

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)Nachweis von Salmonellen
in entseuchten Klärschlämmen (S 13)**DIN**
38 414

Teil 13

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; sludge and sediments (group S); determination of salmonellae in disinfected sewage sludges (S 13)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues; boues et sédiments (groupe S); dosage des salmonella en boues des eaux d'égout désinfectués (S 13)

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Erläuterungen).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Das Prinzip der Untersuchung stimmt überein mit der Internationalen Norm ISO 6579 : 1981.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

1 Allgemeine Angaben

Klärschlämme können pathogene Keime enthalten. Bei der landbaulichen Verwendung dieser Schlämme können seuchenhygienische Risiken durch Salmonellen entstehen.

Die Salmonellen gehören zur Familie der Enterobacteriaceae, Bakterien, die hauptsächlich im menschlichen und auch im tierischen Darmtrakt vorkommen. Die Untersuchung auf Salmonellen ist Laboratorien vorbehalten, welche die gesetzlich vorgeschriebene Erlaubnis für Arbeiten mit Krankheitserregern haben [1].

2 Anwendungsbereich

Das Verfahren ist anwendbar auf den Nachweis von Salmonellen in Klärschlämmen gemäß der Forderung des Nachweises der seuchenhygienischen Unbedenklichkeit nach der Klärschlamm-Verordnung [2]. Für Probenahme, Transport und Aufbewahrung der Proben gilt DIN 38 414 Teil 1; zusätzlich müssen alle mit der Probe direkt in Kontakt kommenden Geräte oder Gefäße steril, gegebenenfalls bis zur Verwendung steril verpackt, sein.

Fortsetzung Seite 2 bis 14

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

3 Begriffe

Salmonellen: Gramnegative, nicht sporenbildende, stäbchenförmige, überwiegend bewegliche Bakterien. Mittels biochemischer Verfahren sind Salmonellen von den anderen Gattungen der Familie Enterobacteriaceae abgrenzbar. Aufgrund ihrer Körper- und Geißelantigene (O- und H-Antigene) sind sie serologisch differenzierbar.

4 Grundlage des Verfahrens

Die Gesamtuntersuchung gliedert sich in 4 Teilschritte:

- a) Vermehrung der Bakterien in einem nicht selektiven Medium, um in der Probe vorhandene, gegebenenfalls subletal geschädigte Salmonellen so anzureichern, daß das weitere Nachweisverfahren durchgeführt werden kann (Voranreicherung).
- b) Anreicherung in einem selektiv wirksamen Medium, d. h. andere Keime werden in ihrem Wachstum gehemmt, Salmonellen dagegen gefördert (Selektivanreicherung).
- c) Gewinnung von Reinkulturen durch Anlage von Subkulturen auf festen Spezialnährböden.
- d) Morphologische, biochemische und serologische Differenzierung.

5 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens zum Nachweis von Salmonellen in entseuchten Klärschlämmen (S 13):

Verfahren DIN 38 414 — S 13

6 Geräte

- Probenahmegeräte nach DIN 38 414 Teil 1
- Glasflaschen mit Schliffstopfen, weithalsig, Nennvolumen 100 ml, z. B. Standflasche DIN 12 039 — G 100
- Glastrichter, Durchmesser 150 mm, z. B. Trichter DIN 12 445 — 150
- Brutschrank, z. B. nach DIN 58 945 Teil 1
- Dampfkochtopf
- Dampfsterilisator, z. B. nach DIN 58 946 Teil 2
- Kühlschrank
- Kulturschalen, steril, z. B. aus Kunststoff, mit Deckel; Durchmesser des Deckels etwa 90 mm
- Vollpipetten, Nennvolumen 50 und 100 ml, z. B. Pipette DIN 12 691 — VPAS 50

- Meßpipetten, Nennvolumen 1 und 10 ml,
z. B. Pipette DIN 12 697 — MPAS 1 — 001
- Kollehalter
- Impföse, z. B. Platin-Iridium-Draht, oberes Ende zu einer Öse von etwa 3 mm Durchmesser gebogen
- Stehkolben (Rundkolben), Nennvolumen 100, 250, 500 und 2000 ml,
z. B. Kolben DIN 12 347 — SE 100 oder Kolben DIN 12 385 — WE 100
- Schüttelgerät für Kulturröhrchen
- Kulturröhrchen, Durchmesser 16 mm, Länge 160 mm
- Verschuß, z. B. Kapsenberg-Kappen, passend für Kulturröhrchen
- Laborlöffel
- pH-Meßgerät, mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation und pH-Meßkette, z. B. nach DIN 19 261 und DIN 19 265

7 Chemikalien

Als Wasser zum Ansetzen der wäßrigen Lösungen wird doppelt destilliertes Wasser, als Reagenzien werden, wenn nicht anders angegeben, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwendet.

7.1 Agar-Agar, gereinigt und frei von Hemmstoffen, für die Mikrobiologie

7.2 Ammoniumeisen(III)-citrat, kristallin

Die nicht stöchiometrisch zusammengesetzte Verbindung enthält etwa 17 % Eisen.

