

## DIN EN ISO 14189



ICS 07.100.20

Einsprüche bis 2016-03-15

**Entwurf**

**Wasserbeschaffenheit –  
Zählung von *Clostridium perfringens* –  
Verfahren mittels Membranfiltration (ISO 14189:2013);  
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 14189:2016**

Water quality –  
Enumeration of *Clostridium perfringens* –  
Method using membrane filtration (ISO 14189:2013);  
German and English version FprEN ISO 14189:2016

Qualité de l'eau –  
Dénombrement de *Clostridium perfringens* –  
Méthode de filtration sur membrane (ISO 14189:2013);  
Version allemande et anglaise FprEN ISO 14189:2016

**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-01-15 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter [www.entwuerfe.din.de](http://www.entwuerfe.din.de) bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter [www.entwuerfe.normenbibliothek.de](http://www.entwuerfe.normenbibliothek.de), sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an [naw@din.de](mailto:naw@din.de) möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter [www.din.de/stellungnahme](http://www.din.de/stellungnahme) oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter [www.dke.de/stellungnahme](http://www.dke.de/stellungnahme) abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin (Hausanschrift: 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 38 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

## Nationales Vorwort

Der Text von ISO 14189:2013 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als FprEN ISO 14189:2016 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 DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Das Ausgabedatum des Europäischen Norm-Entwurfs stand zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses DIN-EN-ISO-Entwurfs noch nicht fest; der prEN ISO wird jedoch vom CCMC unter der angegebenen prEN-Nummer demnächst zur CEN-Umfrage verteilt. Um der deutschen Öffentlichkeit eine möglichst lange Einspruchsfrist einzuräumen, wurde dieser Norm-Entwurf bereits vorab veröffentlicht.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der FprEN ISO 14189 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Zählung von *Clostridium perfringens* - Verfahren mittels Membranfiltration

### Verfahren DIN EN ISO 14189

#### Für die Anwendung wird folgender Hinweis gegeben:

Der 4. Absatz des normativen Anhangs A.3 **Reagenz für saure Phosphatase** weicht von der Originalliteratur ab [1]. Danach sollte die Pufferlösung wie folgt hergestellt werden.

„Die Acetattpufferlösung durch Lösen von 0,3 ml Eisessig (CAS-Nr.: 64-19-7) und 0,4 g Natriumacetat (CAS-Nr.: 127-09-3) in deionisiertem Wasser und Auffüllen auf **100 ml** herstellen. Alternativ ein handelsübliches Produkt verwenden.“

Das Reagenz für saure Phosphatase beinhaltet eine giftige und Krebs erzeugende Komponente (Echtblausalz B), ist aufwändig in der Herstellung und verfügt über eine geringe Haltbarkeit. Daher wird auf Empfehlung des NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ auf eine alternative Nachweisreaktion der sauren Phosphatase hingewiesen. Diese beinhaltet anaerobes Subkultivieren der zu überprüfenden Kolonien über Nacht auf m-CP-Agar bei  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  und anschließendes Bedampfen mit Ammoniumhydroxid über eine Dauer von 20 s bis 30 s. Eine Rosa- bis Rot-Färbung zunächst dunkelgelber Kolonien gilt als bestätigter Nachweis der sauren Phosphatase.

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

|                 |       |                       |
|-----------------|-------|-----------------------|
| ISO 3696        | siehe | DIN ISO 3696          |
| ISO 5725-2      | siehe | DIN ISO 5725-2        |
| ISO 8199        | siehe | DIN EN ISO 8199       |
| ISO 19458       | siehe | DIN EN ISO 19458      |
| ISO/TS 11133-1  | siehe | DIN V ENV ISO 11133-1 |
| ISO/TR 13843    | siehe | DIN V ENV ISO 13843   |
| ISO/IEC Guide 2 | siehe | DIN EN 45020          |

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 – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Zählung von *Clostridium perfringens* - Verfahren mittels Membranfiltration.

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.

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

- [1] The Microbiology of Drinking Water (2010) – Part 6 - Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and *Clostridium perfringens* by membrane filtration, Standing Committee of Analysts, Environment Agency (UK), [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/316777/MoDW-6-230-apr15.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316777/MoDW-6-230-apr15.pdf).

