

DIN EN ISO 8199



ICS 07.100.20

Ersatz für
DIN EN ISO 8199:2008-01

**Wasserbeschaffenheit –
Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische
Untersuchungen mittels Kulturverfahren (ISO 8199:2018);
Deutsche Fassung EN ISO 8199:2018**

Water quality –
General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
(ISO 8199:2018);
German version EN ISO 8199:2018

Qualité de l'eau –
Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de
culture (ISO 8199:2018);
Version allemande EN ISO 8199:2018

Gesamtumfang 75 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 8199:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

Bezeichnung des Verfahrens:

Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren (K 20):

Verfahren DIN EN ISO 8199 — K 20

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

ISO 3534-1	siehe	DIN ISO 3534-1
ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 6887-1	siehe	DIN EN ISO 6887-1
ISO 7218:2007	siehe	DIN EN ISO 7218:2014-09
ISO 7218:2007/Amd. 1:2013		
ISO 7899-1	siehe	DIN EN ISO 7899-1
ISO 9308-2	siehe	DIN EN ISO 9308-2
ISO 9308-3	siehe	DIN EN ISO 9308-3
ISO 11133:2014	siehe	DIN EN ISO 11133:2015-01
ISO 13843:2017	siehe	DIN EN ISO 13843:2018-03
ISO 16140 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 16140 (alle Teile)
ISO 17994	siehe	DIN EN ISO 17994
ISO 18593	siehe	DIN ISO 18593
ISO 19458	siehe	DIN EN ISO 19458
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025
ISO/TS 22117*	siehe	DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

* Zurückgezogen und ersetzt durch ISO 22117, *Microbiology of the food chain — Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison*, die als DIN EN ISO 22117, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Spezielle Anforderungen und Anleitungen an die Eignungsprüfung durch Ringversuche* übernommen wurde.

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 vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) — gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren (K 20).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

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, Auskunft.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 8199:2008-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Titel des Dokuments wurde geändert;
- b) das Dokument wurde fachlich vollständig überarbeitet, erweitert und an den aktuellen technischen Stand angepasst;
- c) das Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 8199: 2008-01

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Spezielle Anforderungen und Anleitungen an die Eignungsprüfung durch Ringversuche*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — 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 7218:2014-09, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007 + Amd 1:2013, korrigierte Fassung 2014-04-15); Deutsche Fassung EN ISO 7218:2007 + A1:2013*

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 9308-2, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien — Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl*

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 EN ISO 11133:2015-01, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01); Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014*

DIN EN ISO 13843:2018-03, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren (ISO 13843:2017); Deutsche Fassung EN ISO 13843:2017*

DIN EN ISO 16140 (Reihe), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 17994, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen für den Vergleich der relativen Wiederfindung von Mikroorganismen durch zwei quantitative Verfahren*

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

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

DIN ISO 3534-1, *Statistik — Begriffe und Formelzeichen — Teil 1: Wahrscheinlichkeit und allgemeine statistische Begriffe*

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 18593, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische
Untersuchungen mittels Kulturverfahren (ISO 8199:2018)

Water quality —
General requirements and guidance for microbiological
examinations by culture (ISO 8199:2018)

Qualité de l'eau —
Exigences et lignes directrices générales pour les
examens microbiologiques sur milieu de culture
(ISO 8199:2018)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. September 2018 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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	4
Vorwort	5
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundlage des Verfahrens	11
5 Allgemeine Anforderungen an die Messung	11
5.1 Einheitlichkeit von Temperaturen	11
5.2 Bebrütungszeiten	12
5.3 Volumina und Massen	12
6 Verdünnungslösungen und Nährmedien	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Qualitätsanforderungen an Bestandteile	12
6.3 Verdünnungslösungen	12
7 Sterilisation und Dekontamination	13
7.1 Sterilisation von Geräten und Glasgeräten	13
7.2 Sterilisation von Verbrauchsmaterialien	13
7.3 Dekontamination von Glasgeräten und Materialien nach der Verwendung	13
7.4 Abfallentsorgung	14
8 Proben und Probenhandhabung	14
8.1 Probenahme	14
8.2 Probenvorbereitung	14
8.2.1 Wässer und andere wässrige Matrices	14
8.2.2 Tupfer	15
9 Zählverfahren (quantitativ)	16
9.1 Zählung nach Beimpfen einer Teilprobe in (oder auf) festen Nährmedien	16
9.1.1 Allgemeines	16
9.1.2 Plattengussverfahren	16
9.1.3 Spatelverfahren	17
9.1.4 Membranfiltrationsverfahren	18
9.1.5 Bebrütung	20
9.1.6 Zählung und Bestätigung bei festen Nährmedien	21
9.1.7 Allgemeine Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse	22
9.1.8 Angabe der Ergebnisse	23
9.2 Zählung nach Beimpfen eines Flüssigmediums	35
9.2.1 Allgemeines	35
9.2.2 Durchführung	35
9.2.3 Wahl des Beimpfungssystems	36
9.2.4 Bebrütung	37
9.2.5 Auswertung der Ergebnisse	37
9.2.6 Unsicherheit der Testergebnisse	37
9.2.7 Bestimmung von MPN-Werten	37

