

DIN EN 13623



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2018-06-20
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 13623:2010-12

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden
Wirkung gegen *Legionella* von chemischen Desinfektionsmitteln für
wasserführende Systeme –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 13623:2018**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity against *Legionella* of
chemical disinfectants for aqueous systems –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German and English version prEN 13623:2018

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide contre des
légionelles des désinfectants chimiques pour les systèmes aqueux –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande et anglaise prEN 13623:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-04-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6,
10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 74 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13623:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für das in diesem Dokument zitierte internationale Dokument wird im Folgenden auf das entsprechende deutsche Dokument hingewiesen:

ISO 11731 siehe DIN EN ISO 11731

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13623:2010-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Temperaturbereich für die Inkubation von Platten wurde von $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ in den Bereich $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ geändert, wie in der neuen Norm ISO 11731 für Legionella-Kulturen angegeben;
- b) im Anwendungsbereich wurde ein neuer Absatz eingefügt, der besagt, dass das Verfahren nicht für kontinuierlich dosierte Produkte geeignet ist;
- c) die Berechnungsfehler in Tabelle A.2 wurden korrigiert;
- d) Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 11731, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Legionellen*

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer
Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung gegen
Legionella von chemischen Desinfektionsmitteln für wasserführende
Systeme — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)**

Antiseptiques et désinfectants chimiques — Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide contre des *légi*onelles des désinfectants chimiques pour les systèmes aqueux — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity against *Legionella* of chemical disinfectants for aqueous systems — Test method and requirements (phase 2, step 1)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	6
5.1 Kurzbeschreibung	6
5.2 Materialien und Reagenzien	6
5.2.1 Prüfkeim	6
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	7
5.3 Apparate und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	11
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Prüflösungen	12
5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Prüf- und Validierungssuspension)	12
5.4.2 Produktprüflösung	13
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	14
5.5.1 Allgemeines	14
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	15
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	18
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	19
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	19
5.6.2 Berechnung	20
5.7 Verifizierung des Verfahrens	24
5.7.1 Allgemeines	24
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	24
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	24
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	25
5.8.1 Keimreduktion	25
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	25
5.8.3 Bakterizide Konzentration	25
5.8.4 Präzision, Wiederholung	25
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	25
5.9.1 Allgemeines	25
5.9.2 Bakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke	25
5.9.3 Bakterizide Wirkung für besondere Zwecke	26
5.10 Prüfbericht	26
Anhang A (informativ) Bestimmung der bakteriziden Wirkung gegen <i>Legionella pneumophila</i>	28
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren	32
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	32
C.2 Membranfiltrationsverfahren	34
Literaturhinweise	36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13623:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 13623:2010 ersetzen.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand des CEN/TC 216 anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren. Nachfolgend werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- der Temperaturbereich für die Inkubation von Platten wurde von $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ in den Bereich $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ geändert, wie in der neuen Norm ISO 11731 für Legionella-Kulturen angegeben;
- im Anwendungsbereich wurde ein neuer Absatz eingefügt, der besagt, dass das Verfahren nicht für kontinuierlich dosierte Produkte geeignet ist;
- die Berechnungsfehler in Tabelle A.2 wurden korrigiert.

Die oben genannten Änderungen haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die vorherige Version erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Einleitung

Diese Europäische Norm legt einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine bakterizide Wirkung gegen *Legionella pneumophila* aufweist, fest. Die vorliegende Norm wurde speziell für Produkte zur Wasseraufbereitung erarbeitet, es ist jedoch auch möglich, sie auf andere Produkte anzuwenden.

Die Proliferation von *Legionella* tritt nur unter bestimmten Bedingungen in Gewässern auf und stellt überwiegend als Aerosol ein Risiko dar. Viele wasserführende Systeme erfordern keine Aufbereitung. Eine Entscheidung über die Zugabe chemischer Desinfektionsmittel zu einem beliebigen Wasser sollte auf einer Risikobeurteilung beruhen.

Wenn das Produkt die Anforderungen der vorliegenden Norm erfüllt, kann es als bakterizid gegen *Legionella pneumophila* angesehen werden, aber daraus sollte nicht zwangsläufig abgeleitet werden, dass das Produkt ohne Berücksichtigung anderer relevanter Faktoren, wie z. B. pH-Wert, Wasser, chemische Eigenschaften, Temperatur und biologischer Verschmutzungsgrad am Anwendungsort, für einen spezifischen Anwendungsort annehmbar ist. Die Norm berücksichtigt nicht die durch einen Biofilm auf den Organismen bedingte Schutzwirkung.

Die Untersuchungsbedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in diesem Versuch gefundene Konzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt unterschiedlich sein und deshalb müssen zusätzliche Untersuchungsbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln zur Verwendung bei der Aufbereitung in wasserführenden Systemen gegen *Legionella pneumophila* fest, die bei Verdünnung mit gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte oder Wasser standardisierter Härte als homogenes, physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Immer wenn *Legionella pneumophila* ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt, ist dieses Verfahren für in Kühltürmen genutztes Wasser und Wasser für allgemeine Zwecke, wie z. B. Bäder, Schwimm- und Badebecken, Duschen und andere Zwecke, geeignet. Das Verfahren ist nicht für die elektrochemische Desinfektion geeignet.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die als einmalige Schockbehandlung zur Abtötung von *Legionella pneumophila* verwendet werden. Es ist nicht geeignet für die Bewertung derjenigen Produkte, die kontinuierlich in Wassersysteme dosiert werden, um das Wachstum von *Legionella pneumophila* zu kontrollieren.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirksamkeit von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Das Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1.