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

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

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

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

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

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

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*

## **Wasserbeschaffenheit — Zählung von *Clostridium perfringens* — Verfahren mittels Membranfiltration (ISO 14189:2013)**

*Qualité de l'eau — Dénombrement de Clostridium perfringens — Méthode de filtration sur membrane (ISO 14189:2013)*

*Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens — Method using membrane filtration (ISO 14189:2013)*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm  
Dokument-Untertyp:  
Dokument-Stage: Einstufiges Annahmeverfahren  
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.7g

## Inhalt

|                                                                                                                                                                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort .....                                                                                                                                                                          | 3     |
| Vorwort .....                                                                                                                                                                                       | 4     |
| Einleitung .....                                                                                                                                                                                    | 5     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                                                                                                                                           | 6     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                                                                                                                                                      | 6     |
| 3 Begriffe .....                                                                                                                                                                                    | 6     |
| 4 Grundlage des Verfahrens .....                                                                                                                                                                    | 7     |
| 5 Geräte und Glasgeräte .....                                                                                                                                                                       | 7     |
| 6 Kulturmedien und Reagenzien .....                                                                                                                                                                 | 8     |
| 7 Probenahme .....                                                                                                                                                                                  | 8     |
| 8 Durchführung .....                                                                                                                                                                                | 8     |
| 8.1 Transport und Lagerung der Probe .....                                                                                                                                                          | 8     |
| 8.2 Hitzevorbehandlung zur Auswahl von Sporen .....                                                                                                                                                 | 8     |
| 8.3 Probenverdünnung .....                                                                                                                                                                          | 9     |
| 8.4 Filtration .....                                                                                                                                                                                | 9     |
| 8.5 Bebrütung und Untersuchung .....                                                                                                                                                                | 9     |
| 8.6 Bestätigung von <i>Clostridium perfringens</i> .....                                                                                                                                            | 10    |
| 8.6.1 Allgemeines .....                                                                                                                                                                             | 10    |
| 8.6.2 Test auf saure Phosphatase .....                                                                                                                                                              | 10    |
| 8.6.3 Auswertung .....                                                                                                                                                                              | 10    |
| 9 Angabe der Ergebnisse .....                                                                                                                                                                       | 10    |
| 10 Analysenbericht .....                                                                                                                                                                            | 10    |
| 11 Qualitätssicherung .....                                                                                                                                                                         | 11    |
| Anhang A (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien und Reagenzien .....                                                                                                           | 12    |
| A.1 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar), Literaturhinweise [6], [11], [12] .....                                                                                                             | 12    |
| A.1.1 Grundmedium .....                                                                                                                                                                             | 12    |
| A.1.2 D-Cycloserin-Lösung .....                                                                                                                                                                     | 12    |
| A.1.3 Vollständiges Medium .....                                                                                                                                                                    | 12    |
| A.2 Blutagar .....                                                                                                                                                                                  | 13    |
| A.3 Reagenz für saure Phosphatase .....                                                                                                                                                             | 13    |
| Anhang B (informativ) Verfahrenskennndaten .....                                                                                                                                                    | 14    |
| B.1 Verfahrenskennndaten des Standardverfahrens .....                                                                                                                                               | 14    |
| B.2 Statistisches Verfahren, angewendet zur Bestimmung der Präzisionsparameter des<br>Ringversuchs — Verschachtelte zufällige Effekte in der Datenanalyse: Zweifache<br>(bifaktorielle) ANOVA ..... | 16    |
| Literaturhinweise .....                                                                                                                                                                             | 18    |

## Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 14189:2013 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als FprEN ISO 14189:2016 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zum einstufigen Annahmeverfahren vorgelegt.

### Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 14189:2013 wurde vom CEN als FprEN ISO 14189:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe [www.iso.org/directives](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 empfangenen Patenterklärungen (siehe [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents)).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 147 „*Water quality*“, Subkomitee SC4, *Microbiological methods*.