10	Nachweisverfahren (qualitativ).....	42
10.1	Allgemeines	42
10.2	Durchführung	42
10.3	Unsicherheit der Ergebnisse	42
11	Leistungsmerkmale der Verfahren.....	42
12	Analytische Qualitätskontrolle	43
12.1	Allgemeines	43
12.2	Interne Qualitätskontrolle	44
12.2.1	Allgemeines	44
12.2.2	Verfahrenskontrolle.....	44
12.3	Externe Qualitätssicherung	45
	Anhang A (informativ) Kriterien für die Auswahl eines Verfahrens.....	46
	Anhang B (informativ) Konfidenzintervalle für Koloniezählverfahren und Wahl des Berechnungsverfahrens in Sonderfällen	51
	Anhang C (normativ) Zählung und Berechnungen bei zwei Platten je Verdünnung.....	56
	Anhang D (normativ) Zusammensetzung, Herstellung und Leistungsprüfung von Verdünnungslösungen.....	63
	Literaturhinweise.....	67

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 8199:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2019 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 ISO 8199:2007.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 8199:2018 wurde von CEN als EN ISO 8199:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe <http://www.iso.org/directives>).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147, *Water quality*, Unterkomitee SC 4 *Microbiological methods*, erarbeitet.

Durch diese dritte Ausgabe wird die zweite Ausgabe (ISO 8199:2005), die technisch überarbeitet wurde, ersetzt. Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- es wurden Abschnitte zu Begriffen, Nachweisverfahren (qualitativ), Leistungsmerkmalen und analytischer Qualitätskontrolle (AQC, en: analytical quality control) aufgenommen;
- Abschnitte, die sich auf die Herstellung und die Qualitätskontrolle von Nährmedien und Verdünnungslösungen beziehen, wurden überarbeitet und an ISO 11133 angepasst und als neuer Anhang D aufgenommen;
- der Unterabschnitt zur allgemeinen Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse von festen Nährmedien wurde aktualisiert, um den Änderungen in ISO 7218:2007/Amd 1:2013 [9] Rechnung zu tragen, auf der die relevanten Textpassagen der zweiten Ausgabe beruhen. Es wurden jedoch Abwandlungen vorgenommen, um die Techniken der Wassermikrobiologie (z. B. Membranfiltration) zu berücksichtigen und andere Verdünnungen als zehnfache Verdünnungen zuzulassen.
- Anhang B wurde im Zusammenhang mit der Aktualisierung des Unterabschnitts mit der allgemeinen Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse von festen Nährmedien aufgenommen, um Richtlinien für Konfidenzintervalle bei der Berechnung von Sonderfällen zu geben.

- Anhang C wurde im Zusammenhang mit der Aktualisierung des Unterabschnitts mit der allgemeinen Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse von festen Nährmedien aufgenommen, um die Berechnungen bei der Verwendung von zwei Platten je Verdünnung zu beschreiben.
- der Unterabschnitt zur Zählung beim Einsatz von Flüssigmedien wurde erweitert und enthält zusätzliche Hinweise zur Verwendung von Rechnern für die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN, en: most probable number). Der frühere Anhang B mit MPN-Tabellen wurde gestrichen.
- der Titel des Dokuments wurde geändert, um diese Änderungen widerzuspiegeln.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Techniken zum Nachweis und zur Zählung von Mikroorganismen, die auf deren Fähigkeit beruhen, auf oder in einem bestimmten Nährmedium zu wachsen, sind wichtige und weit verbreitete Verfahren zur Beurteilung der mikrobiologischen Wasserbeschaffenheit. Anliegen dieses Dokumentes ist es, Informationen, die für verschiedene Verfahren gleich sind, in einem einzigen Dokument zusammenzufassen, um eine Wiederholung technischer Details in Einzelnormen zu reduzieren und die Wahl des am besten geeigneten Verfahrens für eine bestimmte Fragestellung zu erleichtern. Weitere Anleitungen zu allgemeinen Themen, die für diese Techniken relevant sind, wurden aufgenommen, z. B. analytische Qualitätskontrolle, Leistungsmerkmale der Verfahren und Ergebnisunsicherheit.

WARNUNG — Anwender dieses Dokumentes sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, geeignete Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Anforderungen fest und gibt Anleitungen für die Durchführung von Arbeitsschritten, die allen Kulturtechniken zur mikrobiologischen Wasseruntersuchung gemeinsam sind, insbesondere die Vorbereitung von Proben, Nährmedien und den üblichen Geräten und Glasgeräten, sofern in den spezifischen Normen nicht anders gefordert. Dieses Dokument beschreibt auch die unterschiedlichen Kulturverfahren zum Nachweis und zur Zählung sowie die Auswahlkriterien für das am besten geeignete Verfahren.

