



Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN 15787:2021

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungs-verfahren - Nachweis und Zählung von Lactobacillus spp. als Futtermittelzusatzstoff

Animal feeding stuffs: Methods of
sampling and analysis - Detection and
enumeration of Lactobacillus spp. used
as feed additive

Aliments des animaux: Méthodes
d'échantillonnage et d'analyse -
Détection et dénombrement des souches
de Lactobacillus spp. utilisées comme



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN 15787:2021 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN 15787:2021 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungs-verfahren - Nachweis und Zählung von *Lactobacillus* spp. als Futtermittelzusatzstoff

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis
- Detection and enumeration of *Lactobacillus* spp. used
as feed additive

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et
d'analyse - Détection et dénombrement des souches de
Lactobacillus spp. utilisées comme additifs pour
l'alimentation animale

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 2. August 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Verdünnungslösungen und Nährmedien	7
5.1 Verdünnungslösungen	7
5.1.1 Verdünnungslösung für die Ausgangssuspension	7
5.1.2 Verdünnungslösungen für Verdünnungsreihen	8
5.2 Nährmedien	8
5.2.1 Allgemeines	8
5.2.2 Zusammensetzung	9
5.2.3 Zubereitung	10
6 Geräte	10
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	12
9 Durchführung	12
9.1 Proben mit einer einzelnen oder einer zusätzlichen Mehrkomponenten-Mikroflora	12
9.2 Herstellung der Agarplatten für das Oberflächenverfahren	12
9.3 Herstellung von MRS-Agar für das Nährbodenplattenverfahren	12
9.4 Herstellung der Ausgangssuspension und der Dezimalverdünnungen	12
9.5 Beimpfung und Bebrütung der Platten	14
9.5.1 Allgemeines	14
9.5.2 Oberflächenverfahren	14
9.5.3 Nährbodenplattenverfahren	15
9.6 Zählung der Kolonien	15
9.7 Bestätigung	15
10 Angabe der Ergebnisse	16
11 Präzision	17
11.1 Allgemeines	17
11.2 Ringversuch	17
11.3 Wiederholpräzision	17
11.4 Vergleichpräzision	17
12 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Anmerkungen zum Verfahren	18
A.1 Allgemeines	18
A.2 Kritische Kupferkonzentration	18
Anhang B (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	20
B.1 Allgemeines	20
B.2 Ergebnisse des Ringversuchs	20
Literaturhinweise	21

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 15787:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2022 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt EN 15787:2009.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Änderung des Titels;
- Erweiterung des Anwendungsbereiches auf alle als Futterzusatzstoff eingesetzten Laktobazillen;
- Aktualisierung der normativen Querverweisungen;
- Zusatz von phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween® 80;
- Ergänzung der Möglichkeit, phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween® 80 für die Herstellung der Ausgangssuspension sowie als Verdünnungsmittel für Verdünnungsreihen zu verwenden;
- Anpassung der Zusammensetzung des MRS-Agars an handelsübliche Rezepturen;
- Verlagerung der Verwendung von LAMVAB-Medien aus dem normativen Teil des Dokuments in den informativen Anhang A;
- Ersatz des geforderten Labormixers mit einer Drehzahl von 18 000 min⁻¹ bis 22 000 min⁻¹ durch Homogenisiergeräte, z. B. nach EN ISO 7218, mit einer maximal geforderten Drehzahl von 10 000 min⁻¹;
- Vereinheitlichung der Homogenisierungsdauer für die Herstellung der Ausgangssuspension auf fünf Minuten für alle Futtermittelmatrixen;
- Herstellung der Ausgangssuspension generell mit temperierter tPBS;
- Ergänzung des Nährbodenplattenverfahrens als alternatives Kultivierungsverfahren;
- Ergänzung einer Vorgehensweise zur Untersuchung von Futtermitteln mit hohen Kupfergehalten im informativen Anhang A;
- Anpassung des Bereichs der akzeptierten Koloniezahlen für die Zählung von „≥ 30 bis ≤ 350“ auf „≥ 10 bis ≤ 200“ Kolonien je Platte.

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.

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

Einleitung

Das Verfahren wurde zur Zählung von Laktobazillen entwickelt, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, um die Europäische Kommission zu befähigen, die korrekte Kennzeichnung von Futtermitteln zu überwachen. Es wurde erstmals im Rahmen des EU-Projekts SMT4-CT98-2235 „Methods for the official control of probiotics used as feed additives“ [1] erstellt. Das beschriebene Verfahren wurde in einem Ringversuch [2] validiert. Das Verfahren wurde in diesem Projekt für einen Stamm von *Lactobacillus acidophilus* und einen Stamm von *Lactobacillus rhamnosus* validiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Verfahren auch für andere *Lactobacillus*-Stämme, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, geeignet ist.

Dieses Verfahren ist für Laktobazillen, die als Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden, nicht selektiv, es kann jedoch zur Zählung von *Lactobacillus* spp. in Zusatzstoffen, Vormischungen und Mischfuttermitteln in der Annahme angewendet werden, dass die zugesetzten Laktobazillen in einer weit höheren Anzahl vorhanden sind als alle anderen Laktobazillen.

Dieses Verfahren ist nicht für den Nachweis von ubiquitären *Lactobacillus* spp. und anderen Milchsäurebakterien aus Lebensmitteln und Futtermitteln einsetzbar.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt allgemeine Regeln für die Zählung von Laktobazillen in Futtermitteln (Zusatzstoffe, Vormischungen und Mischfuttermittel mit Ausnahme von mineralischen Futtermitteln) fest, die Laktobazillen als einzelnen mikrobiellen Bestandteil oder in einem Gemisch mit anderen Mikroorganismen enthalten. Die Anwendung des Verfahrens auf Vormischungen und Mischfuttermittel mit kritischen Kupfermengen erfordert ein besonderes Vorgehen (siehe Abschnitt A.2). Dieses Dokument ist nicht anwendbar auf mineralische Futtermittel, die als Ergänzungsfuttermittel definiert sind, die hauptsächlich aus Mineralstoffen zusammengesetzt sind und mindestens 40 % Rohasche enthalten (Verordnung (EC) 767/2009) [3].

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, Mehle oder Pellets, die etwa 10^9 KbE/kg enthalten.

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 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:

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

3.1

Laktobazillen

grampositive, Katalase-negative, stäbchenförmige, in Ketten angeordnete Bakterien

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Beschreibung basiert auf den Eigenschaften, wie sie in diesem Dokument definiert werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Laktobazillen bilden Kolonien, die der Beschreibung dieser Arten auf dem festgelegten selektiven Nährmedium nach einer Bebrütungsdauer von 48 h bis 72 h bei einer Temperatur von 37 °C unter anaeroben Bedingungen entsprechen (siehe 9.7).

4 Kurzbeschreibung

- a) Herstellung von sterilen und vorgetrockneten Nährbodenagarplatten oder Herstellung eines sterilen flüssigen Nährmediums, das auf 44 °C bis 47 °C temperiert ist;