ANMERKUNG 3 Das vorliegende Verfahren berücksichtigt nicht die Tatsache, dass *Legionella pneumophila* oft in Zellen von Amöben und/oder Biofilmen zu finden ist und das dadurch die Wirksamkeit des Produkts gegen die Bakterien möglicherweise verringert ist.

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehungen der verschiedenen Prüfungen untereinander und zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

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).

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Kühlwasser

Wasser zur Reduzierung der Hitze in einem Prozess oder in der Umwelt

3.2

Wasser für allgemeine Zwecke

Wasser, das unter anderen Voraussetzungen verwendet wird als Kühlwasser

4 Anforderungen

Für das Produkt, das mit gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte (5.2.2.10) oder Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) verdünnt und nach Abschnitt 5 unter den obligatorischen Untersuchungsbedingungen (ein gewählter Prüfkeim, bei entweder 20 °C oder 30 °C) innerhalb von 60 min bei Produkten mit schneller bakterizider Wirkung oder 15 h bei Produkten mit langsamerer bakterizider Wirkung geprüft wurde, muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um vier Stufen nachgewiesen werden.

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Prüfkeims zu bewerten: *Legionella pneumophila*.

Wo es angezeigt ist, muss die spezifische bakterizide Wirkung zusätzlich unter Anwendung anderer Einwirkzeiten und Prüfkeime (in Übereinstimmung mit 5.2.1 und 5.5.1.1) bestimmt werden, um besondere vorge-sehene Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Bei diesen zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgestellte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Untersuchungsbedingungen erhaltene Konzentration.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) verdünnte Probe des Produkts wird zu einer Prüfsuspension von Bakterien in einer Lösung von Belastungssubstanzen gegeben. Das Gemisch wird für $60 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ oder $(15 \pm 1) \text{ h}$ bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gehalten (obligatorische Untersuchungsbedingungen). Am Ende der gewählten Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen und die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung dieses Anteils wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Bakterien in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung von *Legionella pneumophila* als Prüfkeim (obligatorische Untersuchungsbedingungen) durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche und wahlfreie Einwirkzeiten sind festgelegt. Zusätzliche Prüfkeime dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeim

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Stammes als Prüfkeim¹⁾ zu ermitteln: *Legionella pneumophila*: Serogruppe 1, Philadelphia (NCTC 11192, ATCC 33152).

Falls für bestimmte Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, z. B. *Legionella pneumophila*, Serogruppe 1, Benidorm (NCTC 12006, ATCC 43108).

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diesen Prüfkeim liegt bei $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Für alle während eines Versuchs sowie dessen Kontrolle und Validierung durchgeführten Bebrütungen muss die gleiche Temperatur angewendet werden.

1) Die NCTC- und ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der National Type Culture Collection (NCTC) und der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht angeführten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden. Wenn die gewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüfkeime nicht durch ein Referenz-Zentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Außerdem müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Sofern nicht speziell angeführt, beziehen sich alle in dieser Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen auf die wasserfreien Salze. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekulmassen zu berücksichtigen.

Die Reagenzien müssen analyserein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüfkeime wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Endverbrauchsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert werden und darf nicht nur entmineralisiertes Wasser sein. Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen (Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.10.

5.2.2.3 Gepuffertes Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar (en: Buffered Charcoal Yeast Extract, BCYE-Agar)

BCYE-Agar, der aus Folgendem besteht:

— Hefeextrakt (Reinheit für bakteriologische Untersuchungen)	— 10,0 g;
— Agar	— 12,0 g;
— Aktivkohle	— 2,0 g;
— α -Ketoglutarat, Monokaliumsalz	— 1,0 g;
— ACES-Pufferlösung (<i>N</i> -2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	— 10,0 g;
— Kaliumhydroxid (KOH) (Plätzchen)	— 2,8 g;
— <i>L</i> -Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	— 0,4 g;
— Eisen(III)-pyrophosphat [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$]	— 0,25 g;
— Destilliertes Wasser	— bis auf 1 000,0 ml.

Herstellung

a) Cystein- bzw. Eisenlösung

Es sind frische Lösungen von *L*-Cysteinhydrochlorid und Eisen(III)-pyrophosphat herzustellen, indem 0,4 g bzw. 0,25 g zu 10-ml-Volumina Wasser (5.2.2.2) hinzugefügt werden. Jede Lösung ist durch Membranfiltration (5.3.2.7) zu sterilisieren. Die Lösungen sind in sauberen sterilen Behältern bei $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 3 Monate aufzubewahren.

b) ACES-Pufferlösung

Die ACES-Körnchen sind zu 500 ml Wasser (5.2.2.2) zu geben und durch Stehen in einem Wasserbad bei 45°C bis 50°C zu lösen. Zu weiteren 480 ml Wasser (5.2.2.2) sind die gesamten Kaliumhydroxid-Plätzchen zu geben und durch vorsichtiges Schütteln zu lösen. Zur Herstellung der ACES-Pufferlösung sind die beiden Lösungen zu mischen.

