

DIN EN ISO 8199



ICS 07.100.20; 13.060.70

**Wasserbeschaffenheit –
Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch
Kulturverfahren (ISO 8199:2005);
Deutsche Fassung EN ISO 8199:2007**

Water quality –

General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture (ISO 8199:2005);
German version EN ISO 8199:2007

Qualité de l'eau –

Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu
de culture (ISO 8199:2005);

Version allemande EN ISO 8199:2007

Gesamtumfang 46 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

und beschreibt das Verfahren

Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren (K 20).

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 8199:2007) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water Quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ des NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Bezeichnung des Verfahrens Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren (K 20):

Verfahren DIN EN ISO 8199 — K 20

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

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 bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) nach § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz — WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG als Loseblattsammlung „Analysenverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ (Ergänzungsbände) von der Beuth Verlag GmbH 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 den Reihen 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 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

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

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 5667-2	siehe DIN EN ISO 5667-1
ISO 5667-3	siehe DIN EN ISO 5667-3
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 6887-1	siehe DIN EN ISO 6887-1
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 7899-1	siehe DIN EN ISO 7899-1
ISO 9308-3	siehe DIN EN ISO 9308-3
ISO/TS 11133-1	siehe DIN V ENV ISO 11133-1
ISO/TS 11133-2	siehe DIN ISO/TS 11133-2
ISO/TR 13843	siehe DIN V ENV ISO 13843
ISO 16140	siehe DIN EN ISO 16140
ISO 19458	siehe DIN EN ISO 19458

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN EN ISO 5667-1, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 1: Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 5667-3, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Wasserproben*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

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*

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

DIN EN ISO 9308-3, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser — Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren)*

DIN V ENV ISO 11133-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitungen für die Zubereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 1: Allgemeine Anleitungen für die Qualitätssicherung von Nährmedien im Laboratorium (ISO/TS 11133-1)*

DIN ISO/TS 11133-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN V ENV ISO 13843, *Wasserbeschaffenheit — Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren (ISO/TR 13843)*

DIN EN ISO 16140, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren*

DIN EN ISO 19458, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen*

Deutsche Fassung

**Wasserbeschaffenheit —
Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch
Kulturverfahren
(ISO 8199:2005)**

Water quality —
General guidance on the enumeration of micro-organisms
by culture
(ISO 8199:2005)

Qualité de l'eau —
Lignes directrices générales pour le dénombrement des
micro-organismes sur milieu de culture
(ISO 8199:2005)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. September 2007 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 Management-Zentrum des CEN 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, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Allgemeines.....	5
5 Verdünnungslösungen und Kulturmedien.....	6
6 Sterilisation von Geräten und Glasbehältern	8
7 Probenvorbereitung.....	9
8 Zählung nach Beimpfen einer Teilprobe in (oder auf) festem Medium.....	9
9 Zählung durch Beimpfen von Flüssigmedium	20
Anhang A (informativ) Kriterien für die Auswahl eines Zählverfahrens.....	27
Anhang B (informativ) MPN-Tabellen	32
Literaturhinweise	42

Vorwort

Der Text von ISO 8199:2005 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water Quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 8199:2007 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, 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 April 2008, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2008 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 8199:2005 wurde vom CEN als EN ISO 8199:2007 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Techniken zur Isolierung und Zählung von Mikroorganismen, die auf deren Fähigkeit, auf einem bestimmten Nährmedium zu wachsen, beruhen, sind ein wichtiges und weit verbreitetes Verfahren zur Beurteilung der mikrobiologischen Wasserbeschaffenheit. Anliegen dieses Leitfadens ist es, die gleichartigen Informationen zu den verschiedenen Verfahren zur Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen in einem einzigen Dokument zu sammeln, um eine Wiederholung von technischen Details in einzelnen Normen zu vermeiden und die Wahl des am besten geeigneten Verfahrens für eine bestimmte Fragestellung zu erleichtern.

