

DIN EN ISO 9308-2



ICS 07.100.20

Teilweiser Ersatz für
DIN 38411-6:1991-06

**Wasserbeschaffenheit –
Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien –
Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl
(ISO 9308-2:2012);
Deutsche Fassung EN ISO 9308-2:2014**

Water quality –
Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria –
Part 2: Most probable number method (ISO 9308-2:2012);
German version EN ISO 9308-2:2014

Qualité de l'eau –
Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes –
Partie 2: Méthode du nombre le plus probable (ISO 9308-2:2012);
Version allemande EN ISO 9308-2:2014

Gesamtumfang 55 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 9308-2:2012 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 9308-2:2014 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom 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 Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN.

In der Reihe ISO 9308 existieren folgende Teile, unter dem Haupttitel *Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*:

- *Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*
- *Part 2: Most probable number method*
- *Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of E. coli in surface and waste water*

Bezeichnung des Verfahrens:

Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (K 6) — Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der Anzahl mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (1):

Verfahren DIN EN ISO 9308-2 — K 6 — 1

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 8199	siehe DIN EN ISO 8199
ISO 19458	siehe DIN EN ISO 19458
ISO/IEC Guide 2	siehe DIN EN 45020
ISO/TR 13843	siehe DIN V ENV ISO 13843

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 Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Verfahren zur Bestimmung der Anzahl mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (K 6 — 1).

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 (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Änderungen

Gegenüber DIN 38411-6:1991-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) das Verfahren DIN 38411 – K 6 – 1 zum Nachweis von *E.coli* und coliformen Keimen durch Flüssigkeitsanreicherung wird durch das validierte Verfahren, welches auf der Vermehrung von Zielorganismen in einem flüssigen Medium und der Berechnung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (en: Most Probable Number, *MPN*) von Organismen unter Bezugnahme auf *MPN*-Tabellen ersetzt.

Frühere Ausgaben

DIN 38411-6: 1991-06

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 8199, *Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren*

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

DIN EN 45020, *Normung und damit zusammenhängende Tätigkeiten — Allgemeine Begriffe*

DIN V ENV ISO 13843, *Wasserbeschaffenheit — Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und
coliformen Bakterien - Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der
wahrscheinlichsten Keimzahl (ISO 9308-2:2012)

Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform
bacteria - Part 2: Most probable number method
(ISO 9308-2:2012)

Qualité de l'eau - Dénombrement des *Escherichia coli* et
des bactéries coliformes - Partie 2: Méthode du nombre le
plus probable (ISO 9308-2:2012)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 11. April 2014 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-CENELEC 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, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Grundlage des Verfahrens	6
5 Geräte und Glasgeräte	6
6 Kulturmedien und Reagenzien	7
7 Probenahme	7
8 Durchführung	7
8.1 Probenvorbereitung.....	7
8.2 Beimpfen der Medien	7
8.3 Bebrütung und Differenzierung.....	8
8.4 Untersuchung der Ergebnisse	8
9 Auswertung	8
10 Analysenbericht	8
11 Qualitätssicherung	8
Anhang A (informativ) Weitere mikrobiologische Informationen über coliforme Bakterien.....	9
Anhang B (normativ) Das Quanti-Tray -Versiegelungsgerät und Berechnung der Ergebnisse	10
B.1 Allgemeines	10
B.2 Berechnung der wahrscheinlichsten Keimzahl	10
B.2.1 Berechnung der MPN für IDEXX Quanti-Tray ⁵ und Quanti-Tray/2000	10
Anhang C (informativ) Zusammensetzung des Colilert -18-Mediums	48
Anhang D (informativ) Validierung von Colilert -18/Quanti-Tray⁸ für die Zählung von in Wasser vorkommenden <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien.....	50
Literaturhinweise	51

Vorwort

Der Text von ISO 9308-2:2012 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 9308-2:2014 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 Oktober 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2014 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente 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, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 9308-2:2012 wurde vom CEN als EN ISO 9308-2:2014 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Vorkommen und Ausmaß fäkaler Verunreinigungen sind wichtige Faktoren bei der Einschätzung der Wasserqualität und des Gesundheitsrisikos für den Menschen bedingt durch eine Infektion. Eine Untersuchung von Wasserproben auf *Escherichia coli* (*E. coli*), die üblicherweise im Darm von Menschen und anderen Warmblütern vorkommen, gibt einen Hinweis auf solch eine Verschmutzung. Eine Untersuchung auf coliforme Bakterien kann schwieriger zu interpretieren sein, da einige coliforme Bakterien im Boden und im Oberflächensüßwasser leben und nicht ausschließlich im Darm. Daher kann das Vorkommen von coliformen Bakterien, auch wenn es kein Beweis einer fäkalen Verunreinigung ist, ein Hinweis auf Fehler in der Wasseraufbereitung oder auf das Eindringen von Wasser in das Verteilungssystem sein.