ANMERKUNG Die ACES-Pufferlösung kann zu einer Denaturierung des Hefeextrakts führen, wenn die nachfolgende Reihenfolge nicht eingehalten wird.

c) Endmedium

Zu den 980 ml ACES-Pufferlösung sind nacheinander die Aktivkohle, der Hefeextrakt und α -Ketoglutarat hinzuzufügen. Durch Lösen von 5,6 g Kaliumhydroxid (KOH) in 1 l Wasser (5.2.2.2) ist eine Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Durch vorsichtige Zugabe von 5,3 ml Schwefelsäure (H_2SO_4) zu 1 l Wasser (5.2.2.2) ist eine Schwefelsäure-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Je nach Bedarf ist die Kaliumhydroxid-Lösung oder die Schwefelsäure-Lösung, jeweils mit einer Konzentration von 0,1 mol/l, zum Einstellen des pH-Wertes auf $6,9 \pm 0,2$ zu verwenden. Der Agar ist hinzuzufügen, alles ist zu vermischen und zu autoklavieren [5.3.2.1 a)]. Nach dem Autoklavieren ist das Gemisch in einem Wasserbad (5.3.2.2) auf $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$ abkühlen zu lassen.

Die *L*-Cystein- und Eisen(III)-pyrophosphat-Lösungen sind aseptisch hinzuzufügen, wobei zwischen den Zugaben gut zu mischen ist.

20-ml-Volumina sind in Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm zu verteilen. Der pH-Wert des Endmediums beträgt bei 25°C $6,9 \pm 0,2$. Überschüssige Feuchtigkeit auf den Platten ist trocknen zu lassen und die Platten sind in luftdichten Behältern im Dunkeln bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ für bis zu vier Wochen zu lagern.

Ein längeres Erhitzen während der Sterilisation oder ein Erhitzen auf eine zu hohe Temperatur sind zu vermeiden, weil das den Nährwert des BCYE-Mediums beeinträchtigen kann. Schwankungen zwischen den Chargen der Bestandteile des Mediums (insbesondere α -Ketoglutarat) können ebenfalls dessen Leistungsverhalten beeinflussen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, die Qualität jeder neu hergestellten Mediencharge auf deren Fähigkeit zu prüfen, das Wachstum des Prüfkeims innerhalb einer Bebrütungsdauer von drei Tagen zu fördern, wobei die Validierungssuspension N_V (5.4.1.5) verwendet wird.

Die Eignung der Medien zur Unterstützung des Wachstums von *Legionella* sollte quantitativ abgeschätzt werden entweder durch bekannte Quantitäten des obligatorischen *Legionella*-Stammes oder durch direkten Vergleich mit früheren Chargen. Kommerziell erhältliche Medien dürfen ohne Prüfung verwendet werden, wenn die Leistungsfähigkeit in einem Labor geprüft wurde, dass nach EN ISO/IEC 17025:2017 für diesen Zweck akkreditiert wurde.

5.2.2.4 BCYE-Bouillon

Die Bouillon ist nach dem gleichen Verfahren wie BCYE-Agar (5.2.2.3) herzustellen, jedoch ohne Zugabe von Agar.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.2 validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

ANMERKUNG In Anhang B sind Angaben zu Neutralisationsmedien angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein. Die Spülflüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Untersuchungsbedingungen durch die Filtermembran filtrierfähig sein.

ANMERKUNG In Anhang B sind Angaben zu Spülflüssigkeiten angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte für allgemeine Zwecke (en: hard water for general purpose, HWGP)

Zur Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt zu verfahren:

- a) Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Wenn das Autoklavieren angewendet wird, kann es zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- b) Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- c) In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG 1 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts in dieses Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 300 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

ANMERKUNG 2 Dieses Wasser standardisierter Härte stellt die typische Beschaffenheit von Wasser dar, das nicht als Kühlwasser verwendet wird.

5.2.2.8 Belastungssubstanz (Hefeextrakt)

- | | |
|---------------|-----------------------|
| — Hefeextrakt | — 0,5 g; |
| — Wasser | — bis auf 1 000,0 ml. |

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Die Endkonzentration des Hefeextrakts in der Prüfung beträgt 0,000 5 %.

5.2.2.9 Salzlösung nach Page

Salzlösung, die aus Folgendem besteht:

— Natriumchlorid (NaCl)	— 0,120 g;
— Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	— 0,004 g;
— Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	— 0,004 g;
— Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	— 0,142 g;
— Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	— 0,136 g;
— Wasser (5.2.2.2)	— bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Zur Unterstützung einer genauen Herstellung wird empfohlen, ein Volumen von 10 l der Salzlösung nach Page herzustellen und auf kleinere Volumina aufzuteilen, wie sie für das Autoklavieren erforderlich sind. Alternativ dürfen die Salzlösungen einzeln in konzentrierter Form hergestellt und bei Bedarf entsprechend verdünnt werden.