WARNUNG — Anwender dieser Internationalen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

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

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm gibt eine Anleitung zu Arbeitsweisen, die für jedes Verfahren für die mikrobiologische Untersuchung von Wasser, besonders für die Aufbereitung von Proben, Kulturmedien und Geräten üblich sind. Sie beschreibt die unterschiedlichen verfügbaren Zählverfahren und die Kriterien für die Auswahl eines bestimmten Verfahrens. Diese Internationale Norm ist hauptsächlich für Bakterien, Hefen und Pilze bestimmt. Einige Aspekte sind auch auf Viren und Parasiten anwendbar.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 3696:1987, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*

3 Kurzbeschreibung

Das hier beschriebene Verfahren beruht auf der Impfung eines bekannten Wasserprobenvolumens auf oder in ein Kulturmedium (fest oder flüssig). Es wird angenommen, dass sich während der Inkubation jeder vorhandene Mikroorganismus vermehrt, so dass entweder eine Kolonie auf festem Nährboden zu sehen ist oder sichtbare Veränderungen des flüssigen Nährmediums zu beobachten sind. Die Auswahl eines bestimmten Verfahrens hängt nicht nur von der Art des gesuchten Mikroorganismus, sondern auch von der Beschaffenheit des untersuchten Wassers und der Fragestellung ab.

4 Allgemeines

Einheitlichkeit von Temperaturen und (Inkubations-)Zeiten: Die folgenden Temperaturbereiche und Zeitspannen für die Inkubation und Lagerung sind akzeptabel, vorausgesetzt, sie sind für den Zielorganismus angemessen und in der jeweiligen speziellen Norm werden nicht andere Daten genannt.

Lagertemperaturen: $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$; $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$; $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$;

Inkubationstemperaturen: $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$; $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$;

Sterilisationstemperaturen: $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$; $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$; $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$;

Inkubationszeitspannen: $(21 \pm 3) \text{ h}$; $(44 \pm 4) \text{ h}$; $(68 \pm 4) \text{ h}$.

Falls erforderlich, können andere Zeiten und Temperaturen für bestimmte Verfahren angegeben sein.

Die oberen Temperaturgrenzen sind kritisch (sie können einen großen Einfluss auf das Wachstum haben). Die unteren Temperaturgrenzen dürfen für kurze Zeitintervalle unterschritten werden z. B. durch das Öffnen der Tür eines Brutschrankes; die Zieltemperatur muss jedoch kurzfristig wieder erreicht und eingehalten werden.

Toleranzen für Volumen und Massen: Wenn nicht anderweitig angegeben, liegt die akzeptierte Abweichung jedes gemessenen Wertes bei $\pm 5 \%$.

5 Verdünnungslösungen und Kulturmedien

5.1 Allgemeines

5.1.1 Qualitätsanforderungen

Für die Herstellung von Nährmedien Materialien gleichmäßiger Qualität und Chemikalien analytischer Reinheit verwenden. Chemikalien anderen Reinheitsgrades können eingesetzt werden, vorausgesetzt, es kann gezeigt werden, dass sie zu gleichen Ergebnissen führen. Alternativ dürfen dehydrierte Fertigmedien oder Verdünnungslösungen verwendet werden. Die Angaben des Herstellers strikt befolgen.

Destilliertes oder demineralisiertes Wasser, frei von Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen unter den Testbedingungen beeinflussen könnten, einsetzen. Wasser der Qualität 3 nach ISO 3696:1987 verwenden.

Wenn nicht anders angegeben, die Zusätze dem angegebenen Volumen Wasser hinzufügen, anstatt das Volumen auf einen bestimmten Wert aufzufüllen, wie es für die Herstellung von mikrobiologischen Nährmedien üblich ist.

Die Qualität des Mediums, der Verdünnungslösung und der Filter vor der Verwendung prüfen, z. B. nach ISO 7704, ISO/TS 11133-1 oder ISO/TS 11133-2.

5.1.2 Sterilisation

Lösungen und Nährmedien in Behälter füllen, die für eine Sterilisation durch Autoklavieren geeignet sind. Für die meisten Zwecke reichen 15 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ aus. Andere Zeitspannen und Temperaturen können notwendig sein; Einzelheiten sind in den einzelnen Normen angegeben.