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) weist darauf hin, dass die Übereinstimmung mit diesem Dokument die Verwendung von Patenten, die in diesem Dokument angeführten Colilert-18 sowie Quanti-Tray und Quanti-Tray 2000 betreffen, bedeuten kann.

ISO nimmt keine Stellung zur Rechtmäßigkeit, zur Gültigkeit und zum Anwendungsbereich dieser Patentrechte.

Der Halter dieses Patentrechts hat ISO zugesichert, dass er bereit ist, entweder kostenfrei oder über Lizenzen zu vernünftigen und nicht diskriminierenden Geschäftsbedingungen mit Antragstellern in der ganzen Welt zu verhandeln. In diesem Zusammenhang ist die Erklärung des Halters dieses Patentrechts bei ISO registriert. Informationen sind erhältlich bei:

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092 USA

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

ISO (<http://www.iso.org/patents>) und IEC (<http://patents.iec.ch>) stellen online eine aktuelle Datenbank mit den für ihre Normen relevanten Patenten bereit. Die Anwender werden ermutigt, sich diese Datenbanken anzusehen, um die aktuellsten Informationen hinsichtlich Patenten zu erhalten.

WARNUNG — Anwender dieses Teils von ISO 9308 sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Internationale Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitsgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach diesem Teil von ISO 9308 Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 9308 legt ein Verfahren für die Zählung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Wasser fest. Das Verfahren beruht auf der Vermehrung von Zielorganismen in einem flüssigen Medium und der Berechnung der „wahrscheinlichsten Keimzahl“ (en: Most Probable Number, MPN) von Organismen unter Bezugnahme auf MPN-Tabellen. Dieses Verfahren kann auf alle Arten von Wasser angewendet werden, einschließlich derer, die eine beträchtliche Menge an Schwebstoffen und eine hohe Keimzahl heterotropher Begleitbakterien enthalten. Es darf jedoch nicht zur Zählung coliformer Bakterien in Meerwasser angewendet werden. Wird das Verfahren zur Zählung von *E. coli* in Meerwasser eingesetzt, ist üblicherweise eine Verdünnung in sterilem Wasser von 1:10 erforderlich, obgleich das Verfahren nachweislich mit einigen Meerwässern gut funktioniert, die eine niedrigere als die übliche Salzkonzentration aufweisen. Wenn keine Daten zur Unterstützung der Anwendung des Verfahrens ohne Verdünnung vorliegen, wird eine 1:10-Verdünnung verwendet.

Dieses Verfahren stützt sich auf den Nachweis von *E. coli* auf der Grundlage der Expression des Enzyms β -D-Glucuronidase und folglich werden viele der enterohämorrhagischen Stämme von *E. coli* nicht nachgewiesen, die dieses Enzym üblicherweise nicht exprimieren. Außerdem gibt es eine geringe Anzahl anderer *E. coli*-Stämme, die β -D-Glucuronidase nicht exprimieren.

Die Auswahl der zum Nachweis und zur Bestätigung der coliformen Gruppe von Bakterien, einschließlich *E. coli*, angewendeten Untersuchungen kann als Teil einer kontinuierlichen Abfolge angesehen werden. Der Umfang der Bestätigung hängt bei einer bestimmten Probe teils von der Beschaffenheit des Wassers und teils von den Gründen für die Untersuchung ab. Die in diesem Teil von ISO 9308 beschriebene Untersuchung liefert ein bestätigtes Ergebnis ohne dass eine weitere Bestätigung positiver Vertiefungen erforderlich ist.

ANMERKUNG Während in dem Verfahren die Anwendung einer handelsüblichen Zählvorrichtung beschrieben wird, kann das hier beschriebene Medium in einem Standard-MPN-Verfahren verwendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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 8199, *Water quality — General guide to the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO/IEC Guide 2:2004, *Standardization and related activities — General vocabulary*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO/IEC Guide 2 und die folgenden Begriffe.