5.2.2.10 Gepuffertes eisenhaltiges Wasser standardisierter Härte zur Aufbereitung von Kühlwasser (en: buffered ferrous hard water for treatment of cooling water, BFHW)

Zur Herstellung von 1 l BFHW ist wie folgt zu verfahren:

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Wenn das Autoklavieren angewendet wird, kann es zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu gegeben werden 70 ml 0,2 M Borsäure (13,6 g Borsäure werden mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt), 30 ml 0,05 M Borax (19,07 g Borax werden mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt) und 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A sowie danach 8,0 ml Lösung B. Abschließend wird 1,0 ml Eisen(III)-sulfat-Lösung ($3,0 \times 10^{-3}$ mol/l) hinzugefügt. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $8,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG 1 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts in dieses Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 300 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

ANMERKUNG 2 Dieses gepufferte eisenhaltige Wasser standardisierter Härte stellt die typische Beschaffenheit von Kühlwasser dar.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme der steril gelieferten sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

- a) durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.2.1, a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1, b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

- a) zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min auf einer Betriebstemperatur von (180^{+5}_0) °C, für eine Mindesthaltezeit von 1 h auf einer Betriebstemperatur von (170^{+5}_0) °C oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h auf einer Betriebstemperatur von (160^{+5}_0) °C gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf die Betriebstemperatur von (20 ± 1) °C, (30 ± 1) °C und (47 ± 2) °C. Als Alternative darf ein Wärmeschrank oder ein Brutschrank angewendet werden, der auf diese genannten Temperaturen eingestellt werden kann.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von (36 ± 2) °C. Die Platten müssen in dichten verschlossenen Beuteln oder Behältern bebrütet werden, damit der Agar gegen Austrocknen geschützt wird.

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C.

ANMERKUNG Für die Messung des pH-Werts der Agarmedien (5.2.2.3) wird empfohlen, eine Punktelektrode oder eine flache Membranelektrode zu verwenden.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schnellschüttelgerät, elektromechanisch (z. B. Vortex®-Mischer)³⁾

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit der zu filtrierenden Substanz kompatiblen Material.

Das Gerät muss mit einem Filterhalter mit einem Mindest-Nutzvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein für die Verwendung mit Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm zur Sterilisation von Lösungen und Suspensionen und im Fall der Anwendung der Membranfiltration (5.5.3).

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

3) Vortex® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu erreichen und einen zu lange dauernden Filtrationsvorgang zu verhindern, muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

5.3.2.8 Kühltank, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C.

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Petrischalen (Platten) in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Zentrifuge (2 000 g_N).

5.3.2.12 Messkolben.

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Prüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Es müssen zwei unterschiedliche Suspensionen hergestellt werden: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüfkeimen

Die Prüfkeime und deren Stammkulturen sind nach den Anweisungen des Herstellers aufzubewahren und wiederherzustellen.

Es ist eine Subkultur auf BCYE-Agar (5.2.2.3) anzulegen. Nach dem Bebrüten (5.3.2.3) ist aus dem sich ergebenden, gerade mit dem bloßen Auge sichtbaren, Aufwuchs eine Suspension herzustellen und in Salzlösung nach Page (5.2.2.9) oder Wasser (5.2.2.2) zur Lagerung bei –70 °C zu verteilen. Wenn auf BCYE-Agar kein Wachstum auftritt, darf eine BCYE-Bouillon (5.2.2.4) beimpft und bebrütet (5.3.2.3) werden und von dieser Bouillon darf wie vorstehend beschrieben eine Subkultur angelegt werden.

ANMERKUNG Handelsübliche Gefriertrocknungssysteme können verwendet werden, vorausgesetzt, sie ergeben eine zufriedenstellende Wiederfindungsrate des Prüfkeims.

5.4.1.3 Gebrauchskulturen des Prüfkeims

Um die Gebrauchskultur des Prüfkeims (5.2.1) zu erhalten, wird aus der eingefrorenen Suspension (5.4.1.2) durch Ausstreichen auf BCYE-Platten (5.2.2.3) eine Subkultur angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Diese Subkultur ist die Gebrauchskultur.

5.4.1.4 Prüfsuspensionen („N“)

- Die Gebrauchskultur (5.4.1.3) wird genommen und der Aufwuchs wird durch Suspendieren in Salzlösung nach Page (5.2.2.9) von der Platte abgelöst. Die Suspension wird abgesaugt und in ein Röhrchen überführt. Die Suspension wird für 10 s gemischt (5.3.2.6) und anschließend für 15 min zentrifugiert (5.3.2.11). Der Niederschlag wird in Salzlösung nach Page (5.2.2.9) erneut suspendiert.
- Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird unter Verwendung der Salzlösung nach Page (5.2.2.9) auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml⁴⁾ bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE auf beliebige geeignete Weise abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad entweder bei 20 °C für Produkte, die

4) KBE/ml: koloniebildende Einheit(en) je Milliliter.

nicht für Kühlwasser verwendet werden oder bei 30 °C für Kühlwasserprodukte [5.5.1.1 a)] aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

Die Verwendung eines Spektrofotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten für jeden Prüfkeim erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte zwischen 0,150 und 0,400 zu finden sind. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit Salzlösung nach Page (5.2.2.9) Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt (5.3.2.6). Eine Probe von je 1,0 ml von jeder Verdünnung wird als Doppelbestimmung entnommen und im Spatelplattenverfahren abgeimpft. Jede 1,0-ml-Probe wird in etwa gleiche Anteile (höchstens 0,2 ml) geteilt auf eine entsprechende Anzahl von Platten mit BCYE (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension („ N_V “)

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit Salzlösung nach Page (5.2.2.9) so verdünnt, dass sich $3,0 \times 10^2$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml ergeben [etwa ein Viertel ($1 + 3$) der Verdünnung 10^{-5}].
- b) Zur Auszählung wird mit Salzlösung nach Page (5.2.2.9) eine Verdünnung von 10^{-1} hergestellt. Es wird durchmischt (5.3.2.6). Eine Probe von 1,0 ml wird als Doppelbestimmung entnommen und im Spatelplattenverfahren [5.4.1.4 c)] abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