Alternativ dürfen Mikroorganismen aus thermolabilen Substanzen durch Filtration durch einen Filter, Porenweite $0,2\ \mu\text{m}$, entfernt werden, sofern der Filter vom Hersteller als für die Sterilisation tauglich eingestuft wird.

5.2 Verdünnungslösungen

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Lösungen werden häufig in der Wassermikrobiologie eingesetzt. Die Aufzählung ist nicht umfassend; andere Lösungen dürfen eingesetzt werden.

Nach der Herstellung die Lösungen in Flaschen abfüllen und sterilisieren, z. B. durch 15-minütiges Autoklavieren bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$. Alternativ kann die Lösung auch nach der Sterilisation aseptisch verteilt werden. Lagerung ist für bis zu sechs Monate bei Raumtemperatur oder in einem Kühlschrank bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ möglich. Lösungen mit verändertem Aussehen verwerfen.

5.2.1 Salzlösung

Zusammensetzung

Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Das Salz, wenn notwendig unter Erwärmen, in Wasser lösen. Den pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1\ \text{mol/l}$] oder Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1\ \text{mol/l}$] so einstellen, dass er nach der Sterilisation (siehe 5.1.2) $7,0 \pm 0,5$ bei 25°C beträgt.

5.2.2 Peptonlösung

Zusammensetzung

Casein (Pepton), enzymatisch verdaut	1,0 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Die Komponenten, wenn notwendig unter Erwärmen, in Wasser lösen. Den pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] oder Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] so einstellen, dass er nach der Sterilisation (siehe 5.1.2) $7,0 \pm 0,5$ bei 25°C beträgt.

5.2.3 Pepton-Salz-Lösung

Zusammensetzung

Casein (Pepton), enzymatisch verdaut	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Die Komponenten, wenn notwendig unter Erwärmen, in Wasser lösen. Den pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] oder Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] so einstellen, dass er nach der Sterilisation (siehe 5.1.2) $7,0 \pm 0,5$ bei 25°C beträgt.

5.2.4 Ringers Lösung, Viertel-Stärke

Zusammensetzung

Natriumchlorid (NaCl)	2,25 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,105 g
Calciumchlorid (wasserfrei) (CaCl_2)	0,12 g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Die Komponenten, wenn notwendig unter Erwärmen, in Wasser lösen. Den pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] oder Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] so einstellen, dass er nach der Sterilisation (siehe 5.1.2) $7,0 \pm 0,2$ bei 25°C beträgt.

5.2.5 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

a) Phosphat-Lösung

Zusammensetzung

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	34 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Kaliumdihydrogenphosphat in 500 ml Wasser lösen. Den pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] oder Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] auf $7,2 \pm 0,2$ einstellen. Danach mit Wasser auf 1 000 ml auffüllen. Zur Aufbewahrung die Lösung sterilisieren (siehe 5.1.2).

b) Magnesiumchlorid-Lösung

Zusammensetzung

Magnesiumchlorid (MgCl_2)	38 g
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Alternativ kann eine äquivalente Masse (99 g) Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) verwendet werden.

Herstellung

Magnesiumchlorid in Wasser lösen; zur Aufbewahrung die Lösung sterilisieren (siehe 5.1.2).

c) Phosphatgepufferte Salzlösung

Zusammensetzung

Phosphat-Lösung (a)	1,25 ml
Magnesiumchlorid-Lösung (b)	5,0 ml
Wasser (siehe 5.1.1)	1 000 ml

Herstellung

Phosphat-Lösung (a) und Magnesiumchlorid-Lösung (b) zum Wasser hinzufügen, geeignete Volumina abfüllen und sterilisieren (siehe 5.1.2). Der pH-Wert sollte $7,0 \pm 0,2$ bei 25°C betragen.

5.3 Kulturmedien

Sobald eine Flasche mit dehydriertem Medium (Chemikalie) geöffnet wird, mit dem Anbruchdatum versehen und mit einer maximalen Haltbarkeitsdauer kennzeichnen.