3.1

coliformes Bakterium

Mitglied der Familie der *Enterobacteriaceae*, das das Enzym β -D-Galactosidase exprimiert

3.2

Escherichia coli

Mitglied der Familie der *Enterobacteriaceae*, das die beiden Enzyme β -D-Galactosidase und β -D-Glucuronidase exprimiert

4 Grundlage des Verfahrens

Zu einer Wasserprobe (100 ml) oder einer auf 100 ml aufgefüllten Verdünnung einer Probe wird eine Blisterpackung Trockenmedium hinzugefügt. Die Probe mit dem Medium wird vorsichtig geschüttelt, um ein angemessenes Vermischen sicherzustellen und das Auflösen des Mediums zu fördern. Anschließend wird die Probe mit dem Medium aseptisch in ein Quanti-Tray¹⁾ oder Quanti-Tray/2000¹⁾ gegossen, um bis zu 201 Organismus bzw. 2 419 Organismen je 100 ml zu zählen. Die Träger (en: trays) werden mit einem Quanti-Tray¹⁾-Versiegelungsgerät versiegelt und anschließend 18 h bis 22 h bei $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ bebrütet.

Nach der Bebrütung werden Vertiefungen mit einer Gelbfärbung, die gleich der oder intensiver als die Färbung der Vertiefungen mit Vergleichslösung ist, als positiv in Bezug auf coliforme Bakterien angesehen. Gelbe Vertiefungen, die außerdem einen bestimmten Grad an Fluoreszenz aufweisen, werden als positiv in Bezug auf *E. coli* angesehen.

Die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) von coliformen Bakterien und *E. coli* je 100 ml Probe kann unter Anwendung statistischer Tabellen oder eines einfachen Rechnerprogramms bestimmt werden.

ANMERKUNG Die Gelbfärbung ist mit dem bloßen Auge zu erkennen und wird durch die Aufspaltung von ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid durch das Enzym β -D-Galactosidase hervorgerufen. Die Fluoreszenz ist unter ultraviolettem Licht (365 nm) nachweisbar und geht aus der Aufspaltung des Moleküls 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) durch das Enzym β -D-Glucuronidase hervor, die zur Bildung der fluoreszenten Verbindung Methylumbelliferon führt.

5 Geräte und Glasgeräte

Übliche Ausrüstung für mikrobiologische Laboratorien und insbesondere Folgendes:

5.1 Dampfsterilisator (Autoklav)

Geräte und Glasgefäße, die nicht steril geliefert wurden, müssen nach den in ISO 8199 angeführten Anweisungen sterilisiert werden.

5.2 Heißluft-Sterilisator, zur Sterilisation durch trockene Hitze.

5.3 Brutschrank, thermostatisch kontrollierbar auf $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.4 Quanti-Tray¹⁾-Versiegelungsgerät.

5.5 Sterile Weithalsgefäße mit einem Fassungsvermögen von mindestens 110 ml.

5.6 Quanti-Tray²⁾-Vergleichslösung.

5.7 UV-Lampe, 365 nm.

5.8 Quanti-Tray²⁾ oder Quanti-Tray/2000²⁾, siehe Anhang B.

1) Quanti-Tray ist ein Warenzeichen oder ein eingetragenes Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

2) Quanti-Tray ist ein Warenzeichen oder ein eingetragenes Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

6 Kulturmedien und Reagenzien

6.1 Grundstoffe

Bei dem Verfahren wird Colilert³⁾-18 eingesetzt, ein Medium auf der Grundlage der „Defined Substrate Technology“, verfügbar als in Blisterpackungen abgefülltes gebrauchsfertiges Pulver für eine 100-ml-Probe. Jede Blisterpackung enthält hinreichend Medium (2,8 g) für eine einzelne Untersuchung. Das Medium wird unter Umgebungsbedingungen (2 °C bis 25 °C) vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt gelagert und sollte vor dem auf der Blisterpackung angegebenen Verfallsdatum verbraucht werden.

Das Medium besteht aus zwei Komponenten, um die in Anhang C aufgeführten Endkonzentrationen zu erhalten.

6.2 Verdünnungsmittel

Für Verdünnungen, die mit Colilert³⁾-18 zu verwenden sind, ist nur steriles, nicht hemmend wirkendes Wasser frei von Oxidationsmitteln (vollentsalztes oder Leitungswasser) zu verwenden. Die Verwendung von gepufferten, salz- oder peptonhaltigen Verdünnungsmitteln wirkt sich störend auf die Leistung des Tests aus.

6.3 Antischaummittel B

Antischaummittel B ist eine 10%ige aktive, wasserlösliche Suspension von Silikon.