- a) Die Platten werden sieben Tage bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die aus irgendeinem Grunde nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der KBE wird bestimmt.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 330“ für alle Koloniezahlen über 330 notiert, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahlen der KBE/ml in der Prüfsuspension N und der Validierungssuspension N_V werden nach den in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.4.2 Produktprüflösung

Die Konzentration einer Produktprüflösung muss das 10fache der gewünschten Konzentration betragen, weil sie während der Prüfung und während der Validierung des Verfahrens (5.5.2 oder 5.5.3) auf 10 % verdünnt wird. Produktprüflösungen sind in Wasser standardisierter Härte in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen herzustellen, um mindestens eine Konzentration im Wirkungsbereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich (5.8.2) zu erfassen. Die Art des Wassers standardisierter Härte wird nach der vorgesehenen Anwendung gewählt: BFHW (5.2.2.10) für Produkte zur Aufbereitung von Kühlwasser und HWGP (5.2.2.7) für Produkte zur Aufbereitung von Wasser für allgemeine Zwecke. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden, in diesem Fall beträgt die höchste geprüfte Konzentration 10 %.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (niedrigeren Konzentrationen) sind in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) herzustellen.

Bei flüssigen Produkten sind die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte im Verhältnis Volumen zu Volumen in Messkolben (5.3.2.12) herzustellen.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h in der Prüfung verwendet werden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrens stabil ist. Wenn im Verlauf des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch Bildung einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt (zum Beispiel durch den Zusatz der Belastungssubstanzen), muss dies im Prüfbericht festgehalten werden.

ANMERKUNG Das Auszählen in einer Ausfällung oder Ausflockung eingebetteter Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration ist als Massenkonzentration oder als Volumenkonzentration anzugeben, ebenso Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

Neben den obligatorischen Untersuchungsbedingungen, Einwirkzeit und Prüfkeim, dürfen zusätzliche Untersuchungsbedingungen (einschließlich Prüfkeimen) entsprechend der für das Produkt erwogenen praktischen Verwendung (Abschnitt 4) wie folgt gewählt werden:

a) Temperatur θ [in Grad Celsius (°C)]:

- 1) die obligatorische Prüftemperatur beträgt $\theta = 30$ °C für Kühlwasser (3.1);
- 2) die obligatorische Prüftemperatur beträgt $\theta = 20$ °C für Wasser für allgemeine Zwecke (3.2);
- 3) die zulässige Abweichung für die gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C;

ANMERKUNG Es werden keine zusätzlichen Temperaturen als relevant für diese Prüfung angesehen.

b) Einwirkzeit t [in Minuten (min)]:

- 1) bei schnell wirkenden Produkten, wie z. B. oxidierenden Substanzen, beträgt die obligatorische zu prüfende Einwirkzeit $t = 60$ min;
- 2) bei langsam wirkenden Produkten beträgt die obligatorische Einwirkzeit 15 h;
- 3) die zusätzlichen Einwirkzeiten dürfen aus 2 h, 6 h, 24 h, 40 h, 48 h gewählt werden;
- 4) die zulässige Abweichung für die gewählte Einwirkzeit von 60 min oder weniger beträgt ± 10 s, für Einwirkzeiten von 6 h oder weniger ± 5 min und für alle anderen Einwirkzeiten ± 1 h.

c) Belastungssubstanz: die zu prüfende obligatorische Belastungssubstanz ist eine 0,05%ige Hefeextrakt-Lösung;

d) Prüfkeim:

- 1) der obligatorische Prüfkeim ist *Legionella pneumophila* (5.2.1);
- 2) zusätzliche Prüfkeime (andere Stämme von *Legionella pneumophila* oder Arten von *Legionella*) dürfen verwendet werden.

5.5.1.2 Auswahl des Prüfverfahrens

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Zur Ermittlung eines geeigneten Neutralisationsmediums erfolgt die Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (5.5.2.3, 5.5.2.4 und 5.5.2.5 in Verbindung mit 5.5.2.6) unter Verwendung eines Neutralisationsmediums, das nach der Erfahrung des Laboratoriums und veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

Sollte dieses Neutralisationsmedium nicht valide sein, ist die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium unter Berücksichtigung der Informationen aus Anhang B zu wiederholen.

Wenn sich beide Neutralisationsmedien als nicht valide herausgestellt haben, darf das Verfahren der Membranfiltration (5.5.3) angewendet werden.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen zu Verfahrensabläufen bei der Validierung und Kontrolle

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der bakteriziden oder bakteriostatischen Wirkung des Produkts muss für jeden der verwendeten Prüfkeime und für jede Untersuchungsbedingung (Einwirkzeit) kontrolliert und validiert werden, und zwar nur bei der höchsten Produktprüfkonzentration. Diese Verfahren (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen, Kontrolle des Neutralisationsmediums oder der Filtration und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium — oder der gleichen Spülflüssigkeit — wie in der Prüfung durchgeführt werden.

Bei der Validierung und den Kontrollen muss das gleiche Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) wie in der Prüfung (5.5.2.2) verwendet werden.

Bei der Validierung und den Kontrollen muss der gleiche Agar (5.2.2.3) wie in der Prüfung (5.5.2.2) verwendet werden.

