

	Wasserbeschaffenheit Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 7899-1 : 1998) Deutsche Fassung EN ISO 7899-1 : 1998	DIN EN ISO 7899-1
--	--	---

ICS 07.100.20

Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water — Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium (ISO 7899-1 : 1998);
German version EN ISO 7899-1 : 1998

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduares — Partie 1: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide
(ISO 7899-1 : 1998); Version allemande EN ISO 7899-1 : 1998

Die Europäische Norm EN ISO 7899-1 : 1998 hat den Status einer Deutschen Norm.

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-
und Schlammuntersuchung —
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

und beschreibt das Verfahren

Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser — Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (K 14)

Nationales Vorwort

Die Internationale Norm ISO 7899-1, die vom ISO/TC 147 „Wasserbeschaffenheit“ (Sekretariat: Deutschland) erarbeitet wurde, wurde vom CEN aufgrund der Ergebnisse der auf der Basis der Wiener Vereinbarung durchgeführten Parallelumfrage und der formellen Abstimmung ohne Änderungen als Europäische Norm EN ISO 7899-1 übernommen.

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

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

Die als DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind beim Beuth Verlag einzeln oder zusammengefaßt erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblatt-Sammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam vom Beuth Verlag

Fortsetzung Seite 2 und 3
und 23 Seiten EN

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

GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert. Die für das Wasserhaushaltsgesetz (WHG) und für das Abwasserabgabengesetz (AbwAG) relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit dem WHG und allen bisher erschienenen Abwasserverwaltungsvorschriften als DIN-Taschenbuch (DIN-TAB 230) herausgegeben worden.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel

„Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon (0 30) 26 01 - 24 23, oder der Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5667-1	siehe DIN EN 25667-1
ISO 5667-2	siehe DIN EN 25667-2
ISO 5667-3	siehe DIN EN ISO 5667-3

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN 25667-1

Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 1: Anleitung zur Aufstellung von Probenahmeprogrammen (ISO 5667-1 : 1980); Deutsche Fassung EN 25667-1 : 1993

DIN EN 25667-2

Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 2: Anleitung zur Probenahmetechnik (ISO 5667-2 : 1991); Deutsche Fassung EN 25667-2 : 1993

DIN EN ISO 5667-3

Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Proben (ISO 5667-3 : 1994); Deutsche Fassung EN ISO 5667-3 : 1995

— Leerseite —

ICS 07.100.20

Deskriptoren: Wasser, Oberflächenwasser, Abwasser, Beschaffenheit, bakteriologische Beschaffenheit, Wasserverunreinigung, Prüfungen, Wasserprüfungen, mikrobiologische Untersuchung, Bestimmung, Zählung, Enterobacteriaceae

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit

**Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in
Oberflächenwasser und Abwasser**

Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren)
(ISO 7899-1 : 1998)

Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water — Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium (ISO 7899-1 : 1998)

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduelles — Partie 1: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide (ISO 7899-1 : 1998)

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 15. November 1998 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 Zentralsekretariat 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 Zentralsekretariat mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.

CEN

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

European Committee for Standardization

Comité Européen de Normalisation

Zentralsekretariat: rue de Stassart 36, B-1050 Brüssel

Vorwort

Der Text der Internationalen Norm ISO 7899-1 : 1998 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muß den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 1999, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 1999 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen:

Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 7899-1 : 1998 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

ANMERKUNG: Die normativen Verweisungen auf Internationale Normen sind im Anhang ZA (normativ) aufgeführt.

Einleitung

Ziel dieses Teils der ISO 7899 ist es, die vier wichtigsten Arten der intestinalen Enterokokken, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae*, die häufig im Fäzes von Menschen und warmblütigen Tieren vorkommen, zu erfassen. Andere fäkale Enterokokkenarten wie *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae* und *E. gallinarum* sowie Stämme von *Streptococcus bovis/equinus* können teilweise miterfaßt werden, aber sie kommen nur selten in den Umweltproben vor. Ihre Wiederfindungsrate ist normalerweise gering. *Enterococcus casseliflavus* und *E. mundtii* sind nicht-fäkale Arten, die, wenn sie in den Wasserproben vorhanden sind (z. B. durch den Einfluß von Pflanzenmaterial oder durch einige Industrieabwässer), als fäkale Enterokokken gezählt werden. Diese und andere selten vorkommende nicht-fäkale Arten bilden normalerweise ein gelbes Pigment auf nicht selektivem Medium. Die mögliche Beeinflussung durch nicht-fäkale *Enterococcus*-Arten muß daher bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 7899 legt ein miniaturisiertes Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von Hauptvertretern der intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser durch Kultivierung in einem Flüssigmedium fest. Das Verfahren kann für alle Oberflächen- und Abwasserarten angewandt werden, besonders für solche, die reich an Schwebstoffen sind.

Das Verfahren ist nicht geeignet für Trinkwasser und sonstige Wasserarten, für die der Leitwert weniger als 15 je 100 ml beträgt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden normativen Dokumente enthalten Festlegungen, die durch Bezugnahme in diesem Text Bestandteil der vorliegenden Internationalen Norm sind. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Internationalen Norm waren die angegebenen Ausgaben gültig. Alle normativen Dokumente unterliegen der Überarbeitung. Vertragspartner, deren Vereinbarungen auf dieser Internationalen Norm basieren, werden gebeten, die Möglichkeit zu prüfen, ob die jeweils neuesten Ausgaben der im folgenden genannten Normen angewendet werden können. Die Mitglieder von IEC und ISO führen Verzeichnisse der gegenwärtig gültigen Internationalen Normen.