7 Probenahme

Die Proben sind nach ISO 19458 zu entnehmen und ans Laboratorium zu übergeben.

8 Durchführung

8.1 Probenvorbereitung

Die Proben sollten nach ISO 19458 bei (5 ± 3) °C transportiert und gelagert werden, mit der Analyse sollte am Tag der Entnahme oder innerhalb von 18 h begonnen werden. In Ausnahmefällen dürfen die Proben vor der Untersuchung bis zu 24 h bei (5 ± 3) °C gelagert werden.

8.2 Beimpfen der Medien

Zu jedem Volumen von 100 ml Probe oder Verdünnung ist aseptisch eine Blisterpackung Colilert⁴⁾-18-Medium (2,8 g) zuzugeben. Nach dem vollständigen Auflösen des Mediums wird die Probe mit dem Medium aseptisch entweder in Quanti-Tray⁴⁾ oder in Quanti-Tray⁴⁾/2000 gegossen und dieses anschließend mit dem Quanti-Tray⁴⁾-Versiegelungsgerät versiegelt. Meerwasserproben sollten grundsätzlich 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt werden. Um das Vorhandensein von Luftblasen in den Vertiefungen auf ein Mindestmaß zu verringern, können die Proben in vorsterilisierten Flaschen zubereitet werden, die Antischaummittel B enthalten. Alternativ kann das Antischaummittel B mit einer Tropfflasche zu jeder Flasche hinzugefügt werden. Die Verwendung einer der beiden Formen von Antischaummittel ist wahlfrei. Alternativ kann die Wasserprobe, in der das Colilert⁴⁾-18 gelöst wurde, zur Bestimmung der MPN unter Anwendung eines herkömmlicheren MPN-Verfahrens in sterile Röhrchen (z. B. 1×50 ml und 5×10 ml) verteilt werden. Wenn ein einzelnes Volumen von 100 ml bebrütet wird, kann das Verfahren als Prüfung auf Vorhandensein/Nichtvorhandensein zum Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* eingesetzt werden. Wenn eine der beiden letzteren Herangehensweisen angewendet wird, sollten die Röhrchen vor Bebrütungsbeginn 20 min auf (36 ± 2) °C vorgewärmt werden.

3) Colilert ist ein Warenzeichen oder ein eingetragenes Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

4) Colilert und Quanti-Tray sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO.

Obwohl empfohlen wird, Meerwasserproben vor der Untersuchung 1:10 mit sterilem vollentsalztem Wasser zu verdünnen, wurde festgestellt, dass die Salzkonzentration des Meerwassers in einigen geographischen Bereichen hinreichend gering ist, so dass eine Kultivierung ohne Verdünnung möglich ist. Wenn dieses Verfahren anzuwenden ist, sollten Validierungsdaten zur Verfügung stehen. Der Salzgehalt des Meerwassers schwankt beträchtlich und es liegt in der Verantwortung des Laboratoriums festzustellen, ob Meerwasserproben eine Verdünnung erfordern.

8.3 Bebrütung und Differenzierung

Die beimpften Quanti-Trays⁴⁾ sind 18 h bis 22 h bei $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ für coliforme Bakterien und *E. coli* zu bebrüten.

8.4 Untersuchung der Ergebnisse

Quanti-Tray⁴⁾ oder Quanti-Tray⁴⁾/2000 ist nach der Bebrütung für 18 h bis 22 h zu untersuchen und als positive Reaktionen in Bezug auf coliforme Bakterien sind die Vertiefungen zu betrachten, die die gleiche oder eine intensivere Gelbfärbung als die Quanti-Tray-Vergleichslösung aufweisen. Die Träger sind in einem dunklen Raum oder in einer Kammer, die das Umgebungslicht abdunkelt, unter UV-Licht (365 nm) auszuwerten. Sämtliche gelb gefärbten Vertiefungen, die auch einen bestimmten Grad an Fluoreszenz aufweisen, sind als positiv in Bezug auf *E. coli* anzusehen. Wenn die Ergebnisse nach 18 h mehrdeutig sind (d. h. die Gelbfärbung ist schwächer als bei der Vergleichslösung), sollte die Bebrütung auf bis zu 22 h verlängert werden. Positive Ergebnisse sowohl für coliforme Bakterien als auch für *E. coli*, die vor Ablauf der Bebrütungszeit von 18 h beobachtet werden, sowie negative Ergebnisse, die nach 22 h festgestellt werden, sind ebenfalls gültig.

