

DIN ISO 16649-2



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2020-06-24
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO 16649-2:2009-12

Entwurf

**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 (ISO 16649-2:2001);
Text Deutsch und Englisch**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli –
Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide
(ISO 16649-2:2001);
Text in German and English

Microbiologie des aliments –
Méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli β -glucuronidase positive –
Partie 2: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de
5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate (ISO 16649-2:2001);
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-04-24 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 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 24 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	7
5 Verdünnungsflüssigkeit und Nährmedien	8
5.1 Verdünnungsflüssigkeit	8
5.2 Nährmedium: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX)	8
5.2.1 Zusammensetzung	8
5.2.2 Herstellung	8
6 Geräte und Glasgeräte	8
7 Probenahme	9
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	9
9 Durchführung	9
9.1 Einwaage, Erstverdünnung und weitere Verdünnungen	9
9.2 Beimpfen und Bebrüten	9
9.3 Zählung der Kolonie bildenden Einheiten	10
10 Auswertung	10
10.1 Allgemeines	10
10.2 Berechnung	10
10.3 Schätzung einer geringen Anzahl	10
10.4 Berechnungsverfahren: Sonderfälle	12
10.5 Vertrauensgrenzen	12
11 Untersuchungsbericht	12
Literaturhinweise	14

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die deutsche Übersetzung der Internationalen Norm ISO 16649-2:2001, die vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ Unterkomitee SC 9 „Microbiology“ erarbeitet wurde, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

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

ISO 6887-1 siehe DIN EN ISO 6887-1

ISO 7218 siehe DIN EN ISO 7218

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 ISO 16649-2:2009-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme einer nationalen Fußnote im Anwendungsbereich analog zu DIN ISO 16649-1;
- b) redaktionelle Überarbeitung.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887-1, *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*

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

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Internationale Normen werden in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 3, erarbeitet.

Die von den Technischen Komitees angenommenen Norm-Entwürfe werden den Mitgliedsorganisationen zur Umfrage zur Verfügung gestellt. Für eine Veröffentlichung als Internationale Norm wird eine Zustimmung von mindestens 75 % der Mitgliedsländer, die abgestimmt haben, benötigt.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Teils der ISO 16649 Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Die Internationale Norm ISO 16649-2 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, erarbeitet.

ISO 16649 besteht unter dem allgemeinen Titel *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli* aus den folgenden Teilen:

- *Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*
- *Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*
- *Part 3: Most probable number technique*

Einleitung

Wegen der großen Vielzahl an Lebensmitteln und Futtermitteln ist dieses horizontale Verfahren möglicherweise für bestimmte Produkte nicht bis ins Einzelne geeignet. In diesem Fall, wenn es nachweisbar aus fachlichen Gründen unbedingt erforderlich ist, dürfen andere produktspezifische Verfahren verwendet werden. Dennoch sollte stets versucht werden, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich anzuwenden.

Bei der nächsten Überarbeitung dieses Teils von ISO 16649 werden sämtliche dann zur Verfügung stehenden Informationen hinsichtlich des Umfangs, in dem dieses horizontale Verfahren befolgt wurde, und der Gründe für Abweichungen von diesem Verfahren bei einzelnen Produkten berücksichtigt werden.

Die Harmonisierung der Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen. Für bestimmte Produktgruppen liegen möglicherweise bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen vor, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist anzustreben, dass solche Normen bei einer Überarbeitung verändert werden, um diesem Teil von ISO 16649 zu entsprechen, sodass es sich bei den schließlich noch verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren nur um solche handelt, die aus berechtigten technischen Gründen erforderlich sind.

Diese Internationale Norm beschreibt zwei horizontale Verfahren (ISO 16649-1 und ISO 16649-2) zur Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*.

Der Anwender kann entweder ISO 16649-1 oder ISO 16649-2 auswählen. Jeder Teil ist für die allgemeine Anwendung vorgesehen. ISO 16649-1 sollte jedoch bei Lebensmitteln angewendet werden, die möglicherweise stark gestresste Zellen enthalten.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16649 legt ein horizontales Verfahren zur Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*^{N1} in Produkten fest, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind. Dabei findet ein Koloniezählverfahren nach Bebrütung bei 44 °C auf einem festen Nährmedium, das einen chromogenen Bestandteil zum Nachweis des Enzyms β -Glucuronidase enthält, Anwendung.