Im Allgemeinen können Nährmedien nach ihrer Sterilisation in Behältern einige Monate im Dunkeln bei Raumtemperatur verschlossen gelagert werden. Aseptisch abgefüllte Medien können bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ bis zu einem Monat oder länger, wenn dies der Erfahrung entspricht, gelagert werden. Vor dem Gebrauch das Medium auf Verunreinigung, starke Verdunstungsverluste oder andere Hinweise auf Verfall prüfen. Die meisten Reagenzien werden am besten bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Nährmedien, die als fertig gegossene Platten vom Hersteller geliefert werden, nach Herstellerangaben verwenden.

Nährmedium nach dem Autoklavieren auf 45°C bis 50°C abkühlen, wenn hitzelabile Bestandteile hinzugefügt werden müssen.

6 Sterilisation von Geräten und Glasbehältern

Geräte und Glasbehälter, die nicht steril beschafft werden, können nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert werden:

- a) in einem vorgeheizten Ofen bei $(170 \pm 10)^\circ\text{C}$, mindestens 1 h;
- b) in einem Autoklaven bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$, mindestens 15 min.

Werden Membranfilter nicht steril beschafft, diese vor der Verwendung nach den Angaben des Herstellers sterilisieren.

7 Probenvorbereitung

7.1 Probenahme

Proben nach ISO 19458 nehmen.

7.2 Herstellung einer Testprobe

Vor der Untersuchung einer Probe diese durch kräftiges Schütteln gründlich mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu erreichen, und anschließend abhängig von der Beschaffenheit des Wassers und der erwarteten mikrobiologischen Belastung eine geeignete Verdünnung herstellen.

Im Falle von Plattenzählungen dürfen dezimale Verdünnungsschritte verwendet werden. Für Membranfiltrationsverfahren (mit einer kleineren Oberfläche) werden kleinere Verdünnungsschritte empfohlen.

Für 10-fache Verdünnungen 90 ml oder 9 ml der Verdünnungslösung in sterile Flaschen oder Röhrchen abmessen. Alternativ darf in Schraubdeckelröhrchen abgefüllte, vorsterilisierte Verdünnungslösung verwendet werden. Einen oder mehrere 10-fache Verdünnungsschritte durch die Übertragung von einem Probenvolumen in neun Teile Verdünnungslösung herstellen. Die Lösung gründlich mischen (mithilfe einer sauberen Pipette oder mechanisch) und ein Volumenteil dieser Lösung zu weiteren neun Teilen der Verdünnungslösung geben. Diese Schritte so oft wie nötig wiederholen. Ausreichend große Volumina aller Verdünnungen für alle für die Probe geplanten Untersuchungen herstellen.

Für andere als 10-fache Verdünnungen die Volumina der Verdünnungslösung und die Volumina der Probe entsprechend anpassen. Verschiedene Ansätze können gewählt werden, z. B. 3- oder 4-fach-Verdünnungsreihen oder eine dezimale Verdünnungsreihe, von der sowohl 10-ml- als auch 30-ml-Volumina filtriert werden. Vierfache Verdünnungsreihen können, wie oben für 10-fache Verdünnungsreihen beschrieben, hergestellt werden, wobei in diesem Fall ein Volumen der Wasserprobe mit drei Volumina Verdünnungslösung gemischt wird.

Ist die erwartete Konzentration an Zielorganismen hoch, können 100-fache Verdünnungsschritte verwendet werden.

Für eine allgemeine Anleitung zur Herstellung von 10-fachen Verdünnungen siehe ISO 6887-1.

8 Zählung nach Beimpfen einer Teilprobe in (oder auf) festem Medium

8.1 Grundlagen

Ein Wasserprobenvolumen oder eine Verdünnung hiervon entweder direkt oder auf einer Membran konzentriert so auf der Oberfläche eines bestimmten festen Nährbodens oder in einem verflüssigten Nährmedium beimpfen, dass Mikroorganismen während der Inkubation auf oder in dem Nährmedium Kolonien bilden.

Aus praktischen Gründen jede Kolonie so werten, als sei sie aus einem einzelnen Mikroorganismus oder einer Ansammlung aus Mikroorganismen, die zum Zeitpunkt des Animpfens in der Probe vorhanden waren, hervorgegangen. Unter Berücksichtigung des eingesetzten Probenvolumens und der Anzahl der beobachteten Kolonien wird das Ergebnis als Koloniebildende Einheiten (KBE) oder Koloniebildende Partikel (KBP) in einem bestimmten Probenvolumen angegeben, z. B. 1 ml oder 100 ml.