9 Auswertung

Aus der Anzahl der Vertiefungen auf einem Quanti-Tray⁴⁾, die positiv sind, kann die MPN/100 ml sowohl für coliforme Bakterien als auch für *E. coli* unter Bezugnahme auf statistische Tabellen oder unter Anwendung eines MPN erzeugenden Rechnerprogramms berechnet werden, siehe Tabellen B.1 und B.2.

10 Analysenbericht

Der Analysenbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) Angabe des verwendeten Verfahrens mit einer Verweisung auf diesen Teil von ISO 9308;
- b) alle Informationen, die zur vollständigen Identifizierung der Probe benötigt werden;
- c) Angabe der Ergebnisse nach Abschnitt 9;
- a) jede Abweichung von diesem Verfahren und Angabe aller Umstände, die gegebenenfalls das Ergebnis dieses Teils von ISO 9308 beeinflusst haben können.

11 Qualitätssicherung

Das Laboratorium muss über ein klar definiertes Qualitätsmanagementsystem verfügen, um sicherzustellen, dass die Geräte, Reagenzien und Techniken für die Untersuchung geeignet sind. Die Verwendung von Positivkontrollen, Negativkontrollen und Blindproben ist Teil der Untersuchung.

Anhang A (informativ)

Weitere mikrobiologische Informationen über coliforme Bakterien

Coliforme Bakterien sind üblicherweise Gram-negative, nicht Sporen bildende, Oxidase-negative, stäbchenförmige Bakterien, die außerdem β -D-Galactosidase exprimieren und in der Lage sind, aerob und fakultativ anaerob in Gegenwart von Galle-salzen (oder anderen oberflächenaktiven Agenzien mit ähnlichen wachstumshemmenden Eigenschaften) zu wachsen und die üblicherweise fähig sind, Laktose innerhalb von 48 h unter Bildung von Säure und Aldehyd zu vergären, wenn sie bei $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ bebrütet werden. *E. coli* sind coliforme Bakterien, die β -D-Glucuronidase exprimieren und zusätzlich in der Lage sind, innerhalb von (21 ± 3) h bei $(44,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ Indol aus Tryptophan zu produzieren. Sie geben ein positives Ergebnis im Methylrot-Test und können L-Glutaminsäure decarboxylieren, sind aber nicht in der Lage, Acetylmethylcarbinol (3-Hydroxy-2-butanon) zu bilden, Citrat als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen oder in KCN-Bouillon zu wachsen.

Einige Stämme von *Escherichia coli*, die β -D-Glucuronidase-negativ sind, wie z. B. *Escherichia coli* O157, werden nicht als *E. coli* nachgewiesen. Da sie β -D-Galactosidase-positiv sind, erscheinen sie als coliforme Bakterien.

Anhang B (normativ)

Das Quanti-Tray⁵⁾-Versiegelungsgerät und Berechnung der Ergebnisse

B.1 Allgemeines

Das Quanti-Tray⁵⁾-Versiegelungsgerät ist eine Einheit zur Hitzeversiegelung, die eine Abdichtung (Naht) zwischen den Vertiefungen im Quanti-Tray herstellt. Das Versiegelungsgerät verteilt automatisch die Flüssigkeit auf die Vertiefungen von Quanti-Tray oder Quanti-Tray/2000. Quanti-Tray wird verwendet, wenn die erwarteten Keimzahlen unterhalb von 200 KBE/100 ml liegen. Quanti-Tray/2000 kann zur Berechnung von MPN-Werten von bis zu 2 419 KBE/100 ml verwendet werden. Bei der Berechnung der MPN dienen die mit den Trägern gelieferten Tabellen als Referenz für alle Keimzahlen. Zur Berechnung der Ergebnisse kann auch ein einfaches statistisches Programm angewendet werden. Bei Bedarf kann die MPN manuell nach den nachstehend angeführten Verfahren berechnet werden.

B.2 Berechnung der wahrscheinlichsten Keimzahl

B.2.1 Berechnung der MPN für IDEXX Quanti-Tray⁵⁾ und Quanti-Tray/2000

B.2.1.1 Quanti-Tray (51 Vertiefungen)

Das Verfahren zur Bestimmung der MPN mit Quanti-Tray wurde ursprünglich an der Yale-Universität entwickelt; ein weiteres gutes Beispiel für diese Reihenverdünnung ist bei der U.S. Food and Drug Association im *Bacteriological Analytical Manual* (verfügbar unter [BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010](#)) zu finden.