WARNUNG — Stämme von *Escherichia coli*, die bei 44 °C kein Wachstum aufweisen, und insbesondere Stämme, die β -Glucuronidase-negativ sind, wie z. B. *Escherichia coli* O157, werden nicht nachgewiesen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Verweisung in diesem Text Bestandteil dieses Teils von ISO 16649 sind. Bei datierten Verweisungen gelten spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikation nicht. Anwender dieses Teils von ISO 16649 werden jedoch gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, die jeweils neuesten Ausgaben der nachfolgend angegebenen normativen Dokumente anzuwenden. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen normativen Dokuments. Mitglieder von IEC und ISO führen Verzeichnisse der gegenwärtig gültigen Internationalen Normen.

ISO 6887-1, *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, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Teils von ISO 16649 gelten die folgenden Begriffe.

3.1

β -Glucuronidase-positive *Escherichia coli*

Bakterien, die unter den in diesem Teil von ISO 16649 festgelegten Bedingungen bei 44 °C auf Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) charakteristische blau gefärbte Kolonien bilden

3.2

Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*

Bestimmung der Anzahl Kolonie bildender Einheiten (KBE) von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* je Milliliter oder Gramm Probe, wenn die Untersuchung und Berechnungen nach dem vorliegenden Teil von ISO 16649 durchgeführt werden

4 Kurzbeschreibung

4.1 Zwei parallele Platten aus Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX) werden mit einer festgelegten Menge der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung beimpft.

Unter denselben Bedingungen werden unter Verwendung der Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung zwei Platten je Verdünnungsstufe beimpft.

Die Platten werden für 18 h bis 24 h bei (44 ± 1) °C bebrütet und anschließend untersucht, um das Vorliegen von charakteristischen Kolonien nachzuweisen, die als β -Glucuronidase-positive *Escherichia coli* betrachtet werden können.

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

4.2 Die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli* je Gramm oder je Milliliter Probe wird berechnet (siehe Abschnitt 10).

5 Verdünnungsflüssigkeit und Nährmedien

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.

5.1 Verdünnungsflüssigkeit

Siehe ISO 6887-1 oder die spezifische Internationale Norm, in der das zu untersuchende Produkt behandelt wird.

5.2 Nährmedium: Trypton-Galle-Glucuronid-Agar (TBX)

5.2.1 Zusammensetzung

Casein, enzymatisch verdaut	20,0 g
Gallensalze Nr. 3	1,5 g
5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Glucuronsäure (BCIG)	144 μmol^a
Dimethylsulfoxid (DMSO) ^b	3 ml
Agar	9 g bis 18 g ^c
Wasser	1 000 ml

^a Zum Beispiel 0,075 g Cyclohexylammoniumsalz.

^b Dimethylsulfoxid schädigt durch Inhalation und (Haut-)Kontakt. Bei der Handhabung ist die Anwendung eines Abzugs ratsam. Aufgrund seiner Toxizität darf ein vom Hersteller empfohlenes Verdünnungsmittel verwendet werden.

^c In Abhängigkeit von der Gelierfähigkeit des Agars.

5.2.2 Herstellung

Die BCIG wird in Dimethylsulfoxid oder in dem vom Hersteller empfohlenen Verdünnungsmittel gelöst. Sämtliche Bestandteile werden in Wasser gelöst und bis zum Sieden erwärmt.

Der pH-Wert wird bei Bedarf so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $7,2 \pm 0,2$ bei 25 °C beträgt.

Das Nährmedium wird für 15 min in einem auf 121 °C eingestellten Autoklaven sterilisiert. Unmittelbar im Anschluss daran wird das Nährmedium im Wasserbad (6.3) bei 44 °C bis 47 °C abgekühlt.

6 Geräte und Glasgeräte

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte.

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

6.2 Brutschränke, geeignet für den Betrieb bei 44 °C $\pm$ 1 °C.

6.3 Wasserbad, das einen Temperaturbereich von 44 °C bis 47 °C aufrechterhalten kann.

6.4 Kulturröhrchen, -kolben oder -flaschen mit geeignetem Volumen.