8.2 Vorgehensweise

8.2.1 Allgemeines

Drei übliche Verfahren können für die Beimpfung von festen Nährmedien angewendet werden.

a) Plattengussverfahren

Die Untersuchungsprobe mit zuvor verflüssigtem und auf eine Temperatur nahe dem Verfestigungspunkt abgekühltem Nährmedium mischen und nach der Inkubation alle Kolonien zählen, die sich im Nährmedium oder auf dessen Oberfläche entwickelt haben.

b) Ausplattieren

Die Untersuchungsprobe über die trockene Oberfläche eines Agar-Nährmediums verteilen und nach der Inkubation alle Kolonien zählen, die sich auf der Oberfläche entwickelt haben.

c) Membranfiltration

Die Untersuchungsprobe über ein Membranfilter filtrieren, das die gesuchten Mikroorganismen zurückhält; das Filter anschließend auf die Oberfläche eines Agar-Nährmediums oder auf ein saugfähiges, mit Flüssigmedium befeuchtetes oder mit rehydriertem Medium imprägniertes Trägermaterial legen. Während der Inkubation bilden sich Kolonien auf der Membranoberfläche. Alternativ kann das Filter für bestimmte Mikroorganismen wie Anaerobier mit der Oberfläche nach unten in eine Petrischale gelegt und mit verflüssigtem Agarmedium überschichtet werden.

8.2.2 Auswahl des Verfahrens

Die Auswahl des Verfahrens hängt von mehreren Faktoren ab, wie den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Wassers sowie der Art der gesuchten Mikroorganismen (siehe Anhang A, A.3), ihrer wahrscheinlichen Konzentration, der effektiven Wiederfindung von gestressten oder (subletal) geschädigten Mikroorganismen und der gewünschten Präzision und Sensitivität. Hinweise zu den in den einzelnen Verfahren einsetzbaren Volumina siehe 8.2.3.1, 8.2.4.1 und 8.2.5.1; die Nachweisgrenzen werden in A.2 behandelt. Zur Genauigkeit der Verfahren siehe A.2. Die gesetzlichen Anforderungen können bei der Auswahl des Verfahrens ebenfalls eine Rolle spielen, indem z. B. eine bestimmte Präzision gefordert wird, oder der Nachweis von An- oder Abwesenheit eines Organismus in einem bestimmten Volumen ausreichend ist.

8.2.3 Plattengussverfahren

8.2.3.1 Untersuchungsprobe

Das Volumen der Untersuchungsprobe oder einer Probenverdünnung kann in Abhängigkeit von der Größe der Petrischale und dem eingesetzten Volumen an Nährmedium zwischen 0,1 ml und 5 ml liegen. Die Verdünnung sollte so gewählt werden, dass die erwartete Anzahl typischer Kolonien je Platte mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm zwischen 10 und 150 liegt. Die Gesamtanzahl der Kolonien auf der Platte (typisch und untypisch) sollte weniger als 300 betragen (siehe ISO 7218). Die Gesamtanzahl zählbarer Kolonien ist jedoch von der Größe der Kolonien abhängig und muss gegebenenfalls für große Kolonien reduziert werden.

8.2.3.2 Beimpfen

Das benötigte Medium in kochendem Wasser oder mithilfe eines anderen geeigneten Verfahrens (z. B. in einem Heißluftbrutschrank, einem Dampftopf oder einem Mikrowellengerät, wenn die Zeit/Temperatur-Kombination für die Medienpräparation validiert wurde) verflüssigen. Überhitzung vermeiden und das Medium, sobald es verflüssigt ist, entnehmen. Das verflüssigte Medium in einem Wasserbad bei $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ ausreichend lange abkühlen, so dass das Medium diese Temperatur erreicht. Vorzugsweise das Medium nicht länger als 4 h verflüssigt aufbewahren. Agar-Nährmedien nicht mehr als einmal verflüssigen.