Dieses Dokument ist hauptsächlich für Untersuchungen auf Bakterien, Hefen und Pilze bestimmt, einige Aspekte sind jedoch auch auf Bakteriophagen, Viren und Parasiten anwendbar. Ausgenommen sind Verfahren, die nicht auf der Kultivierung von Mikroorganismen beruhen, z. B. Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

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).

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

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

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

Genauigkeit

Grad der Übereinstimmung zwischen einem Testergebnis und einem akzeptierten Referenzwert

[QUELLE: ISO 6107-8:1993, 1, modifiziert — Anmerkung gestrichen]

3.2

systematische Abweichungskomponente

en: bias

Differenz zwischen dem Erwartungswert der Ermittlungsergebnisse und einem anerkannten Bezugswert

[QUELLE: ISO 5725-1:1994, 3.8, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff gestrichen]

3.3

bestätigte Zählung

Zählung (3.4), korrigiert um nicht bestätigte *Verdachtzählung* (3.9), nachdem verdächtige Objekte weiter geprüft wurden

3.4

Zählung

<Mikrobiologie> beobachtete Anzahl von Objekten wie Kolonien oder Zellen, die durch direktes Zählen oder das MPN-Verfahren ermittelt werden, basierend auf einer statistischen Berechnung unter Verwendung der positiven Einheiten oder verdächtigen positiven Einheiten in der Verdünnungsreihe einer *Untersuchungsprobe* (3.16)

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 22, modifiziert — „oder verdächtigen positive Einheiten“ wurde ergänzt]

3.5

Nachweisgrenze

Mindestkonzentration von Organismen, die ein Wachstum mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,95$ aufweisen, bei Beimpfung eines festgelegten Nährmediums und Bebrütung unter festgelegten Bedingungen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die theoretische Ebene, die diese Definition erfüllt, liegt im Durchschnitt von drei lebensfähigen Zellen in einem Inokulum-Volumen.

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.10]

3.6

laborinterne Vergleichpräzision

Präzision unter Zwischenbedingungen

Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen, die mit gleichem oder ähnlichem Probenmaterial mit demselben Verfahren im selben Laboratorium von verschiedenen Prüfern mit unterschiedlichen Geräten erhalten werden

3.7

Bestimmungsgrenze

niedrigste Partikelkonzentration je Untersuchungsvolumen, bei der die erwartete relative Standardunsicherheit einem festgelegten Wert entspricht

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.17]

3.8

Präzision

Ausmaß der gegenseitigen Annäherung zwischen unabhängigen Ermittlungsergebnissen, die unter festgelegten Bedingungen gewonnen sind

[QUELLE: ISO 5725-1:1994, 3.12, modifiziert — Anmerkung 1 bis Anmerkung 3 zum Begriff gestrichen]

3.9

Verdachtzählung

Koloniezählung (3.4) oder Abschätzung der wahrscheinlichsten Zahl (MPN), basierend auf der Anzahl von Kolonien oder von Reaktionsgefäßen, deren äußere Erscheinung als typisch für die Zielorganismen gewertet wird

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 62, modifiziert — „Gärröhrchen“ wurde durch „Reaktionsgefäßen“ ersetzt]

3.10

relative Standardabweichung

u_{rel}

Schätzung der Standardabweichung einer Population aus einer Stichprobe von n Ergebnissen dividiert durch das arithmetische Mittel dieser Probe

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.30]

3.11

Wiederholpräzision

Wiederholpräzision der Messung

Präzision (3.8) der Messung bei einer Reihe von *Wiederholbedingungen* (3.12) von Messungen

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.32]

3.12

Wiederholbedingungen

Messbedingungen als Teile von Bedingungen, die dasselbe Messverfahren, denselben Untersuchungsdurchführenden, dasselbe Messsystem, dieselben Betriebsbedingungen und denselben Untersuchungsort, sowie Wiederholungsmessungen desselben oder ähnlicher Objekte innerhalb einer kurzen Zeitdauer, umfassen

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.33]

3.13

Vergleichpräzision

Vergleichpräzision der Messung

Präzision (3.8) der Messung bei den *Vergleichbarkeitsbedingungen* (3.14) von Messungen

Anmerkung 1 zum Begriff: Relevante statistische Begriffe sind in ISO 5725-1 und ISO 5725-2 enthalten.

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.34]

3.14

Vergleichpräzisionsbedingungen

Messbedingungen als Teile von Bedingungen, die verschiedene Orte, Untersuchungsdurchführende, Messsysteme sowie Wiederholungsmessungen desselben oder ähnlicher Objekte umfassen

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.35]

3.15

Teilprobe

festgelegte Menge der Probe, die zur Analyse genommen wird

BEISPIEL 0,1 ml, 1 ml, 100 ml der Probe.