## Einleitung

*Clostridium perfringens* ist allgemein als aussagekräftiger Indikator für fäkale Verunreinigungen anerkannt. Diese Gram-positiven Bakterien bilden im Darmtrakt von Tieren und Menschen Sporen, die im Vergleich zu vegetativen Zellen hitzeresistent sind. *C. perfringens* kommt im Darm sowohl in Form von Sporen als auch von vegetativen Zellen vor, Sporen sind außerdem in Umweltproben zu finden. Die Sporen von *C. perfringens* überleben monatelang im Wasser, viel länger als vegetative Fäkalbakterien, die als Indikator dienen, und folglich kann ihr Vorhandensein ein Hinweis auf zurückliegende oder zeitweise fäkale Verunreinigungen sein. Die Überwachung von *C. perfringens* hat sich bei der Beurteilung der Beschaffenheit von Wasserressourcen und zur Überprüfung der Stufen der Wasseraufbereitung zur Bewertung der Leistung der Aufbereitungsanlage bewährt. Die Sporen werden nicht immer durch routinemäßige Desinfektionsverfahren (z. B. Chlorung) inaktiviert.

**WARNUNG** — Anwender dieses Dokuments 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 Arbeitsgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

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

## 1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Zählung von vegetativen Zellen und Sporen von *Clostridium perfringens* mittels Membranfiltration in Proben von Wasser fest, das für den menschlichen Gebrauch bestimmt ist. Das Verfahren kann jedoch auf alle Arten von Wasserproben angewendet werden, vorausgesetzt, sie enthalten kein partikuläres oder kolloides Material, das die Filtration stört.

## 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 guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO/TS 11133-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*

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

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

## 3 Begriffe

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

**3.1**  
**verdächtige *Clostridium perfringens***  
Bakterien, die auf Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar nach einer anaeroben Bebrütung bei  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  für  $(21 \pm 3)$  h alle Schattierungen von schwarzen oder grauen bis gelb-braunen Kolonien bilden, selbst wenn die Färbung schwach ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Gegensatz zu Kolonien, die direkt auf dem Agarmedium wachsen, weisen Kolonien auf der Membran nicht immer eine deutliche Schwarzfärbung auf, so dass schwach gefärbte Kolonien in die Zählung einbezogen werden.

**3.2**  
**bestätigte *Clostridium perfringens***  
Bakterien, die auf Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar charakteristische Kolonien bilden und das Enzym saure Phosphatase besitzen

## 4 Grundlage des Verfahrens

Die Probe oder eine Verdünnung davon wird durch ein Membranfilter mit einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  filtriert, die ausreichend ist, um Sporen von Clostridien zurückzuhalten. Die Membran wird auf einem Selektiv-/Differenzierungsagar (Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar) anaerob  $(21 \pm 3)\ \text{h}$  bei  $(44 \pm 1)\ ^\circ\text{C}$  bebrütet. *C. perfringens* bildet bedingt durch die Reduktion von Sulfit zu Sulfid, das mit Eisen(III)-salz im Medium reagiert, üblicherweise schwarze oder graue bis gelb-braune Kolonien. Charakteristische Kolonien werden gezählt und die Bestätigungsprüfung wird durchgeführt. Das Ergebnis wird als Koloniezahl je Probenvolumen berechnet. Wenn nur die Sporenzahl erforderlich ist, wird die Probe zuerst bei  $(60 \pm 2)\ ^\circ\text{C}$  vorerhitzt, um die vegetativen Bakterien zu inaktivieren.

ANMERKUNG 1 Das Medium enthält Cycloserin als einen selektiven Wirkstoff zur Hemmung von *Bacillus*-Arten.

ANMERKUNG 2 Eine Bebrütung bei  $44\ ^\circ\text{C}$  erhöht die Selektivität der Prüfung in Bezug auf *C. perfringens*.

## 5 Geräte und Glasgeräte

Mit Ausnahme von Glas- oder Kunststoffgeräten zum Einmalgebrauch, die steril geliefert werden, Glasgeräte nach ISO 8199 sterilisieren.

Übliche Ausrüstung für mikrobiologische Laboratorien und insbesondere Folgendes:

**5.1 Gerät zur Membranfiltration**, wie in ISO 8199 festgelegt.

**5.2 Sterile Filtrationsaufsätze.**

Filtrationsaufsätze verwenden, die entweder steril geliefert oder nach ISO 8199 sterilisiert wurden. Alternativ ist Abflammen von aus Metall hergestellten Filtrationsaufsätzen vor deren Gebrauch erlaubt.