ISO 3951 : 1989

Sampling procedures and charts for inspection by variables for percent non-conforming

ISO 5667-1 : 1980

Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes

ISO 5667-2 : 1991

Water quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques

ISO 5667-3 : 1994

Water quality — Sampling — Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples

ISO 8199 : 1988

Water quality — General guide to the enumeration of microorganisms by culture

ISO/IEC Guide 2 : 1996

Standardization and related activities — Vocabulary

3 Begriffe

Für diesen Teil von ISO 7899 gelten die Begriffe und Definitionen im ISO/IEC Guide 2 und die folgenden:

3.1 Intestinale Enterokokken

Mikroorganismen, die fähig sind, aerob bei 44 °C zu wachsen und 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucosid (MUD) in Anwesenheit von Thalliumacetat, Nalidixinsäure und 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (TTC) in dem angegebenen Flüssigmedium zu hydrolysieren.

4 Grundlagen des Verfahrens

Einimpfen der verdünnten Proben in eine Reihe Mikrotiterplatten-Vertiefungen, die getrocknetes Kulturmedium enthalten.

Untersuchung der Mikrotiterplatten unter ultraviolettem Licht bei 366 nm im Dunkeln nach einer Inkubationszeit von 36 h bis maximal 72 h bei $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Das Vorkommen von Enterokokken wird durch Fluoreszenz angezeigt, die aus der Hydrolyse des MUD resultiert. Die Ergebnisse werden als Wahrscheinlichkeitszahl (*MPN*) je 100 ml angegeben.

5 Geräte

Mit Ausnahme der steril gelieferten Materialien müssen Glasgeräte nach den Angaben in ISO 8199 sterilisiert werden.

Herkömmliche mikrobiologische Laborausstattung, insbesondere:

5.1 Gerät zur Sterilisation durch trockene Heißluft (Trockenschrank) oder Dampf (Autoklav)

5.2 Temperaturregelter Brutschrank, eingestellt auf $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$

5.3 Tunneltrockner oder **Sicherheitswerkbank** (vorzugsweise Klasse II)

5.4 Beobachtungskammer mit UV-Licht (Wood's Lamp 366 nm)

WARNUNG: UV-Licht schädigt die Augen und die Haut. Handschuhe und Schutzbrille tragen.

5.5 Tragbares Refraktometer (optional)

5.6 pH-Meßgerät, mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$

5.7 Reagenzgläser, 16 mm × 160 mm und 20 mm × 200 mm oder **Glaskolben** mit ähnlichen Fassungsvermögen.

5.8 Einstellbare oder **voreingestellte 8-Kanal-Multipipette**, oder jedes andere geeignete System, zur Messung und Verteilung von 200 µl je Vertiefung.

5.9 Sterile Spitzen für die Multikanalpipette

5.10 Zubehör zur Sterilisation von Flüssigkeiten durch Membranfilter, mit einer nominellen Porenweite von 0,2 µm.

5.11 Sterile Mikrotiterplatten, mit 96 Vertiefungen, 350 µl, Flachboden, nicht fluoreszierend.

5.12 Sterile Haftstreifen zur Abdeckung der Mikrotiterplatten.

5.13 Sterile Petrischalen, 90 mm Durchmesser

6 Probenahme

Die Probenahme und den Transport der Proben zum Labor nach ISO 8199 und ISO 5667-1, ISO 5667-2 und ISO 5667-3 durchführen.

7 Kulturmedien und Verdünnungslösungen

7.1 Allgemeine Angaben

Zur Sicherstellung reproduzierbarer Ergebnisse Kulturmedien und Verdünnungslösungen aus Komponenten einheitlicher Qualität und Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ zubereiten oder pulverförmige Verdünnungslösungen oder Fertigmedien verwenden, die nach Angaben des Herstellers zubereitet werden. Die Zubereitung mit demineralisiertem oder destilliertem Wasser durchführen, welches frei von Substanzen ist, die unter den Testbedingungen fähig sind, das Wachstum zu hemmen. Falls die Medien nicht sofort Verwendung finden, im Dunkeln bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ bis zu einem Monat aufbewahren unter Bedingungen, die jegliche Änderungen in der Zusammensetzung der Medien verhindern.

ANMERKUNG: Die Anwendung von Chemikalien anderer Reinheitsgrade ist erlaubt, vorausgesetzt, es wurde gezeigt, daß sie vergleichbare Ergebnisse liefern.

7.2 Verdünnungslösungen

Zur Herstellung der Verdünnungen werden folgende Verdünnungslösungen verwendet:

7.2.1 SD (Spezielle Verdünnungslösung)

Synthetisches Meersalz ¹⁾	22,5 g
Bromphenolblau-Lösung (optional)	10 ml
Destilliertes Wasser	1 000 ml

Im Autoklav (5.1) bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ 15 min bis 20 min sterilisieren.

Die Bromphenolblau-Lösung wird hergestellt, indem 0,04 g zu 100 ml 50%igem Ethanol gegeben werden. Sie dient nur dazu, die SD blau zu färben, um Verwechslungen mit demineralisiertem oder destilliertem Wasser zu vermeiden.

7.2.2 Demineralisiertes oder destilliertes Wasser

Demineralisiertes oder destilliertes Wasser, frei von Substanzen, die unter den Testbedingungen das Wachstum hemmen.

Im Autoklav (5.1) bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ 15 min bis 20 min sterilisieren.

¹⁾ Eine charakteristische Analyse eines käuflich erhältlichen und geeigneten Meersalzes ist im informativen Anhang C zu finden. Reine NaCl-Lösungen eignen sich nicht, da sie zu deutlicher Hemmung führen.