe bzw. bei anderen Produkten aus der Erstverdünnung (1 : 10-Verdünnung) eine einzelne Dezimalverdünnungsreihe hergestellt.

9.3 Wiederbelebung

9.3.1 Jeweils eine Membran (6.8) wird aseptisch mithilfe einer sterilen Pinzette (6.7) auf die trockene Oberfläche einer geeigneten Zahl von MMGA Platten (A.2) aufgelegt; dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen unter den Membranen eingeschlossen werden. Die Membranen werden mit einem sterilen Verteilinstrument (6.12) vorsichtig geglättet, falls erforderlich.

Mit einer sterilen Pipette (6.10) wird 1 ml der Prüfprobe oder der Erstverdünnung auf die Mitte der Membran aufgetragen. Falls nur die Erstverdünnung verwendet wird, werden die MMGA/Membran-Platten jeweils als Duplikate hergestellt. Andernfalls, wenn mehrere Verdünnungen plattiert werden, kann für jede Verdünnung auch nur eine einzige Platte verwendet werden; siehe ISO 7218. Das Inokulum wird mit einem sterilen Verteilinstrument gleichmäßig über die gesamte Membranoberfläche verteilt, wobei ein Verschütten der Flüssigkeit von der Membran zu vermeiden ist.

9.3.2 Der in 9.3.1 beschriebene Verfahrensschritt wird, falls notwendig, mit den weiteren dezimalen Verdünnungen wiederholt, wobei für jede Verdünnung eine neue, sterile Pipette und ein neues, steriles Verteilinstrument zu verwenden ist.

9.3.3 Die beimpften Platten werden in horizontaler Position für ungefähr 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis das Inokulum durch die Membran in den Agar eingezogen ist. Die Platten werden mit der Membran-/Agar-Oberfläche nach oben für $4 \text{ h} \pm 0,25 \text{ h}$ in dem auf 37 °C eingestellten Brutschrank (6.3) bebrütet.

9.4 Transfer auf Selektivmedium und Bebrütung

9.4.1 Nach dem Wiederbelebungsschritt werden die Membranen mit einer sterilen Pinzette (6.7) von den MMGA-Platten (WiederbelebungsmEDIUM) auf TBX-Agarplatten (A.3) transferiert.

WARNUNG — Die feuchte Membran wird sich an die Agaroberfläche ansaugen. Der Einschluss von Luftblasen ist zu vermeiden. Bei diesem Schritt darf kein Verteilinstrument verwendet werden.

9.4.2 Die Platten werden mit der Membran-/Agar-Oberfläche nach oben für 20 h bis 24 h in dem auf 44 °C (keinesfalls über 45 °C) eingestellten Brutschrank bebrütet. Es sollten nicht mehr als drei Platten übereinander gestapelt werden. In Brutschränken, die mit einem Luftzirkulationssystem ausgestattet sind, können höhere Stapel akzeptabel sein; in diesem Fall sollte die Temperaturverteilung verifiziert werden.

9.5 Zählung der koloniebildenden Einheiten (KbE)

Nach der festgelegten Bebrütungsdauer (9.4.2) sind die TBX-Agarplatten (A.3) auf typische blaue oder blaugrüne Kolonien zu untersuchen, die die Anwesenheit von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* anzeigen.