ANMERKUNG Für dieses Verfahren ist es nicht ausreichend, die Filtrationsaufsätze durch Kochen zu desinfizieren.

**5.3 Sterile Membranfilter**, nominale Porengröße  $0,45\ \mu\text{m}$ .

Die Qualität von Membranfiltern kann sich von Marke zu Marke oder sogar von Charge zu Charge unterscheiden. Es ist deshalb ratsam, die Qualität regelmäßig zu überprüfen.

**5.4 Brutschrank**, einstellbar auf  $(36 \pm 2)\ ^\circ\text{C}$  und  $(44 \pm 1)\ ^\circ\text{C}$ .

**5.5 Wasserbad (wahlweise)**, einstellbar auf  $(60 \pm 2)\ ^\circ\text{C}$  und ausgestattet mit einer Umwälzvorrichtung.

**5.6 Autoklav**, einstellbar auf  $(121 \pm 3)\ ^\circ\text{C}$ .

**5.7 Sterile Pinzetten.**

**5.8 Anaerobiertöpfe** oder ähnliche Geräte.

**5.9 System zur Erzeugung von anaerobem Gas**, um eine Atmosphäre aus etwa 90 % Wasserstoff und 10 % Kohlenstoffdioxid herzustellen.

## 6 Kulturmedien und Reagenzien

### 6.1 Grundstoffe

Für die Einheitlichkeit der Ergebnisse bei der Herstellung von Medien, Bestandteile von gleichbleibender Qualität und Chemikalien von anerkannter analytischer Qualität verwenden. Für die Zubereitung von Kulturmedien in einer Glasapparatur destilliertes oder deionisiertes Wasser vergleichbarer Reinheit verwenden, das der Qualität 3 nach ISO 3696 [1] entspricht.

Alternativ im Handel erhältliche fertige Trockenmedien und Reagenzien verwenden, die nach Anweisungen des Herstellers zuzubereiten und zu verwenden sind.

Andere Reinheitsgrade von Chemikalien dürfen verwendet werden, vorausgesetzt, sie führen nachweislich zu den gleichen Ergebnissen.

### 6.2 Kulturmedien

Siehe [Anhang A](#).

#### 6.2.1 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar), Literaturhinweise [6], [11], [12]

Siehe [A.1](#).

#### 6.2.2 Blutagar oder Columbia-Agar (Basis) oder ein anderer geeigneter nährstoffreicher Agar

Siehe [A.2](#).

#### 6.2.2 Reagenz für saure Phosphatase

Siehe [A.3](#).

## 7 Probenahme

Die Probenahme nach ISO 19458 durchführen.

## 8 Durchführung

### 8.1 Transport und Lagerung der Probe

Die Untersuchung möglichst bald nach der Entnahme der Probe beginnen, vorzugsweise am selben Arbeitstag. Die Proben sollten während des Transports idealerweise bei  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  gekühlt werden. Die empfohlene Höchstlagerungsdauer der Probe einschließlich Transport beträgt bei vegetativen Bakterien 12 h und bei Sporen 24 h. Die Lagerungsdauer der Probe einschließlich Transport darf bei vegetativen Bakterien 18 h und bei Sporen 72 h nicht überschreiten.

### 8.2 Hitzevorbehandlung zur Auswahl von Sporen

Wenn nur die Zählung der Sporen beabsichtigt wird, die Probe gut mischen und anschließend in einem Wasserbad  $(15 \pm 1)$  min auf  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$  erhitzen. Das erhitzte Volumen sollte größer sein als das zu analysierende Volumen. Die Temperatur sollte überwacht werden, indem ein geeignetes Thermometer in einer Referenzflasche der gleichen Größe wie die Probenflasche und mit dem gleichen Volumen an Wasser bei der gleichen Ausgangstemperatur wie die zu behandelnde Probe verwendet wird. Die benötigte Zeit zum Erreichen von  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$  darf 15 min nicht überschreiten und kann auf ein Mindestmaß verringert werden, indem sichergestellt wird, dass das Wasser im Wasserbad umgewälzt wird, um den maximalen Wärmeaustausch sicherzustellen.