3.16

Testgut

Untersuchungsprobe

unverdünnte, verdünnte oder anderweitig vorbereitete *Teilprobe* (3.15) des Testansatzes, nach Abschluss aller Vorbereitungsschritte wie Zentrifugation, Filtration, Homogenisierung, pH-Anpassung und Bestimmung der Ionenstärke

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 92, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff gestrichen]

3.17

Richtigkeit

Grad der Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert aus einer großen Serie von Testergebnissen und einem akzeptierten Referenzwert

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Maß für die Richtigkeit ist normalerweise der *Bias* (3.2)

[QUELLE: ISO 6107-8:1993, 63]

3.18

Unsicherheit der Zählung

relative Standardabweichung (3.10) der Ergebnisse wiederholten Zählens der Kolonien oder Partikel derselben Platte(n) oder desselben Feldes (derselben Felder) unter festgelegten Bedingungen (dieselbe Person, verschiedene Personen in einem Laboratorium, oder in verschiedenen Laboratorien)

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 103, modifiziert — Bedeutungskontext wurde entfernt]

4 Grundlage des Verfahrens

Das Grundprinzip der hier beschriebenen Verfahren beruht auf der Beimpfung eines Nährmediums (fest oder flüssig) mit einer bekannten Teilprobe der Wasserprobe oder mit einem nach Membranfiltration oder Zentrifugieren erhaltenen Testgut. Es wird angenommen, dass sich während der Bebrütung jeder vorhandene Zielorganismus vermehrt, so dass entweder eine Kolonie auf oder in dem festen Nährboden zu sehen ist oder sichtbare Veränderungen des Flüssigmediums zu beobachten sind. Die Auswahl eines bestimmten Kulturverfahrens hängt nicht nur von der Art und Anzahl der gesuchten Mikroorganismen, sondern auch von der Beschaffenheit des untersuchten Wassers und der Fragestellung ab.

5 Allgemeine Anforderungen an die Messung

5.1 Einheitlichkeit von Temperaturen

Die folgenden anerkannten Temperaturbereiche für die Bebrütung und Lagerung werden angewendet, sofern für den vorgesehenen Zielorganismus geeignet und in der spezifischen Norm nicht anderweitig gefordert.

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

Bebrütungstemperaturen: $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$; $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$; $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$

Temperatur zum Temperieren von Medien: $44 ^\circ\text{C}$ bis $47 ^\circ\text{C}$

Die oberen Temperaturgrenzen müssen genau eingehalten werden, um das bestmögliche Wachstum sicherzustellen. Die unteren Temperaturgrenzen dürfen für kurze Zeitintervalle unterschritten werden, z. B. durch das Öffnen der Tür eines Brutschrankes, die Betriebstemperatur sollte jedoch schnell wieder erreicht werden.

5.2 Bebrütungszeiten

Die folgenden anerkannten Bereiche von Bebrütungszeiten werden angewendet, sofern für den vorgesehenen Zielorganismus geeignet und in der spezifischen Norm nicht anderweitig gefordert.

Bebrütungszeitspannen: (21 ± 3) h; (44 ± 4) h; (68 ± 4) h

5.3 Volumina und Massen

Die Messgeräte müssen für die geforderte Genauigkeit und Präzision geeignet sein. Der akzeptierte Toleranzbereich für einen Messwert ist ± 2 %, wenn der genannte Wert für die Leistung des Verfahrens und die Prüfergebnisse kritisch ist, und ± 5 %, wenn sich der angegebene Wert als nicht kritisch erwiesen hat. Beispiele für kritische Werte, die eine direkte Auswirkung auf die Prüfergebnisse haben, sind Inokulum- und Verdünnungsvolumina. Hinsichtlich der Toleranzwerte bei der Einwaage der Bestandteile zur Herstellung von Nährmedien wird auf ISO 11133 verwiesen.

ANMERKUNG Kritische Toleranzen wurden auf 2 % festgelegt, um die Unsicherheit der Ergebnisse zu minimieren.

6 Verdünnungslösungen und Nährmedien

6.1 Allgemeines

Die allgemeinen Anforderungen an die Vorbereitung, Herstellung, Sterilisation, Lagerung und Leistung von Nährmedien sind in ISO 11133 angegeben.

Beim Ansetzen mikrobiologischer Nährmedien, sofern nicht anders angegeben, die Bestandteile zum Volumen des Wassers zugeben, anstatt sie vorzulegen und auf ein bestimmtes Volumen aufzufüllen.

Vor der Verwendung die Qualität der Nährmedien, Verdünnungslösungen, Membranfilter und Reagenzien mit den in ISO 11133 und ISO 7704 beschriebenen Verfahren oder wie in der jeweiligen spezifischen Norm beschrieben prüfen.

Zur Lagerung von Nährmedien siehe ISO 11133.

6.2 Qualitätsanforderungen an Bestandteile

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

Bezüglich weiterer Informationen zur Qualität von Bestandteilen und zur Beschaffenheit des Wassers, das zur Herstellung von Nährmedien verwendet werden soll, siehe ISO 11133 und ISO 3696 [2].

6.3 Verdünnungslösungen

Die folgenden Verdünnungslösungen werden häufig in der Wassermikrobiologie eingesetzt. Die Aufzählung ist jedoch nicht umfassend; andere geeignete Lösungen dürfen eingesetzt werden:

- Salzlösung;
- Peptonlösung;
- Pepton-Salz-Lösung [maximale Wiederbelebungslösung (MRD, en: maximum recovery diluent)];

- Ringer-Lösung, viertelstark;
- Phosphatpuffer-Lösung.

Bezüglich der Zusammensetzung, Herstellung, Aufbewahrung und Leistungsprüfung dieser Verdünnungslösungen ist Anhang D zu beachten.

7 Sterilisation und Dekontamination

7.1 Sterilisation von Geräten und Glasgeräten

Nicht steril bereitgestellte Geräte und Glasbehälter werden nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert:

- a) mindestens 1 h (ohne Vorheizzeit) in einem Ofen bei einer Betriebstemperatur von $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$;
- b) mindestens 15 min in einem Autoklav bei einer Betriebstemperatur von $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Einige hitzelabile Teile können andere Sterilisationsverfahren erfordern (z. B. mit UV-Licht oder Bestrahlung), die aber in Routinelaboratorien nicht durchgeführt werden.

7.2 Sterilisation von Verbrauchsmaterialien

Anstelle von wiederverwendbaren Artikeln (Glasgeräte, Petrischalen, Pipetten, Flaschen, Röhrchen, Ösen, Spatel usw.) dürfen sterile Geräte und Materialien für den Einmalgebrauch verwendet werden, wenn ihre Spezifikationen ähnlich sind.

Werden Membranfilter nicht schon steril beschafft, werden sie üblicherweise durch feuchte Hitze nach 7.1, Prozess b), oder entsprechend den Angaben der Hersteller sterilisiert.

7.3 Dekontamination von Glasgeräten und Materialien nach der Verwendung

Materialien zur Dekontamination und Entsorgung sollten in geeigneten Behältern untergebracht werden, z. B. in autoklavierbaren Kunststoffbeuteln. Das Autoklavieren ist das Verfahren der Wahl für alle Dekontaminationsprozesse (mindestens 30 min bei $121 ^\circ\text{C}$). Der Autoklav sollte so beschickt werden, dass das Eindringen der Wärme in das zu sterilisierende Gut begünstigt wird (z. B. keine Überladung). Es ist darauf zu achten, dass Kappen/Deckel lose und Beutel geöffnet sind, um einen gefährlichen Druckaufbau zu verhindern, der zu einem möglichen Bruch führen kann, z. B. Explosion von Glasflaschen.

Moderne Autoklaven erfordern möglicherweise kein Lösen der Kappen, die Herstelleranweisungen sind jedoch genau einzuhalten, um einen gefährlichen Druckaufbau in den Behältern zu vermeiden.

Alternative Verfahren zum Autoklavieren dürfen angewendet werden.

Alle Geräte einschließlich wiederverwendbarer Behälter, die mit mikrobiologischen Kulturen (festen oder flüssigen Nährmedien) in Berührung gekommen sind, werden vor der Reinigung autoklaviert.

Während der Untersuchung dürfen kleine und korrosionsbeständige Geräte (z. B. Pipetten) durch Eintauchen in frisch hergestellte und ordnungsgemäß verdünnte Desinfektionsmittellösung dekontaminiert werden.

Pasteur-Pipetten sind möglicherweise schwer zu reinigen und werden üblicherweise nach einmaligem Gebrauch verworfen.

Die meisten Desinfektionsmittel haben einige toxische Wirkungen. Beim Umgang mit Desinfektionsmitteln Handschuhe und Augenschutz tragen und die Angaben der Hersteller befolgen.

7.4 Abfallentsorgung

Die ordnungsgemäße Entsorgung wirkt sich nicht direkt auf die Qualität der Untersuchung von Proben aus, ist aber ein Bestandteil guten Labormanagements. Ein System zur Kennzeichnung und Trennung von Abfallmaterialien und ihren Behältern sollte eingerichtet werden für:

- nicht kontaminierte Abfälle (z. B. nicht kultivierte Wasserproben), die auf Entsorgungswegen für allgemeinen Abfall entsorgt werden können;
- Skalpelle, Nadeln/Kanülen, Messer, Glasbruch;
- kontaminierte Materialien zum Autoklavieren und Wiederverwenden;
- kontaminierte Materialien zum Autoklavieren und Entsorgen oder nur zur Entsorgung, wenn das Material verbrannt werden soll.

Materialien, die mit Mikroorganismen der Risikogruppe 3 kontaminiert sind, und ihre Behälter müssen vor dem Verbrennen autoklaviert werden.

8 Proben und Probenhandhabung

8.1 Probenahme

Proben nach ISO 19458 nehmen. Wasserproben, die Desinfektionsmittel enthalten, sind in Probenflaschen zu füllen, die geeignete Neutralisationsmittel in ausreichender Menge enthalten.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 Wasser und andere wässrige Matrices

Saubere und schmutzige Wasser sollten möglichst getrennt und mit gesonderten Geräten in getrennten Bereichen bearbeitet werden, um das Risiko einer Kreuzkontamination zu verringern. Alternativ werden die sauberen Wasserproben vor den Schmutzwasserproben bearbeitet.

Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen und anderer Partikel zu erreichen, wird die Probe vor der Untersuchung durch Schütteln gründlich gemischt. Dies kann durch Invertieren oder Hin- und Her-Schütteln des Probenbehälters erreicht werden. Abhängig von der Beschaffenheit des Wassers und der erwarteten mikrobiologischen Belastung die geeignete(n) Verdünnung(en) herstellen.

Bei Plattenzählverfahren werden üblicherweise dezimale Verdünnungsschritte angewandt. Für Membranfiltrationsverfahren (mit einer kleineren Oberfläche) werden kleinere Verdünnungsschritte empfohlen. Für viele MPN-Verfahren sind Verdünnungsreihen ein wesentlicher Bestandteil der Methode. Unter 9.2.3 ist die Herstellung von Verdünnungen bei der Anwendung von MPN-Verfahren zu finden. Eine allgemeine Anleitung zur Herstellung von Verdünnungsreihen ist in ISO 6887-1 [7] beschrieben.

Für zehnfache Verdünnungen neun Volumenteile der Verdünnungslösung und einen Volumenteil der Wasserprobe aseptisch in sterile Verdünnungsflaschen oder -röhrchen abmessen. Alternativ in Schraubdeckelröhrchen abgefüllte, vorsterilisierte Verdünnungslösungen verwenden, deren Volumen nach dem Autoklavieren geprüft wurde. Eine oder mehrere zehnfache Verdünnungen durch die Übertragung von einem Probenvolumen in neun Teile Verdünnungslösung herstellen. Die Lösung mithilfe einer sauberen Pipette oder mechanisch gründlich mischen und einen Volumenteil dieser Lösung zu weiteren neun Teilen der Verdünnungslösung geben. Diese Schritte so oft wie nötig wiederholen. Ausreichend große Volumina der Verdünnungen für alle geplanten Untersuchungen an der Wasserprobe herstellen.

Für andere als zehnfache Verdünnungen die Volumina der Verdünnungslösung und die Volumina der Probe entsprechend anpassen. Zum Beispiel können vierfache Verdünnungen wie vorstehend für die zehnfachen Verdünnungen beschrieben hergestellt werden, nur das in diesem Fall ein Volumenteil der Wasserprobe mit drei Volumenteilen der Verdünnungslösung gemischt wird. Ein anderer Ansatz ist eine dezimale Verdünnungsreihe, bei der aber sowohl 10-ml- als auch 30-ml-Volumina filtriert werden.

Ist die erwartete Konzentration an Zielorganismen hoch, dürfen 100-Fache Verdünnungsschritte angewandt werden, indem ein Volumenteil Wasserprobe mit 99 Volumenteilen Verdünnungslösung gemischt wird, jedoch können derartig große Intervalle zwischen den Messungen die Zuverlässigkeit der Prüfergebnisse nachteilig beeinflussen.

8.2.2 Tupfer

8.2.2.1 Allgemeines

Zur Beurteilung der Wasserbeschaffenheit, z. B. zur Untersuchung von Biofilmen, werden manchmal Tupfer verwendet. Diese dürfen sowohl in quantitativen als auch in qualitativen Verfahren eingesetzt werden.

Es gibt verschiedene für spezielle Zwecke vorgesehene Arten von Tupfern, dazu gehören Stieltupfer und Schwammtupfer, mit oder ohne Neutralisationsmittel für etwaige vorhandene Desinfektionsmittel. Wenn mit längeren Transportzeiten vor der Untersuchung zu rechnen ist, werden spezielle Transporttupfer empfohlen, die einen gewissen Schutz für die vorhandenen Organismen bieten. Alle Arten von Tupfern sollten vor der Verwendung geprüft werden, da einige auf bestimmte Mikroorganismen erwiesenermaßen hemmend wirken. Eine weiterführende Anleitung zur Verwendung von Tupfern kann ISO 18593 [18] entnommen werden.