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), Prüfsuspension (5.4.1.4), Validierungssuspension (5.4.1.5), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung entweder auf 20 °C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30 °C für Kühlwasserprodukte eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) auf die Prüftemperatur von (20 ± 1) °C oder (30 ± 1) °C [5.5.1.1 a)] eingestellt.

Die Stabilisierung der Reagenzien auf die ausgewählte Temperatur ist zu überprüfen.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) oder die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) und das Wasser (5.2.2.2) müssen an eine Temperatur von (20 ± 1) °C angeglichen werden.

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüfkeimen

Der obere Teil der Innenseiten der Reagenzgläser darf beim Einfüllen der Prüf- oder Validierungssuspensionen (5.4.1) nicht berührt werden.

5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren⁵⁾

5.5.2.1 Allgemeines

Die Prüf-, Kontroll- und Validierungsverfahren (siehe 5.5.2.2 bis 5.5.2.5) sind gleichzeitig durchzuführen.

5) Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe C.1.

5.5.2.2 Prüfung „ N_a “ — Bestimmung der bakteriziden Konzentrationen

Der Verfahrensablauf zur Bestimmung bakterizider Konzentrationen ist wie folgt:

- a) 0,1 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) und 7,9 ml BFHW (5.2.2.10) oder HWGP (5.2.2.7) werden in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml Prüfsuspension (5.4.1.4) wird hinzugefügt. Die Stoppuhr (5.3.2.5) wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für 2 min $\pm$ 10 s in ein entweder auf 20 °C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30 °C für Kühlwasserprodukte [5.5.1.1 a)] eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit wird 1,0 ml einer der Produktprüflösungen (5.4.2) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] in ein entweder auf 20 °C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30 °C für Kühlwasserprodukte eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird die Lösung erneut durchmischt (5.3.2.6).

- b) Am Ende von t wird eine 1,0-ml-Probe des Prüfgemischs N_a entnommen und in ein Röhrchen mit 8,0 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) überführt. Es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird in ein auf (20 ± 1) °C eingestelltes Wasserbad gestellt. Nach einer Neutralisationszeit von 5 min $\pm$ 10 s werden sofort vier Proben von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemischs N_a (das Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension enthält) entnommen. Zwei der 1,0-ml-Proben werden in etwa gleichgroße Anteile (höchstens 0,2 ml) geteilt und nach dem Spatelplattenverfahren auf eine entsprechende Anzahl von BCYE-Platten (5.2.2.3) abgeimpft. Die beiden verbliebenen 1,0-ml-Proben werden mit 9,0 ml Salzlösung nach Page (5.2.2.9) verdünnt und 1,0 ml von jeder Probe wird auf eine entsprechende Anzahl von BCYE-Platten (5.2.2.3) abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

- c) Die Arbeitsgänge a) und b) werden unter Verwendung der anderen Produktprüflösungen gleichzeitig durchgeführt.
- d) Die Arbeitsgänge a) bis c) werden unter Anwendung der anderen obligatorischen und gegebenenfalls der anderen zusätzlichen Untersuchungsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

5.5.2.3 Kontrolle der Untersuchungsbedingungen A — Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen in den Untersuchungsbedingungen

Zur Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen in den Untersuchungsbedingungen wird wie folgt verfahren:

- a) 0,1 ml der in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Die Stoppuhr wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für 2 min $\pm$ 10 s in ein entweder auf 20 °C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30 °C für Kühlwasserprodukte eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,9 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.10 oder 5.2.2.7) zugegeben. Bei Beginn der Zugabe wird die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt. Nach dem Durchmischen (5.3.2.6) wird das Röhrchen für die Einwirkzeit t in ein entweder auf 20 °C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30 °C für Kühlwasserprodukte eingestelltes Wasserbad gestellt. Kurz vor dem Ende von t wird erneut durchmischt (5.3.2.6).

- b) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemischs A als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Spatenplattenverfahrens [5.5.2.2 b)] abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.4 Kontrolle des Neutralisationsmediums *B* — Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Zur Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums wird wie folgt verfahren:

- a) 8,0 ml des in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Neutralisationsmediums und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) werden in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Kurz vor dem Ende dieser Zeit wird durchmischt (5.3.2.6).
- b) Nach Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemischs *B* als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Spatenplattenverfahrens [5.5.2.2 b)] abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.5 Verfahrensvalidierung *C* — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

Zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens wird wie folgt verfahren:

- a) 0,1 ml der in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Röhrchen pipettiert. Zugewogen werden 7,9 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.10 oder 5.2.2.7) und dann, unter Inangsetzen einer Stoppuhr, 1,0 ml Produktprüflösung lediglich der stärksten in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Konzentration. Es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für die Einwirkzeit t in ein entweder auf 20°C für Produkte, die nicht für Kühlwasser verwendet werden oder auf 30°C für Kühlwasserprodukte eingestelltes Wasserbad gestellt. Kurz vor dem Ende von t wird erneut durchmischt (5.3.2.6).
- b) Nach Ablauf von t wird 1,0 ml des Gemischs in ein Röhrchen mit 8,0 ml (in 5.5.2.2 verwendetem) Neutralisationsmedium überführt. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt (5.3.2.6) und das Röhrchen wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. 1,0 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Bei Beginn der Zugabe wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt und es wird durchmischt (5.3.2.6). Das Röhrchen wird für $(30 \pm 1) \text{ min}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Kurz vor dem Ende dieser Zeit wird erneut durchmischt (5.3.2.6). Nach Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe des Gemischs *C* als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Spatenplattenverfahrens [5.5.2.2 b)] abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.6 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs und der Kontroll- und Validierungsgemische