Jede Probenvertiefung hat ein Volumen von näherungsweise 1,96 ml.

Die Überlaufvertiefung fasst ein Mindestvolumen von 8,5 ml.

Zur Berechnung der MPN mittels Quanti-Tray (Tabelle B.1) siehe Gleichung (B.1).

$$N_{\text{MPN}} = N \cdot \ln[N/(N - X)] \quad (\text{B.1})$$

Dabei ist

- N_{MPN} die MPN;
 N die Gesamtanzahl der in einer Untersuchung verwendeten Vertiefungen (Röhrchen);
 X die Anzahl der in einer Untersuchung beobachteten positiven Vertiefungen (Röhrchen).

5) Quanti-Tray ist ein Warenzeichen oder ein eingetragenes Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

B.2.1.2 Quanti-Tray⁶⁾/2000 (97 Vertiefungen)

Das Verfahren zur Bestimmung der MPN mit Quanti-Tray/2000 wurde ursprünglich wie in Literaturhinweis [1] beschrieben abgeleitet.

Kleine Vertiefungen weisen ein mittleres Volumen von 0,186 ml auf.

Große Vertiefungen weisen ein mittleres Volumen von näherungsweise 1,86 ml auf (das Zehnfache der kleinen Vertiefungen).

Die Überlaufvertiefung fasst ein Volumen von näherungsweise 11 ml.

Zur Berechnung der MPN mittels Quanti-Tray⁶⁾/2000 (Tabelle B.2) siehe Gleichung (B.2).

$$\sum_{i=1}^K \frac{V_i d_i P_i}{1 - e^{-V_i d_i N_{\text{mpn}}}} = \sum_{i=1}^K V_i d_i n_i \quad (\text{B.2})$$

Dabei ist

- d_i der Verdünnungsfaktor bei der Stufe i (z. B. 0,1 bei einer Verdünnung 1:10);
- K die Anzahl der Verdünnungsstufen;
- n_i die Anzahl der Vertiefungen bei der Stufe i ;
- N_{mpn} die MPN;
- P_i die Anzahl der positiven Vertiefungen bei der Stufe i ;
- V_i das Volumen der Vertiefungen bei der Stufe i .

Der 95%-Vertauensbereich kann ermittelt werden aus:

$$T_0 = (\ln N_{\text{mpn}} - 1,96) \cdot \varepsilon(\ln N_{\text{mpn}})$$

$$T_1 = (\ln N_{\text{mpn}} + 1,96) \cdot \varepsilon(\ln N_{\text{mpn}})$$

Dabei ist

T_0 die untere Vertrauensgrenze;

T_1 die obere Vertrauensgrenze;

ε die Standardabweichung; und

$$\varepsilon(\ln N_{\text{mpn}}) = \sqrt{N_{\text{mpn}}^2 \sum_{i=1}^K \frac{V_i^2 d_i^2 n_i^2}{e^{-V_i d_i N_{\text{mpn}}} - 1}} \quad (\text{B.3})$$

6) Quanti-Tray ist ein Warenzeichen oder ein eingetragenes Warenzeichen von IDEXX Laboratories, Inc. oder ihren verbundenen Unternehmen in den USA und/oder anderen Ländern. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Teils von ISO 9308 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO.

Tabelle B.1 — MPN für Quanti-Tray mit 51 Vertiefungen

Anzahl der Vertiefungen mit einer positiven Reaktion	Wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) je 100 ml Probe	95 %-Vertrauensgrenzen	
		Untere	Obere
0	< 1 ^a	0,0	3,7
1	1	0,3	5,6
2	2	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56	39,7	80,1

Tabelle B.1 (fortgesetzt)

Anzahl der Vertiefungen mit einer positiven Reaktion	Wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) je 100 ml Probe	95 %-Vertrauensgrenzen	
		Untere	Obere
35	59,1	42	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50	99
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85	174,5
47	129,8	92,7	195
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	unendlich
^a Ein Wert von < 1 bedeutet, dass in der Prüfung keine Zielbakterien nachgewiesen wurden. Bei unverdünnten Proben kann das als null angegeben werden. Wenn die Probe jedoch verdünnt wurde, muss der entsprechende Multiplikationsfaktor verwendet werden. Wenn zum Beispiel eine Verdünnung von 1:10 erfolgt ist und keine Bakterien nachgewiesen wurden, sollte das Ergebnis im Untersuchungsbericht als < 10 angegeben werden.			