ANMERKUNG Trockene Stieltupfer sind für mikrobiologische Untersuchungen ungeeignet, da sie während Transport und Lagerung keinen Schutz gegen Austrocknung oder Desinfektionsmittelrückstände für die vorhandenen Mikroorganismen bieten.

8.2.2.2 Stieltupfer-Aufarbeitung

Stieltupfer in Neutralisationslösung werden entweder manuell oder im Vortexmischer gründlich in der Lösung gemischt.

Transporttupfer in Agar werden vorsichtig aus der Verpackung genommen und in ein Volumen (gewöhnlich 10 ml) Verdünnungslösung getaucht. Der Stiel wird anschließend abgebrochen oder abgeschnitten, um das gründliche Mischen in der verschlossenen Flasche oder im verschlossenen Röhrchen zu ermöglichen. Zur Optimierung der Wiederfindung der vorhandenen Organismen wird entweder manuell oder auf andere Weise, z. B. mittels Vortexmischer, Schüttelmaschine oder Ultraschallbad, gemischt.

In beiden Fällen werden die erhaltenen Suspensionen als Ausgangsverdünnung verwendet und die Ergebnisse entsprechend angegeben.

8.2.2.3 Schwammtupfer-Aufarbeitung

Schwammtupfer werden für qualitative Untersuchungen empfohlen, um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probe entnommen wird und durch ein größeres Probenvolumen eine höhere Zuverlässigkeit eines Ergebnisses „nicht nachweisbar“ erreicht wird. Sie enthalten ein gewisses Volumen an Neutralisationsmittel, das ausreicht, vorhandene Organismen während des Transports zu schützen. Dies macht ihren Gebrauch für quantitative Untersuchungen problematisch, es sei denn, das Volumen ist bekannt und kann in nachfolgende Berechnungen mit einbezogen werden.

Bei Annahme im Labor wird ein größeres Volumen (gewöhnlich 100 ml) (Vor-)Anreicherungsmedium zum Schwammtupfer in der Originalverpackung gegeben und die Untersuchung nach dem jeweiligen spezifischen Verfahren fortgesetzt.

9 Zählverfahren (quantitativ)

9.1 Zählung nach Beimpfen einer Teilprobe in (oder auf) festen Nährmedien

9.1.1 Allgemeines

Eine Teilprobe der Wasserprobe oder die daraus hergestellte Verdünnung wird, entweder direkt oder auf einem Membranfilter konzentriert, auf der Oberfläche eines spezifischen festen Nährmediums beimpft oder in ein verflüssigtes Nährmedium eingeimpft, so dass die Mikroorganismen bei Bebrütung auf oder in dem Nährmedium Kolonien bilden.

Aus praktischen Gründen wird jede Kolonie so gewertet, als sei sie aus einem einzelnen Mikroorganismus oder einer Ansammlung aus Mikroorganismen hervorgegangen, die zum Zeitpunkt des Beimpfens in der Teilprobe vorhanden waren. Unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens der Teilprobe und der Anzahl der gebildeten Kolonien kann das Ergebnis daher als koloniebildende Einheiten (KBE) oder koloniebildende Partikel (KBP) in einem bestimmten Probenvolumen, z. B. 1 ml oder 100 ml, angegeben werden.

Für die Beimpfung von festen Nährmedien werden vorwiegend drei Verfahren angewendet, wobei die Wahl des Verfahrens von mehreren Faktoren abhängt. Dazu gehören physikalische und chemische Eigenschaften des Wassers, die Art der gesuchten Mikroorganismen, ihre wahrscheinliche Konzentration, die effektive Wiederfindung gestresster oder (subletal) geschädigter Mikroorganismen und die erforderliche Präzision und Sensitivität. Hinweise zu zulässigen Volumina von Wasserproben zum Einsatz in den einzelnen Verfahren sind in 9.1.2.2, 9.1.3.2 und 9.1.4.2 enthalten.

ANMERKUNG 1 Die Bestimmungsgrenzen und die Genauigkeit der verschiedenen Verfahren werden in Abschnitt A.2 behandelt.

ANMERKUNG 2 Die Beschaffenheit der Probe und der gesuchten Organismen wird in Abschnitt A.3 behandelt.

9.1.2 Plattengussverfahren

9.1.2.1 Allgemeines

Die Teilprobe wird mit Nährmedium gemischt, das zuvor verflüssigt und auf eine Temperatur nahe dem Verfestigungspunkt, d. h. 44 °C bis 47 °C, abgekühlt (temperiert) worden ist, um so die thermische Schädigung der Organismen zu minimieren. Nach der Bebrütung werden alle Kolonien gezählt, die sich im Nährmedium oder auf dessen Oberfläche entwickelt haben.

9.1.2.2 Teilprobe

Das Volumen der Teilprobe 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 Gesamtanzahl der Kolonien bei einer Platte mit 90 mm Durchmesser kleiner als 300 und die Anzahl der Zielkolonien größer als 10 ist.

Die vertretbare Höchstzahl an Zielkolonien auf einer Platte hängt von dem spezifischen Verfahren, der Koloniegroße, der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) und dem Vorhandensein von Nicht-Zielkolonien ab und kann auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Richtwert für die Kolonie-Höchstzahl auf einer 90-mm-Platte (Zielkolonien und Nicht-Zielkolonien) wird üblicherweise 300 erachtet (siehe ISO 7218 [8]). Größere Platten (z. B. 140 mm) erfordern eine separate Betrachtung (siehe 9.1.7.2).

9.1.2.3 Beimpfen

Das benötigte Medium in kochendem Wasser oder mithilfe eines anderen Verfahrens verflüssigen (z. B. in einem Dampftopf oder Mikrowellengerät, sofern die Zeit-Temperatur-Kombination für die Medienzubereitung verifiziert wurde). Kappen vor dem Erwärmen lösen, Überhitzung vermeiden und das Medium entnehmen, sobald es verflüssigt ist. Das verflüssigte Medium in einem Wasserbad oder Brutschrank bei 44 °C bis 47 °C abhängig von Anzahl und Volumina der Behälter ausreichend lange abkühlen, so dass das Medium diese Temperatur durchgängig annimmt. Die erforderliche Zeit zum Temperieren des Agars für alle routinemäßig verwendeten Mengen und Volumina verifizieren. Wärmeempfindliche verflüssigte Medien nicht länger als 4 h (oder die in der spezifischen Norm angegebene Höchstdauer) aufbewahren, da die Qualität nach dieser Zeit abnehmen kann. Agar enthaltende Nährmedien nicht mehr als einmal verflüssigen.

Wasserbäder enthalten möglicherweise Mikroorganismen, die eine Kontaminationsquelle für verflüssigte Medien darstellen können. Um dieses Risiko zu minimieren, wird empfohlen, das Wasser regelmäßig zu wechseln und das Wasserbad zu reinigen.

Die erforderlichen Petrischalen vorbereiten und mit Angaben zu den Proben beschriften. Alle notwendigen Verdünnungen nach 8.2.1 herstellen. Die Teilproben gründlich mischen und auf die Petrischalen verteilen.

Jedes Röhrchen oder jeden Kolben mit dem temperierten Medium nacheinander aus dem Wasserbad nehmen, die Röhrchen- oder Kolben-Außenseite vollständig abtrocknen und den Hals des Gefäßes abflammen. Das Medium ohne Verzögerung in jede Petrischale geben, dabei den sofortigen direkten Kontakt mit der Teilprobe vermeiden, um einen Hitzeschock bei der Teilprobe zu minimieren. Sorgfältig mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu erreichen. Üblicherweise werden (18 ± 2) ml Nährmedium für eine Teilprobe von bis zu 1 ml in 90-mm-Petrischalen verwendet. Sofern die Eignung durch das Labor gezeigt wurde, darf alternativ eine Mindestmenge von 10 ml Nährmedium verwendet werden, wenn die Proben zur Bebrütung in Beutel verpackt werden. Die Platten auf einer waagerechten Oberfläche abkühlen lassen, bis sich der Agar verfestigt hat. Sobald der Agar verfestigt ist, die Platten nach 9.1.5 inkubieren.

Medienpräparatoren, Gieß- und Schüttelsysteme können für Laboratorien mit großer Probenanzahl nützlich sein (siehe ISO 7218 [8]).

9.1.3 Spatelverfahren

9.1.3.1 Allgemeines

Die Teilprobe wird mit einem sterilen Arbeitsgerät über die trockene Oberfläche eines festen Nährmediums verteilt. Nach der Bebrütung werden alle Kolonien gezählt, die sich auf der Oberfläche entwickelt haben.

9.1.3.2 Teilprobe

Das Volumen der Teilprobe oder einer Probenverdünnung sollte für eine Platte mit 90 mm Durchmesser 0,1 ml bis höchstens 0,5 ml betragen. Für eine bestmögliche Präzision sollte die Verdünnung so gewählt werden, dass die erwartete Gesamtanzahl der Kolonien kleiner als 300 und die Anzahl der Zielkolonien größer als 10 ist.

Die vertretbare Höchstzahl an Zielkolonien auf einer Platte hängt von dem spezifischen Verfahren, der Koloniegröße, der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) und dem Vorhandensein von Nicht-Zielkolonien ab und kann auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Richtwert für die Kolonie-Höchstzahl auf einer 90-mm-Platte (Zielkolonien und Nicht-Zielkolonien) wird üblicherweise 300 erachtet (siehe ISO 7218 [8]). Größere Platten (z. B. 140 mm) erfordern eine separate Betrachtung (siehe 9.1.7.2).