Bei der Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs und der Kontroll- und Validierungsgemische wird wie folgt verfahren:

- a) Die Platten werden sieben Tage bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grunde) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird bestimmt.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 330“ für alle Koloniezahlen über 330 notiert, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahlen der KBE/ml im Prüfgemisch N_a und in den Validierungsgemischen *A*, *B* und *C* werden nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.3 Membranfiltrationsverfahren⁶⁾

5.5.3.1 Allgemeines

Die Prüf-, Kontroll- und Validierungsverfahren (siehe 5.5.3.2 bis 5.5.3.5) sind gleichzeitig und für jede Prüfbedingung (5.5.1.1) getrennt durchzuführen.

Jedes Membranfiltrationsgerät muss mit einer Membran mit einer Porenweite von 0,45 µm und einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm (5.3.2.7) ausgestattet und mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) gefüllt sein. Die für das Filtrieren erforderliche Zeit muss — wenn sie in Ausnahmefällen mehr als eine Minute beträgt — im Prüfbericht angegeben werden. Beim Überführen der Membranen auf die Oberfläche einer Agarplatte sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass sichergestellt ist, dass sich die Prüfkeime beim Auflegen auf die Platte auf der oberen Seite der Membran befinden, und dass ein Lufteinschluss zwischen Membran und Agaroberfläche vermieden wird.

5.5.3.2 Prüfung „ N_a “ — Bestimmung der bakteriziden Konzentrationen

Der Verfahrensablauf zur Bestimmung bakterizider Konzentrationen ist wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.2 a).
- b) Am Ende von t wird eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemischs „ N_a “ als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort. Es werden mindestens 150 ml, jedoch nicht mehr als 500 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) durchfiltriert. Wenn die Spülflüssigkeit nicht Wasser ist, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert werden. Anschließend werden sämtliche Membranen auf die Oberfläche gesonderter BCYE-Platten (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

- c) Siehe 5.5.2.2 c).
- d) Siehe 5.5.2.2 d).

5.5.3.3 Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ — Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen in den Untersuchungsbedingungen

Zur Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen in den Untersuchungsbedingungen wird wie folgt verfahren:

- a) Siehe 5.5.2.3 a).
- b) Am Ende von t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemischs „A“ als Doppelbestimmung entnommen und jede 1,0-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort sowie zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2). Anschließend werden sämtliche Membranen auf die Oberfläche gesonderter BCYE-Platten (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

6) Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe C.2.

5.5.3.4 Kontrolle der Filtration „B“ — Validierung des Filtrationsverfahrens

Zur Validierung des Filtrationsverfahrens wird wie folgt verfahren:

- a) 0,1 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) wird als Doppelbestimmung entnommen (Kontrollsuspension „B“) und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt.
- b) Die Filtration erfolgt sofort. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)]. Wenn die Spülflüssigkeit nicht Wasser ist, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert werden. Anschließend werden sämtliche Membranen auf die Oberfläche gesonderter BCYE-Platten (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.5 Verfahrensvalidierung „C“ — Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Zählung der Bakterien auf den Membranen, die vorher mit dem Gemisch von Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt gewesen sind

Zur Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Zählung der Bakterien auf den Membranen, die vorher mit dem Gemisch von Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt gewesen sind, wird wie folgt verfahren:

- a) Siehe [5.5.2.5 a)].
- b) Am Ende von t wird 0,1 ml des Validierungsgemisches „C“ als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)], anschließend werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt und 0,1 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) wird hinzugefügt. Es wird erneut sofort filtriert, zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2); anschließend werden sämtliche Membranen auf die Oberfläche gesonderter BCYE-Platten (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.6 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs und der Kontroll- und Validierungsgemische

Bei der Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs und der Kontroll- und Validierungsgemische wird wie folgt verfahren:

- a) Die Platten werden sieben Tage bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgend einem Grunde) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Kolonien auf den Membranen werden ausgezählt.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 165“ für alle Koloniezahlen über 165 notiert, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahlen der KBE/ml im Prüfgemisch „N_a“ und in den Validierungsgemischen „A“, „B“ und „C“ werden nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die unterschiedlichen Suspensionen und Prüfgemische

N und N_V sind die Bakteriensuspensionen, N_a ist das bakterizide Prüfgemisch, A (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen), B (Kontrolle des Neutralisationsmediums) und C (Verfahrensvalidierung) sind die unterschiedlichen Kontrollprüfgemische.

N , N_V , N_0 , N_{V0} , N_a sowie A , B und C sind die Anzahlen der je ml in den unterschiedlichen Prüfgemischen ausgezählten Zellen entsprechend Tabelle 1.

Tabelle 1 — Anzahl der je ml in den unterschiedlichen Prüfgemischen ausgezählten Zellen

	Anzahl der Zellen je ml in den Bakterien-suspensionen	Anzahl der Zellen je ml in den Prüfgemischen zu Beginn der Einwirkzeit ($t = 0$)	Anzahl der überlebenden Zellen je ml in den Prüfgemischen am Ende der Einwirkzeit t , nach 5 min (B) oder nach 30 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	$N_0 (= N/10)$	N_a (vor der Neutralisation)
Kontrollen	N_V Validierungssuspension	$N_{V0} (= N_V/10)$	A, B, C

5.6.1.2 V_C -Werte

Alle Versuchsdaten werden als V_C -Werte berichtet:

- beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (Prüfung und Kontrollen) ist ein V_C -Wert die Anzahl der je 1,0 ml Probe gezählten koloniebildenden Einheiten;
- beim Membranfiltrationsverfahren ist ein V_C -Wert die Anzahl der je 0,1 ml Probe beim Prüfgemisch „ N_a “ und je 1,0 ml Probe bei den Kontrollen gezählten koloniebildenden Einheiten.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Berechnung ist die Bestimmung der V_C -Werte, der zweite die Berechnung von N , N_0 , N_a , N_V , N_{V0} , A , B und C . Der dritte Schritt ist die Berechnung der Keimreduktion R (5.8).

5.6.2.2 Bestimmung der V_C -Werte

Die V_C -Werte werden wie folgt bestimmt:

- Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Bakterien auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300 Kolonien. In dieser Norm wird eine Abweichung von 10 % zugestanden, so dass die Grenzen zwischen 14 und 330 liegen. Auf Membranen sind die üblichen oberen Grenzwerte anders: 150, d. h. mit den 10 % Abweichung beträgt der Grenzwert 165.

ANMERKUNG 1 Grundlage des unteren Grenzwerts (14) ist die Tatsache, dass die Schwankungen zunehmen, je kleiner die für die Probe (1 ml oder 0,1 ml) gezählte Anzahl ist, und dass deshalb nachfolgende Berechnungen zu falschen Ergebnissen führen können. Der untere Grenzwert bezieht sich nur auf die Probe (und nicht notwendigerweise auf die Auszählung auf einer Platte), z. B. ergeben drei Platten je 1 ml Probe mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_C -Wert von 16. Die oberen Grenzwerte (330, 165) widerspiegeln die Ungenauigkeit des Zählens zusammenfließender Kolonien und die Wachstumshemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- Für die Auszählung der Prüfsuspension „ N “ (5.4.1.6), der Validierungssuspension „ N_V “ (5.4.1.6) und für alle Auszählungen beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2.6) werden die V_C -Werte entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten (5.6.1.2) ermittelt und aufgezeichnet.

ANMERKUNG 2 Wenn mehr als eine Platte je 1 ml Probe zur Bestimmung des V_C -Wertes verwendet worden ist, wird empfohlen, die Keimzahlen je Platte aufzuzeichnen.

Falls die Keimzahl auf einer Platte höher als 330 ist, wird die Zahl als „> 330“ berichtet. Wenn mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet wurde und wenn mindestens eine der Platten eine höhere Keimzahl als 330 aufweist, wird dieser V_C -Wert als „> Summe der Auszählungen“ berichtet (z. B. für „> 330, 310, 302“ wird berichtet „> 942“).

Falls ein V_C -Wert kleiner als 14 ist, wird die Zahl berichtet, aber für weitere Berechnungen (im Fall von N_a) durch „< 14“ ersetzt.

Beim Membranfiltrationsverfahren (5.5.3) sind die Keimzahlen auf den Membranen die V_C -Werte (5.6.1.2).

Die V_C -Werte unterhalb des unteren Grenzwerts (14) oder oberhalb des oberen Grenzwertes (165) werden wie vorstehend beschrieben berichtet.

- c) Für die weitere Berechnung werden nur V_C -Werte innerhalb der jeweiligen Auszählgrenzen berücksichtigt, außer im Fall von N_a (5.6.2.4).

5.6.2.3 Berechnung von N und N_0

N ist die Anzahl der Zellen je ml in der Prüfsuspension (5.4.1.4; 5.6.1.1).

Da die beiden Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.1.4 in Verbindung mit 5.4.1.6) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als gewichteter Mittelwert der Keimzahl nach folgender Formel berechnet:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2) \times 10^{-6}} \quad (1)$$

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_C -Werte;

n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10^{-6} , berücksichtigten V_C -Werte;

n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, d. h. 10^{-7} , berücksichtigten V_C -Werte;

10^{-6} der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

Die berechneten Ergebnisse werden auf zwei Dezimalstellen gerundet. Dabei wird, falls die letzte Ziffer kleiner als 5 ist, die vorhergehende Ziffer nicht verändert; falls die letzte Ziffer größer als 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer um eine Einheit vergrößert; falls die letzte Ziffer gleich 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer auf die nächstliegende gerade Zahl gerundet. Es ist schrittweise vorzugehen, bis zwei Dezimalstellen erreicht sind. Im Ergebnis wird die Anzahl der KBE/ml als Zahl zwischen 1,0 und 9,9, multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz, angegeben.

BEISPIEL

$$N = \frac{390 + 410 + 39 + 50}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-6}} = \frac{889}{2,2 \times 10^{-6}} = 4,0409 \times 10^8 = 4,0 \times 10^8 \text{ (in KBE/ml)}$$

N_0 ist die Anzahl der Zellen je ml im Prüfgemisch [5.5.2.2 a)] am Anfang der Einwirkzeit (Zeit „null“, $t = 0$). Sie beträgt ein Zehntel des gewichteten Mittelwertes von N aufgrund der zehnfachen Verdünnung durch die Zugabe von Produkt und Wasser.