7.3 Fleischextrakt, für die Mikrobiologie

7.4 D-Glucose, $C_6H_{12}O_6$, für die Mikrobiologie

7.5 Hefeextrakt, für die Mikrobiologie

7.6 Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 , wasserfrei, reinst

7.7 Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , kristallin, reinst

7.8 Lactose, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, für die Mikrobiologie

7.9 L-Lysinmonohydrochlorid, $C_6H_{15}ClN_2O_2$, für biochemische Zwecke

7.10 Natriumchlorid, NaCl

7.11 Natriumdesoxycholat, $C_{24}H_{39}NaO_4$, für die Mikrobiologie

- 7.12 Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4
- 7.13 Dinatriumhydrogenphosphatdodekahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 7.14 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$
- 7.15 Trinatriumphosphatdodekahydrat (Natriumphosphat), $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 7.16 Natriumthiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 7.17 Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie
- 7.18 Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie
- 7.19 Pepton aus Sojamehl, papainisch verdaut, für die Mikrobiologie
- 7.20 Phenolrot (Phenolsulfonphthalein), $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$
- 7.21 D(+)-Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, für die Mikrobiologie
- 7.22 Salzsäure I, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$
- 7.23 Salzsäure II, $\rho(\text{HCl}) = 1,16 \text{ g/ml}$
- 7.24 D(+)-Xylose, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, für biochemische Zwecke

7.25 Physiologische Natriumchlorid-Lösung

- 0,85 g Natriumchlorid (nach Abschnitt 7.10) in 100 ml Wasser lösen.
- Den pH-Wert der Lösung mit Natriumhydroxid-Lösung (nach Abschnitt 7.14) auf $(7,0 \pm 0,1)$ einstellen.
- Die Lösung je nach Bedarf in geeignete Glasgefäße abfüllen und im Dampfsterilisator sterilisieren.

7.26 Brillantgrün-Lösung

- 0,1 g Brillantgrün, $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, für die Mikrobiologie, in 100 ml Wasser lösen.

7.27 Bromkresolpurpur-Lösung

- 1 g Bromkresolpurpur, $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$, für die Mikrobiologie, in 100 ml Wasser lösen.

7.28 Harnstoff-Lösung

- 400 g Harnstoff, H_2NCONH_2 , in Wasser lösen und auf 1000 ml auffüllen.
- Die Lösung steril filtrieren und auf Sterilität prüfen.

7.29 Kovac's Reagenz (Indol-Reagenz)

- 5 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd, $C_9H_{11}NO$, im Wasserbad bei 60°C 5 min in 75 ml Isoamylalkohol, $C_5H_{12}O$, lösen.
 - Danach 25 ml Salzsäure II (nach Abschnitt 7.23) zugeben.
- Das Reagenz ist nach etwa 6 bis 7 h gebrauchsfertig (Gelbfärbung).

7.30 Kreatin-Lösung

- 0,5 g Kreatin-Monohydrat, $C_4H_9N_3O_2 \cdot H_2O$, in 100 ml Wasser lösen.

7.31 Magnesiumchlorid-Lösung

- 36 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, in 100 ml Wasser lösen.

7.32 Malachitgrün-Lösung

- 0,72 g Malachitgrün-Oxalat, $C_{23}H_{25}ClN_2 \cdot C_2O_4$, für die Mikrobiologie, in 100 ml Wasser lösen.

7.33 Naphthol; ethanolische Lösung

- 6 g 1-Naphthol, $C_{10}H_8O$, in 100 ml Ethanol, C_2H_5OH , absolut, lösen.

7.34 Phenolrot-Lösung

- 1 g Phenolrot (nach Abschnitt 7.20) in 12,5 ml Natriumhydroxid-Lösung (nach Abschnitt 7.14) lösen, danach die Lösung mit Wasser auf 250 ml auffüllen.

7.35 Lactose-Pepton-Lösung

- In einem Stehkolben, Nennvolumen 2000 ml, in 1000 ml Wasser unter Erhitzen im Dampftopf lösen:
- 17 g Pepton aus Casein (nach Abschnitt 7.17)
- 3 g Pepton aus Sojamehl (nach Abschnitt 7.19)
- 5 g Natriumchlorid (nach Abschnitt 7.10)
- Den pH-Wert mit Natriumhydroxid-Lösung (nach Abschnitt 7.14) auf $(7,2 \pm 0,1)$ einstellen.
- 10 g Lactose (nach Abschnitt 7.8) und 2 ml Bromkresolpurpur-Lösung (nach Abschnitt 7.27) zugeben.
- Die Lösung in Volumina zu je 10 ml in Kulturröhrchen abfüllen und im Dampfsterilisator sterilisieren.

7.36 Harnstoff-Medium

- In einem Stehkolben, Nennvolumen 2000 ml, in 1000 ml Wasser zum Quellen bringen und danach im Dampftopf in Lösung bringen: