

DIN EN ISO 8199

ICS 07.100.20

Einsprüche bis 2018-01-24
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 8199:2008-01

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Allgemeine Anforderungen und Anleitung für mikrobiologische
Untersuchungen mittels Kulturverfahren (ISO/DIS 8199:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 8199:2017**

Water quality –
General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
(ISO/DIS 8199:2017);
German and English version prEN ISO 8199:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-11-24 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 naw@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 Wasserwesen (NAW), 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 135 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 8199:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung (CEN/TC 230, ISO/TC 147)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

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.

Bezeichnung des Verfahrens:

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

Verfahren DIN EN ISO 8199 — K 20

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

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

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

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) nach § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (Wasserhaushaltsgesetz — WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer“ relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG als Loseblattsammlung „Analysenverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ (Ergänzungsbände) von der Beuth Verlag GmbH herausgegeben worden.

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in den Reihen DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN EN-, DIN EN ISO- und DIN ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., Telefon 030 2601-2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

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

ISO 3534-1:2009	siehe	DIN ISO 3534-1:2009-09
ISO 3696:1987	siehe	DIN ISO 3696:1991-06
ISO 5667-1:2006	siehe	DIN EN ISO 5667-1:2007-04
ISO 5667-3:2012	siehe	DIN EN ISO 5667-3:2013-03
ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 6107-2:2006	siehe	DIN ISO 6107-2:2017-11
ISO 6107-6:2004	siehe	DIN ISO 6107-6:2017-11
ISO 6107-8:1993	siehe	DIN ISO 6107-8:2017-11
ISO 6887-1	siehe	DIN EN ISO 6887-1
ISO 7218:2007	siehe	DIN EN ISO 7218:2014-09
ISO 7899-1:1998	siehe	DIN EN ISO 7899-1:1999-07
ISO 9308-2:2012	siehe	DIN EN ISO 9308-2:2014-06
ISO 9308-3:1998	siehe	DIN EN ISO 9308-3:1999-07
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 13843:2017	siehe	DIN EN ISO 13843:2016-05
ISO 16140-1:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 17994:2014	siehe	DIN EN ISO 17994:2014-06
ISO 18593:2004	siehe	DIN ISO 18593:2009-12
ISO 19458:2006	siehe	DIN EN ISO 19458:2006-12
ISO/IEC 17025:2005	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025:2005-08
ISO/TS 22117:2010	siehe	DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215:2011-03

Änderungen

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

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

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

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

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

Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium (L 19).

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

DIN ISO 3534-1:2009-09, *Statistik - Begriffe und Formelzeichen — Teil 1: Wahrscheinlichkeit und allgemeine statistische Begriffe (ISO 3534-1:2006)*

DIN ISO 3696:1991-06, *Wasser für analytische Zwecke; Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987*

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

DIN ISO 6107-2:2015-12, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 2 (ISO 6107-2:2006 + AMD 1:2012)*

DIN ISO 6107-6:2017-11, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 6 (ISO 6107-6:2004)*

DIN ISO 6107-8:2017-11, *Wasserbeschaffenheit — Wörterbuch — Teil 8 (ISO 6107-6:1993 + AMD 1:2001)*

DIN ISO 18593:2009-12, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen mittels Abklatschplatten und Tupfer (ISO 18593:2004)*

DIN EN ISO 5667-1:2007-04, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 1: Anleitung zur Erstellung von Probenahmeprogrammen und Probenahmetechniken (ISO 5667-1:2006); Deutsche Fassung EN ISO 5667-1:2006*

DIN EN ISO 5667-3:2013-03, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 3: Konservierung und Handhabung von Wasserproben (ISO 5667-3:2012); Deutsche Fassung EN ISO 5667-3:2012*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

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

DIN EN ISO 7899-1:1999-07, *Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser — Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 7899-1:1998); Deutsche Fassung EN ISO 7899-1:1998*

DIN EN ISO 9308-2:2014-06, *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*

DIN EN ISO 9308-3:1999-07, *Wasserbeschaffenheit — Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien — Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren) (ISO 9308-3:1998); Deutsche Fassung EN ISO 9308-3:1998*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 13843:2016-05, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren (ISO/DIS 13843:2016); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13843:2016*

DIN EN ISO 16140-1:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Validierung — Teil 1: Terminologie (ISO 16140-1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-1:2016*

DIN EN ISO 17994:2014-06, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen für den Vergleich der relativen Wiederfindung von Mikroorganismen durch zwei quantitative Verfahren (ISO 17994:2014); Deutsche Fassung EN ISO 17994:2014*

DIN EN ISO 19458:2006-12, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 19458:2006); Deutsche Fassung EN ISO 19458:2006*

DIN EN ISO/IEC 17025:2005-08, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2005); Deutsche und Englische Fassung EN ISO/IEC 17025:2005*

DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215:2011-03, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Spezielle Anforderungen und Anleitungen an die Eignungsprüfung durch Ringversuche (ISO/TS 22117:2010); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 22117:2010*

— Leerseite —

**Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anforderungen und Anleitung für
mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren
(ISO/DIS 8199:2017)**

*Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
(ISO/DIS 8199:2017)*

ICS: 07.100.20

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8l

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
5 Allgemeine Messanforderungen	10
5.1 Einheitlichkeit von Temperaturen	10
5.2 Inkubationszeiten	10
5.3 Volumina und Massen	10
6 Verdünnungslösungen und Nährmedien	10
6.1 Allgemeines	10
6.2 Qualitätsanforderungen an Bestandteile	11
6.3 Verdünnungslösungen	11
7 Sterilisation und Dekontamination	11
7.1 Allgemeine Geräte und Glasbehälter	11
7.2 Sterilisation von Verbrauchsmaterialien	11
7.3 Dekontamination von Glasgeräten und Materialien nach der Verwendung	11
7.4 Abfallentsorgung	12
8 Proben und Probehandhabung	12
8.1 Probenahme	12
8.2 Probenherstellung	13
8.2.1 Wässer und andere wässrige Matrices	13
8.2.2 Tupfer	13
9 (Quantitative) Zählverfahren	14
9.1 Zählung nach Beimpfen einer Teilprobe in (oder auf) festem Medium	14
9.1.1 Plattengussverfahren	15
9.1.2 Ausplattierungsverfahren	16
9.1.3 Membranfiltrationsverfahren	17
9.1.4 Inkubation	19
9.1.5 Zählung und Bestätigung von festen Nährmedien	19
9.1.6 Allgemeine Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse	20
9.1.7 Angabe der Ergebnisse	22
9.2 Zählung unter Einsatz eines flüssigen Mediums	31
9.2.1 Durchführung	31
9.2.2 Wahl des Beimpfungssystems	32
9.2.3 Inkubation	33
9.2.4 Auswertung der Ergebnisse	33
9.2.5 Bestimmung von MPN-Werten	34
10 Nachweisverfahren (qualitatives Verfahren)	38
10.1 Durchführung	38

10.2	Unsicherheit der Ermittlungsergebnisse	39
11	Leistungsmerkmale der Verfahren.....	39
12	Analytische Qualitätskontrolle	40
12.1	Interne Qualitätskontrolle.....	40
12.1.1	Kontrollstämme für das Verfahren.....	40
12.2	Externe Qualitätssicherung	42
Anhang A (informativ) Kriterien für die Auswahl eines Zählverfahrens		43
A.1	Einleitung	43
A.2	Faktoren, die die Qualität des Ergebnisses betreffen	43
A.2.1	Allgemeines	43
A.2.2	Unsicherheit von Ermittlungsergebnissen	43
A.2.3	Genauigkeit.....	43
A.2.4	Nachweisgrenze	46
A.2.5	Einflüsse von Membranfilter-Art und -Chargen.....	46
A.3	Anforderungen zur Probenbeschaffenheit	47
A.3.1	Art der Mikroorganismen	47
A.3.2	Bestandteile von Wasserproben.....	47
Anhang B (informativ) Vertrauensintervalle für Koloniezählverfahren und Wahl des Berechnungsverfahrens in Sonderfällen		48
B.1	Vertrauensintervalle für Koloniezählverfahren.....	48
B.2	Wahl des Berechnungsverfahrens in Sonderfällen mit einer Platte je Verdünnung	50
B.2.1	Sonderfälle	50
B.2.2	Sonderfälle bei geringen Keimzahlen.....	51
Anhang C (normativ) Zählung und Berechnungen bei zwei Petrischalen je Verdünnung		52
C.1	Zählung der Kolonien	52
C.2	Berechnungsverfahren: allgemeiner Fall (Zählung der Gesamtkolonien oder Zielkolonien).....	53
C.3	Berechnungsverfahren: Fall nach Keimbestätigung	54
C.4	Berechnungsverfahren: geschätzte Keimzahlen	55
C.4.1	Fall von zwei Platten (Testgut, Erstverdünnung oder erste Verdünnungsstufe), die weniger als 10 Kolonien enthalten	55
C.4.2	Fall von zwei Platten (Testgut, Erstverdünnung oder erste Verdünnungsstufe), die keine Kolonien enthalten	55
C.5	Sonderfälle (Auszählung von Zielkolonien oder mutmaßlich verdächtigen Kolonien)	56
C.6	Berechnungsverfahren: Sonderfälle	56
Anhang D (normativ) Zusammensetzung, Vorbereitung/Herstellung und Leistungsprüfung von Verdünnungslösungen		59
D.1	Salzlösung.....	59
D.2	Peptonlösung	59
D.3	Pepton-Salz-Lösung	59
D.3.1	Herstellung	60
D.4	Ringers-Lösung, Viertel-Stärke	60
D.5	Phosphatgepufferte Salzlösung.....	60
D.5.1	Phosphat-Lösung	60
D.5.2	Magnesiumchlorid-Lösung	60
D.5.3	Phosphatgepufferte Salzlösung.....	61
D.5.4	Sterilisation und Lagerung.....	61
D.5.5	Leistungsprüfung.....	61
Literaturhinweise.....		62

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 8199:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 8199:2007 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 8199:2017 wurde von CEN als prEN ISO 8199:2017 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).

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).

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 Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

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

Diese dritte Ausgabe ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 8199:2005), die technisch überarbeitet wurde.

Einleitung

Techniken zum Nachweis und zur Zählung von Mikroorganismen, die auf deren Fähigkeit, auf oder in einem bestimmten Nährmedium zu wachsen, beruhen, sind ein wichtiges und weit verbreitetes Verfahren zur Beurteilung der mikrobiologischen Wasserbeschaffenheit. Anliegen dieses Dokuments ist es, die gleichartigen Informationen zu den verschiedenen Verfahren in einem einzigen Dokument zusammenzutragen. Dies verringert eine Wiederholung von technischen Details in einzelnen Normen und erleichtert die Wahl des am besten geeigneten Verfahrens für eine bestimmte Sachlage. Zu allgemeinen Themen, die für diese Verfahren relevant sind, z. B. analytische Qualitätskontrolle, Leistungsmerkmale der Verfahren und Unsicherheit der Ermittlungsergebnisse, wurden weitere Anleitungen aufgenommen.

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 Anwenders, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument enthält Anforderungen und eine Anleitung zu Arbeitsweisen, die, sofern in der spezifischen Norm nicht anderweitig gefordert, für jedes Kulturverfahren für die mikrobiologische Untersuchung von Wasser, besonders für die Aufbereitung von Proben, Nährmedien sowie allgemeinen Geräten und Glasgeräten üblich sind. Dieses Dokument beschreibt die unterschiedlichen verfügbaren Kulturverfahren zum Nachweis und zur Zählung sowie die Kriterien für die Auswahl des jeweilig geeigneten Verfahrens. Dieses Dokument ist hauptsächlich für Untersuchungen auf Bakterien, Hefen und Pilze bestimmt, aber einige Aspekte sind auch auf Bakteriophagen, Viren und Parasiten anwendbar. Verfahren, die nicht auf der Kultivierung von Mikroorganismen beruhen, z. B. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sind vom Anwendungsbereich ausgeschlossen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 7704, *Water quality — Requirements for evaluation of membrane filters used for microbiological testing*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

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

3.1

Genauigkeit

Grad der Übereinstimmung zwischen einem Testergebnis und einem akzeptierten Referenzwert

[QUELLE: ISO 6107-8:1993, 1 [8], modifiziert — ANMERKUNG 2 gestrichen]

3.2

systematische Abweichungskomponente

Differenz zwischen dem Erwartungswert der Ermittlungsergebnisse und einem anerkannten Bezugswert

[QUELLE: ISO 5725-1:1994, 3.8 [5]]

3.3

bestätigte Zählung

Zählung, die durch weiteres Prüfen der angenommenen Objekte bezüglich nicht bestätigter, angenommener Zählungen korrigiert wurde

3.4

Zählung

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

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 22 [7]]

3.5

Nachweisgrenze

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

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.10 [14], modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff gestrichen]

3.6

laborinterne Vergleichpräzision (Vergleichpräzision unter Zwischenbedingungen)

Grad der Übereinstimmung zwischen Ermittlungsergebnissen, die im selben Laboratorium von verschiedenen Prüfern mit demselben Verfahren an verschiedenen Versuchsmaterialien mit unterschiedlichen Geräten erhalten werden

3.7

Bestimmungsgrenze

niedrigste durchschnittliche Partikelkonzentration je Untersuchungsvolumen, bei der die erwartete Standardunsicherheit einem festgelegten Wert (relative Standardabweichung) entspricht

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.17 [14]]

3.8

Präzision

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

[QUELLE: ISO 5725-1:1994, 3.12 [5]]

3.9

Verdachtzählung

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

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 62 [7]]

3.10

relative Standardabweichung

Schätzung der Standardabweichung s einer Population aus einer Stichprobe von n Ergebnissen dividiert durch das arithmetische Mittel $\bar{x}$ dieser Probe

[QUELLE: ISO 13843:2017, 3.30 [14], modifiziert — „ s “ und „ $\bar{x}$ “ ergänzt]

3.11

Wiederholpräzision

Grad der Übereinstimmung zwischen voneinander unabhängigen Ermittlungsergebnissen, die mit demselben Verfahren an identischem Versuchsmaterial im selben Laboratorium vom gleichen Prüfer mit denselben Geräten innerhalb kurzer Zeit erhalten werden

3.12

Vergleichpräzision

Grad der Übereinstimmung zwischen Ermittlungsergebnissen, die mit demselben Verfahren an identischem Versuchsmaterial in verschiedenen Laboratorien von verschiedenen Prüfern mit unterschiedlichen Geräten erhalten werden

3.13

Teilprobe

Analysenteilvolumen

Prüfmenge

festgelegte Menge der Probe, die zur Analyse genommen wird, z. B. 0,1 ml, 1 ml, 100 ml der Probe

3.14

Testgut

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

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 92 [7]]

3.15

Richtigkeit

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Maß für die Richtigkeit ist normalerweise der Bias.

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

3.16

Unsicherheit (der Zählung)

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

[QUELLE: ISO 6107-6:2004, 103 [7]]

4 Kurzbeschreibung

Das hier beschriebene Verfahren beruht auf der Impfung einer bekannten Teilprobe der Wasserprobe oder eines nach Membranfiltration oder Zentrifugieren erhaltenen Testguts auf oder in ein Nährmedium (fest oder flüssig). Es wird angenommen, dass sich während der Inkubation jeder vorhandene Ziel-Mikroorganismus vermehrt, so dass entweder eine Kolonie auf oder in festem Nährboden zu sehen ist oder sichtbare Veränderungen des flüssigen Nährmediums zu beobachten sind. Die Auswahl eines bestimmten Kulturverfahrens hängt nicht nur von der Art und Anzahl der gesuchten Mikroorganismen, sondern auch von der Beschaffenheit des untersuchten Wassers und der Fragestellung ab.

5 Allgemeine Messanforderungen

5.1 Einheitlichkeit von Temperaturen

Die folgenden Temperaturbereiche und Zeitspannen für die Inkubation und Lagerung sind akzeptabel, vorausgesetzt, sie sind für den Zielorganismus angemessen und in der einschlägigen Norm werden nicht andere Daten genannt.

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

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

Temperatur zum Temperieren von Medien: $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$

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

5.2 Inkubationszeiten

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

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

5.3 Volumina und Massen

Die Messgeräte müssen für die geforderte Genauigkeit und Präzision geeignet sein. Der akzeptierte Toleranzbereich jedes Messwerts ist $\pm 2 \%$, wenn der angegebene Wert für die Leistung des Verfahrens und die Prüfergebnisse kritisch ist, und $\pm 5 \%$, wenn sich der angegebene Wert als nicht kritisch erwiesen hat. Beispiele kritischer Werte, die eine direkte Auswirkung auf die Prüfergebnisse haben, sind Inokulum- und Verdünnungsvolumina, wogegen die Masse der zum Herstellen der Medien verwendeten Bestandteile als nicht kritisch erachtet werden.

ANMERKUNG Kritische Toleranzen wurden mit 2 % festgelegt, um die Unsicherheit der Ermittlungsergebnisse zu minimieren.

6 Verdünnungslösungen und Nährmedien

6.1 Allgemeines

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

Zur Vorbereitung mikrobiologischer Nährmedien werden, sofern nicht anderweitig angegeben, die Bestandteile zum Volumen des Wassers gegeben, anstatt die Bestandteile auf ein bestimmtes Volumen aufzufüllen.

Vor der Verwendung wird die Qualität der Nährmedien, Verdünnungslösungen, Membranfilter und Reagenzien mit den folgenden, in ISO 11133 und ISO 7704 beschriebenen Verfahren oder nach der jeweiligen spezifischen Norm überprüft.

Bezüglich der Informationen zur Lagerung von Nährmedien siehe ISO 11133.

6.2 Qualitätsanforderungen an Bestandteile

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

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

6.3 Verdünnungslösungen

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

- Salzlösung;
- Peptonlösung;
- Pepton-Salz-Lösung (MRD);
- Ringers Lösung, Viertel-Stärke;
- phosphatgepufferte Salzlösung.

Bezüglich der Formulierung, Herstellung, Aufbewahrung und Leistungsprüfung dieser Verdünnungslösungen siehe Anhang D.

7 Sterilisation und Dekontamination

7.1 Allgemeine Geräte und Glasbehälter

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

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

Einige wärmeunbeständige Teile können eine anderweitige Sterilisation erfordern (z. B. mit UV-Licht oder Bestrahlung), die in Routinelaboratorien nicht durchgeführt wird.

7.2 Sterilisation von Verbrauchsmaterialien

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

Wenn die erhaltenen Membranfilter nicht steril sind, werden sie gewöhnlich durch feuchte Hitze nach dem vorstehend genannten Prozess b) oder entsprechend den Herstelleranweisungen sterilisiert.

7.3 Dekontamination von Glasgeräten und Materialien nach der Verwendung

Materialien zur Dekontamination und Entsorgung sollten in Behältern untergebracht werden, z. B. in autoklavierbaren Kunststoffbeuteln. Das Autoklavieren ist das Verfahren der Wahl für alle Dekontaminationsprozesse (mindestens 30 min bei $121 ^\circ\text{C}$). Die Beschickung des Autoklaven sollte so durchgeführt werden, dass das Eindringen von Wärme in die Beladung begünstigt wird (z. B. keine

Überladung). Darauf achten, dass Kappen/Deckel lose und Beutel geöffnet sind, um eine gefährliche Druckbeaufschlagung zu verhindern, die zu einem möglichen Bruch führen kann, z. B. Explosion von Gasflaschen.

Moderne Autoklaven erfordern möglicherweise kein Lösen der Kappen, jedoch sind die Herstelleranweisungen genau einzuhalten, um eine gefährliche Druckbeaufschlagung der Behälter zu vermeiden.

Alternative Verfahren für das Autoklavieren dürfen angewendet werden, wenn sie durch nationale Bestimmungen erlaubt sind.

Alle Geräte, die mit mikrobiologischen Kulturen (festen oder flüssigen Nährmedien) in Berührung gekommen sind, werden autoklaviert; dies schließt wiederverwendbare Behälter ein, bevor sie gereinigt werden.

Während der Untersuchung darf eine Dekontamination durch Eintauchen in frisch hergestellte und ordnungsgemäß verdünnte Desinfektionsmittellösung bei kleinen und korrosionsbeständigen Geräten (z. B. Pipetten) angewendet werden.

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

Die meisten Desinfektionsmittel haben bestimmte toxische Wirkungen. Beim Umgang mit Desinfektionsmitteln Handschuhe und Augenschutz tragen und die Herstelleranweisungen befolgen.

7.4 Abfallentsorgung

Die ordnungsgemäße Entsorgung wirkt sich nicht direkt auf die Qualität der Probenanalyse aus, ist aber eine Frage des guten Labormanagements.

Sie sollte den nationalen Umwelt- oder Arbeitsschutzbestimmungen entsprechen.

Ein System zur Erkennung und Trennung von Abfallmaterialien und deren Behältern sollte eingerichtet werden für:

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

Die Verbrennung kontaminierter Materialien und ihrer Inhaltsstoffe sollte entsprechend den nationalen Umwelt- oder Arbeitsschutzbestimmungen durchgeführt werden.

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

8 Proben und Probehandhabung

8.1 Probenahme

Proben nach ISO 19458 [20] nehmen. Desinfizierte Wasserproben in Probenflaschen füllen, die geeignete Neutralisationsmittel in ausreichender Menge enthalten.

8.2 Probenherstellung

8.2.1 Wässer und andere wässrige Matrices

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

Vor der Untersuchung einer Probe diese durch Schütteln gründlich mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu erreichen. Dies kann durch Umdrehen des Probenbehälters oder Hin- und-her-Bewegen des Probenbehälters erreicht werden. Anschließend abhängig von der Beschaffenheit des Wassers und der erwarteten mikrobiologischen Belastung eine geeignete Verdünnung herstellen.

Bei Plattenzählungen werden gewöhnlich zehnfache Verdünnungsschritte verwendet. Für Membranfiltrationsverfahren (mit einer kleineren Oberfläche) werden kleinere Verdünnungsschritte empfohlen. Bezüglich einer allgemeinen Anleitung zur Herstellung von Verdünnungsreihen siehe ISO 6887-1 [9].

Bei zehnfachen Verdünnungen werden neun Volumina des Verdünnungsmittels und ein Volumen der Wasserprobe aseptisch in sterile Flaschen oder Röhrchen überführt. Alternativ werden zuvor in Schraubflaschen sterilisierte Volumina des Verdünnungsmittels verwendet und die Volumina nach dem Autoklavieren nachgeprüft. Einen oder mehrere 10-fache Verdünnungsschritte durch Überführung von einem Wasserprobenvolumen in neun Volumenteile Verdünnungslösung herstellen. Die Lösung mithilfe einer sauberen Pipette oder mechanisch gründlich mischen und ein Volumenteil dieser Lösung zu weiteren neun Teilen der Verdünnungslösung geben. Diese Schritte werden so oft wie nötig wiederholt. Ausreichend große Volumina aller Verdünnungen für alle an jeder Wasserprobe durchzuführenden Untersuchungen herstellen.

Für Verdünnungen in anderen Größenordnungen die Volumina der Verdünnungslösung und die Volumina der Probe entsprechend anpassen. Zum Beispiel können Vierfach-Verdünnungsreihen hergestellt werden, wie vorstehend für Zehnfach-Verdünnungen beschrieben, nur dass in diesem Fall ein Volumen der Wasserprobe mit drei Volumina Verdünnungslösung gemischt wird. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung einer Zehnfach-Verdünnungsreihe, von der aber sowohl 10-ml- als auch 30-ml-Volumina filtriert werden.

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

8.2.2 Tupfer

Zur Beurteilung der Wasserbeschaffenheit, z. B. Untersuchung von Biofilmen, werden manchmal Tupfer verwendet, die sowohl in quantitativen als auch qualitativen Verfahren geprüft werden können.

Es gibt verschiedene, für bestimmte Zwecke vorgesehene Arten von Tupfern, einschließlich Stieltupfer und Schwammtupfer, mit oder ohne Neutralisationsmittel für jegliche vorhandenen Desinfektionsmittel. Wenn die Transportzeiten vor dem Prüfen wahrscheinlich länger sind, werden spezielle Transporttupfer empfohlen, die einen gewissen Schutz gegenüber vorhandenen Organismen bieten. Alle Tupferarten sollten vor der Verwendung bewertet werden, da einige gegenüber bestimmten Mikroorganismen erwiesenermaßen hemmend wirken. Eine weiterführende Anleitung zur Verwendung von Tupfern kann ISO 18593 [19] entnommen werden.

ANMERKUNG Trockene Stieltupfer sind für mikrobiologische Untersuchungen ungeeignet, da sie keinen Schutz gegen Dehydration oder Desinfektionsmittelrückstände für jegliche Mikroorganismen bieten, die während Transport und Lagerung vor dem Untersuchen vorhanden sind.

8.2.2.1 Stieltupfer-Vorbereitung

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

Transporttupfer in Agar werden vorsichtig aus der Verpackung genommen und in ein Volumen (gewöhnlich 10 ml) Verdünnungslösung getaucht.

Der Stiel wird anschließend abgebrochen oder abgeschnitten, um das gründliche Mischen in der verschlossenen Flasche oder im verschlossenen Röhrchen zu ermöglichen. Zur Optimierung der Wiederfindung jeglicher vorhandener Organismen wird entweder manuell oder anderweitig, z. B. mittels Vortexmischer, Schüttelmaschine oder Ultraschallbad, gemischt.

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

8.2.2.2 Schwammtupfer-Vorbereitung

Für die qualitative Untersuchung werden Schwammtupfer empfohlen, um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probe genommen wird und ein negatives Nachweisergebnis auf der größeren Probe zuverlässiger ist. Diese enthalten eine gewisse Menge Neutralisationsmittel, die ausreicht, jegliche während des Transports vorhandenen Organismen zu schützen, was ihren Gebrauch für quantitative Untersuchungen problematisch macht, es sei denn, diese Menge ist bekannt und kann in nachfolgende Berechnungen einbezogen werden.

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

9 (Quantitative) Zählverfahren

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

Eine Teilprobe der Wasserprobe oder jegliche hergestellte Verdünnung hiervon wird entweder direkt oder auf einem Membranfilter konzentriert so auf der Oberfläche eines bestimmten festen Nährmediums oder in einem verflüssigten Nährmedium beimpft, dass Mikroorganismen bei Inkubation auf oder in dem Nährmedium Kolonien bilden.

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

Für die Beimpfung von festen Nährmedien werden vorwiegend drei Verfahren angewendet, und die Wahl des Verfahrens hängt von mehreren Faktoren ab. Zu diesen gehören die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Wassers sowie die Art der gesuchten Mikroorganismen, ihre wahrscheinliche Konzentration, die effektive Wiederfindung von gestressten oder (subletal) geschädigten Mikroorganismen und die erforderliche Präzision und Sensitivität. Hinweise zu den in den einzelnen Verfahren einsetzbaren Volumina von Wasserproben sind in 9.1.1.1, 9.1.2.1 und 9.1.3.1 enthalten. Die Anforderungen der nationalen oder regionalen Bestimmungen können bei der Auswahl des Verfahrens eine Rolle spielen, indem z. B. eine bestimmte Präzision gefordert wird oder der Nachweis von An- oder Abwesenheit eines Organismus in einem bestimmten Untersuchungsvolumen als ausreichend gilt.

ANMERKUNG 1 Die Nachweisgrenzen und die Genauigkeit der verschiedenen Verfahren werden in Anhang A, A.2, behandelt.

ANMERKUNG 2 Die Art der Probe und untersuchten Organismen werden in Anhang A, A.3, behandelt.

9.1.1 Plattengussverfahren

Die Teilprobe wird mit zuvor verflüssigtem und auf eine Temperatur nahe dem Verfestigungspunkt, d. h. 44 °C bis 47 °C, abgekühltem (temperiertem) Nährmedium gemischt, damit die thermische Schädigung der Organismen minimiert wird. Nach der Inkubation werden alle Kolonien gezählt, die sich im Nährmedium oder auf dessen Oberfläche entwickelt haben.

9.1.1.1 Teilprobe

Das Volumen der Teilprobe oder einer Probenverdünnung kann in Abhängigkeit von der Größe der Petrischale und dem eingesetzten Volumen an Nährmedium zwischen 0,1 ml und 5 ml liegen. Die Verdünnung sollte so gewählt werden, dass die erwartete Anzahl an Zielkolonien je Platte mit einem Durchmesser von 90 mm zwischen 10 und 300 beträgt.

Die vertretbare Höchstanzahl an Zielkolonien auf einer Platte wird von dem jeweiligen Verfahren, der Koloniegröße, der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) und dem Vorhandensein von Nicht-Zielkolonien abhängen und kann auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Richtwert für die Kolonie-Höchstanzahl auf einer 90-mm-Platte (Ziel- und Nicht-Zielkolonien) wird üblicherweise 300 erachtet (siehe ISO 7218 [10]). Größere Schalen (z. B. 140 mm) erfordern getrennte Überlegungen (siehe 9.1.6.1).

9.1.1.2 Beimpfen

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

ANMERKUNG Wasserbäder enthalten wahrscheinlich Mikroflora, die eine Kontaminationsquelle für verflüssigte Medien darstellen kann. Regelmäßiges Austauschen des Wassers und Reinigen wird geraten, um dieses Risiko zu minimieren.

Erforderliche Petrischalen vorbereiten und mit Probe oder anderen Einzelheiten beschriften. Alle notwendigen Verdünnungen nach 8.2.1 herstellen. Die Teilproben nach gründlichem Mischen in den Petrischalen verteilen.

Jedes Röhrchen oder jeden Kolben mit dem temperierten Medium nacheinander aus dem Wasserbad nehmen, die Außenseite vollständig abtrocknen und den Hals des Gefäßes abflammen. Das Medium ohne Verzögerung in jede Petrischale geben, um einen Hitzeschock bei der Teilprobe zu minimieren, und sorgfältig mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu erreichen. Üblicherweise werden (18 ± 2) ml Medium für eine Teilprobe von bis zu 1 ml in 90-mm-Petrischalen verwendet. Alternativ darf bei labortechnischem Nachweis der Eignung eine Mindestmenge von 10 ml Medium verwendet werden, wenn die Proben zur Inkubation in Beutel verpackt werden. Die Platten auf einer waagerechten Oberfläche abkühlen lassen, bis sich das Agar-Nährmedium verfestigt hat. Sobald das Agar-Nährmedium fest ist, die Platten nach 9.1.4 inkubieren.

Agar-Medienpräparatoren und zugehörige Gieß- und Schüttelsysteme können für Laboratorien, die eine große Anzahl an Proben untersuchen, nützlich sein (siehe ISO 7218 [10]).

9.1.2 Ausplattierungsverfahren

Die Teilprobe wird mit einem sterilen Arbeitsgerät über die trockene Oberfläche eines Agar-Nährmediums verteilt und die sich nach der Inkubation auf der Oberfläche entwickelten Kolonien werden gezählt.

9.1.2.1 Teilprobe

Für eine Petrischale mit 90-mm-Durchmesser sollte das Volumen der Teilprobe oder einer Probenverdünnung 0,1 ml bis höchstens 0,5 ml betragen. Die Verdünnung im Hinblick auf die bestmögliche Präzision so wählen, dass die erwartete Anzahl sich bildender Zielkolonien zwischen 10 und 300 liegt.

Die vertretbare Höchstanzahl an Zielkolonien auf einer Platte wird von dem jeweiligen Verfahren, der Koloniegröße, der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) und dem Vorhandensein von Nicht-Zielkolonien abhängen und kann auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Richtwert für die Kolonie-Höchstanzahl auf einer 90-mm-Platte (Ziel- und Nicht-Zielkolonien) wird üblicherweise 300 erachtet (siehe ISO 7218 [10]). Größere Schalen (z. B. 140 mm) erfordern getrennte Überlegungen (siehe 9.1.7).

Spiralplater nutzen kleinere Volumina und die Bestimmungsgrenze wird demzufolge erhöht. Bezüglich der Verwendung von Spiralplatern die Herstelleranweisungen befolgen. Spiralplater sind für Pilze möglicherweise ungeeignet.

9.1.2.2 Beimpfen

Erforderliche Platten mit jeweils (18 ± 2) ml Nährmedium für 90-mm-Petrischalen vorbereiten und mit Probe oder anderen Einzelheiten beschriften. Bei längeren Inkubationszeiten (z. B. längere Inkubationszeiten als die in 5.2 angegebenen Beispielinkubationszeiten) können größere Nährmedium-Volumina erforderlich sein. In diesem Fall siehe ISO 11133 bezüglich eines Leitfadens zu Nährmedium-Volumina. Die Oberfläche des Mediums vor der Verwendung, wenn notwendig, trocknen, wie nachfolgend beschrieben. Die Untersuchungsprobe auf die Oberfläche des Nährmediums pipettieren und mit einem sterilen Arbeitsgerät oder mechanischen Gerät, z. B. Spiralplater, unter Auslassung der Agar-Ränder auf der Oberfläche verteilen. Die Platten bis zur Absorption des Inokulums (Höchstdauer 15 min) auf dem Labortisch belassen und anschließend die Platten nach 9.1.4 inkubieren.

Für das Trocknen der Platten ist Folgendes von Bedeutung:

- Der Feuchtigkeitsgrad im Nährmedium ist wichtig, weil optimales Wachstum der Mikroorganismen von den Feuchtigkeitsverhältnissen in und auf dem Medium abhängt. Umfangreicher Verlust an Feuchtigkeit kann zum Beispiel zu einem Anstieg der Konzentration an Hemmstoffen in selektiven Nährmedien und zu einer Reduktion der Wasseraktivität an der Oberfläche des Nährmediums führen.
- Werden Bakterien kultiviert, die sich nicht schnell ausbreiten (schwärmen), und sehen die Platten nach Erreichen der Umgebungstemperatur trocken aus, so ist eine Trocknung nicht immer notwendig. In diesem Fall kann das Trocknen entfallen, da es nur die Gefahr einer Kontamination und eines unnötigen Flüssigkeitsverlusts erhöht.
- Temperatur und Dauer der Trocknung so wählen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination so gering wie möglich ist und übermäßige Erwärmung die Qualität des Nährmediums nicht vermindert. Die Trocknungszeit hängt von der Kondensationsmenge in der Petrischale ab und muss so kurz wie möglich gehalten werden.

Um luftgetragene Kontaminationen zu vermeiden, müssen die Platten möglichst mit der Oberfläche des Nährmediums nach unten getrocknet werden.

Ausreichend trockene Platten können gewöhnlich erhalten werden, indem sie mit halb geöffneten Deckeln in einem Brutschrank oder Trockenschrank bei Temperaturen zwischen 25 °C und 50 °C gestellt werden.

Die Platten so lange trocknen, bis die Tröpfchen von der Oberfläche der Deckel verschwunden sind, jedoch nicht länger. Agarplatten werden auch (in gleicher Anordnung wie oben beschrieben) in einer Laminar(strömungs)box bei Raumtemperatur 30 min bis 60 min oder auf dem offenen Labortisch getrocknet, jedoch können die Trockenzeiten länger sein. Die Lagerung der umgedrehten Platten bei angebrachtem Die Lagerung der umgedrehten Platten über Nacht mit geschlossenen Deckeln bei Raumtemperatur ist ebenfalls wirksam, wenn die Platten frisch gegossen wurden und sich in belüfteten Petrischalen befinden.

9.1.3 Membranfiltrationsverfahren

Die Teilprobe wird über ein Membranfilter filtriert, das die vorhandenen Mikroorganismen zurückhält. Das Filter wird anschließend auf die Oberfläche eines Agar Nährmediums gelegt. Während der Inkubation bilden sich Kolonien auf der Membranfilteroberfläche. Alternativ darf das Filter für bestimmte Mikroorganismen wie Anaerobier mit der Oberfläche nach unten in eine Petrischale oder auf eine dünne Schicht Agar gelegt und mit verflüssigtem Agarmedium überschichtet werden.

9.1.3.1 Teilprobe

Das maximale Volumen der Teilprobe hängt von der Filtrierbarkeit der Wasserprobe und den verwendeten Membranfiltern ab. Das Verfahren ist für Wässer geeignet, die wenig partikuläres oder kolloidales Material (z. B. Eisen) in Suspension enthalten, zum Beispiel Wasser, das zum Trinken vorgesehen ist. Es kann möglich sein, einige Liter eines derartigen Wassers zu filtrieren und somit ein hohes Maß an Untersuchungssensitivität zu erreichen.

Das untersuchte Volumen der Probe oder Verdünnung sollte so gewählt werden, dass die erwartete Anzahl der auf einem Membranfilter von 47 mm bis 50 mm Durchmesser gebildeten Kolonien zwischen 10 und 80 beträgt.

Die vertretbare Höchstanzahl an Zielkolonien auf einer Platte wird von dem jeweiligen Verfahren, der Koloniegröße, der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) und dem Vorhandensein von Nicht-Zielkolonien abhängen und kann auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Richtwert auf Grundlage der betrachteten Höchstanzahl von 300 Kolonien auf einer 90-mm-Platte würde ein Membranfilter mit einem Durchmesser von 47 mm beispielsweise einen maximalen Zählwert von 80 Kolonien (Ziel- und Nicht-Zielkolonien) ergeben, der sich auf die Vergleichsoberfläche bezieht.

9.1.3.2 Filtrationsanlage

Membranfilter mit einer mittleren Porengröße von 0,45 µm finden in der Wasser-Mikrobiologie breite Anwendung. Bei einigen Mikroorganismen kann die jeweilige spezifische Norm eine Filtration durch ein Membranfilter einer mittleren Porengröße von 0,2 µm fordern. Die Bewertung der verschiedenen Arten und Chargen vom Membranfiltern vor der Verwendung ist in ISO 7704 beschrieben.

Die Filtrationsanlage besteht gewöhnlich aus einem Filtrationsrohr mit Absperrhahn, Membranfilterträgern, Membranfiltrationsaufsätzen, einer Vakuumquelle und einem Gefäß zum Auffangen des filtrierten Wassers. Die Vakuumquelle sollte etwa 70 kPa haben. Ein zu starker Unterdruck kann die Leistung des Membranfilters beeinträchtigen. Die Membranfiltrationsaufsätze sollten eine sichtbare Skalenteilung haben, die für üblicherweise untersuchte Probenvolumina angemessen ist. Die Membranfiltrationsaufsätze sollten vor der Verwendung im Autoklaven sterilisiert werden, oder es dürfen sterile Aufsätze für den Einmalgebrauch als Alternative verwendet werden. Membranfiltrationsaufsätze dürfen, sofern angebracht, vor der Verwendung durch Sieden oder direktes Abflammen desinfiziert werden.

Wenn auf Sporenbildner untersucht wird (z. B. *Clostridium perfringens*) ist es möglich, dass die durch Desinfizieren in siedendem Wasser nicht alle Sporen entfernt werden. Es sollte ein getrennter steriler Filtrationsaufsatz verwendet werden. Alternativ dürfen andere Desinfektionsverfahren angewendet werden, wenn in der spezifischen Norm angegeben oder als akzeptabel verifiziert.

9.1.3.3 Filtration

Steriles Membranfilter mit der Gitternetzseite nach oben auf die poröse Scheibe der Filterhalterung legen, wobei darauf zu achten ist, nur den äußeren Rand der Filtermembran mit einer flachen, sterilen Pinzette zu greifen. Den sterilen Filtrationsaufsatz sicher auf der Filterhalterung befestigen. Eines der folgenden Volumen in den Filtrationsaufsatz (bei geschlossenem Ventil zum Unterdruckerzeuger) pipettieren oder gießen:

- a) ein bekanntes Volumen der Probe oder einer Verdünnung, sorgfältig gemischt (mindestens 10 ml);
- b) den Inhalt eines die Teilprobe enthaltenden Kolbens oder anderen Gefäßes und ausreichend Verdünnungslösung, um das Gesamtvolumen auf mindestens 10 ml zu bringen;
- c) mindestens 10 ml Verdünnungslösung zu der Teilprobe pipettieren und mit der Pipette mischen.

Das Ventil zum Unterdruckerzeuger öffnen und Unterdruck anlegen, um das Wasser durch das Membranfilter zu filtrieren. Das Ventil schließen, sobald die Probe filtriert ist. Es kann ratsam sein, den Filtrationsaufsatz durch die Filtration von ein- bis dreimal je 10 ml bis 30 ml einer sterilen Verdünnungslösung zu spülen, während das Filter noch in der Halterung liegt, um am Aufsatz haftende Organismen zu entfernen. In einigen Situationen darf auch Überdruck aufgebracht werden, z. B. beim Untersuchen auf *Legionella* spp.

9.1.3.4 Übertragen der Membran

Den Filtrationsaufsatz nach dem Schließen des Absperrhahn entfernen und das Membranfilter mit einer flachen, sterilen Pinzette in einer der folgenden Arten übertragen, dabei sicherstellen, dass keine Luftblasen zwischen Membranfilter und Nährmedium eingeschlossen sind.

- a) Gitternetzseite nach oben in ein Agarnährmedium in einer Petrischale;
- b) Gitternetzseite nach unten oder oben in eine Petrischale oder auf 5 ml bis 10 ml Agarnährmedium in einer 50-mm-Petrischale oder 90-mm-Petrischale (für Anaerobier); anschließend das Membranfilter so schnell wie möglich mit verflüssigtem Agarnährmedium ((45 ± 1) °C) überschichten, um das Austrocknen des Membranfilters und übermäßigen Luftkontakt zu vermeiden.

Für unterschiedliche Volumina derselben Probe darf der Filtrationsaufsatz ohne zwischenzeitliche Desinfektion verwendet werden, vorausgesetzt, dass das kleinste Volumen und/oder der am höchsten verdünnte Anteil zuerst filtriert wird bzw. werden. Um eine weitere Probe zu filtrieren, muss entweder eine weitere sterile Filteranlage verwendet oder, falls angemessen, der Filtrationsaufsatz z. B. durch direktes Abflammen oder Tauchen in ein Bad mit siedendem Wasser desinfiziert werden. Alternativ sollte die Anleitung des Herstellers zur Desinfektion befolgt werden.

9.1.3.5 Membranübertragungsverfahren mit flüssigen Medien oder Verdünnungslösungen

Als eine Alternative zur Agarplatte darf, sofern in der maßgeblichen Norm angegeben, das Membranfilter mit der Gitternetzseite nach oben auf ein steriles absorbierendes Trägermaterial, das mit einem flüssigen Nährmedium gesättigt wurde, oder auf ein mit dehydriertem Medium imprägniertes Trägermaterial, das mit sterilem Wasser rekonstituiert wurde, in einer Petrischale gegeben werden. Um konfluentes Wachstum zu vermeiden, sollte jegliche überschüssige Flüssigkeit abgegossen werden, möglichst vor dem Auflegen der Membran auf das Trägermaterial.

Bestimmte Verfahren wie MPN-Kulturverfahren und qualitative Verfahren können das direkte Übertragen des Membranfilters in ein Voranreicherungs- oder Anreicherungsbouillon erfordern.

Das Membranfilter darf auch als Teile eines Anreicherungssystems verwendet und mit Hilfe einer Verdünnungslösung gewaschen (eluiert) werden, um eine neue Teilprobe zu erhalten, die über die trockene Oberfläche eines Agarnährmediums verteilt wird (siehe 9.1.2) (z. B. Untersuchung auf *Legionella* spp. durch Membranfiltration mit Waschen). Das Membranfilter sollte direkt in die Verdünnungslösung überführt werden und anschließend entsprechend den Festlegungen in der maßgeblichen Norm eluiert und kultiviert werden.

9.1.4 Inkubation

Die beimpften Agarplatten umdrehen und entweder in einem Brutschrank oder in einem wasserdichten Behälter in einem Wasserbad inkubieren. Die Platten, wenn nötig, in Kunststoffbeutel oder andere Behälter packen, um das Austrocknen des Mediums zu vermeiden (z. B. wenn ein Umluftbrutschrank benutzt wird). Nicht mehr als 6 Petrischalen übereinander stapeln, um sicherzustellen, dass alle Platten schnell die Inkubationstemperatur erreichen, und dabei Raum zwischen den Stapeln für die Luftzirkulation lassen. Platten dürfen in speziell dafür ausgelegten Gestellen oder Gefäßen höher gestapelt werden, wenn ein Umluftbrutschrank benutzt wird und die richtigen Inkubationstemperaturen für die erforderlichen Zeiten verifiziert wurden.

Platten mit Membranfiltern auf adsorbierenden Unterlagen werden mit den Deckeln nach oben in einen luft- oder wasserdichten Behälter gegeben, um eine Austrocknung des Mediums möglichst zu verhindern. Platten für Organismen, die Sporen über der Agar-Oberfläche bilden (wie Schimmelpilze oder Aktinomyceten), dürfen auch nicht umgedreht werden.

Wenn eine anaerobe Inkubation erforderlich ist, sollten die beimpften Agarplatten in einen anaeroben Brutschrank oder ein luftdichtes anaerobes Gefäß, gegeben werden, das einen anaeroben Generator mit für das Gefäßvolumen geeigneter Größe enthält. Außerdem sollte im Gefäß oder Brutschrank auch ein geeignetes Mittel zur Feststellung des Erreichens anaerober Bedingungen enthalten sein.

Die Dauer und Temperatur der Inkubation entsprechend dem spezifischen Normverfahren wählen, da diese von den gesuchten Mikroorganismen oder Gruppen von Mikroorganismen abhängig sind.

Die Inkubation wird manchmal in zwei Schritten durchgeführt, um gestresste Organismen wiederzubeleben. Zuerst wird über eine variable Dauer, z. B. 2 h bis 4 h bei geringerer Temperatur (z. B. 25 °C bis 30 °C) vorinkubiert, gefolgt von einer längeren Inkubationszeit bei der für den gesuchten Organismus erforderlichen Temperatur. Der Wechsel kann entweder durch einen Wechsel des verwendeten Brutschrankes oder Wasserbades oder durch die Verwendung eines Gerätes, dessen Temperatur sich automatisch nach einer bestimmten Zeit ändert, vorgenommen werden. Alle Platten möglichst gleichzeitig in den Brutschrank oder das Wasserbad legen.

Membranfilter werden manchmal für eine begrenzte Zeit (z. B. 2 h oder 4 h) auf einem Wiederbelebensmedium inkubiert und anschließend zur weiteren Inkubation auf ein anderes, üblicherweise selektives Medium übertragen.

9.1.5 Zählung und Bestätigung von festen Nährmedien

9.1.5.1 Allgemeines

Platten oder Membranfilter möglichst unmittelbar nach der Inkubation entsprechend der spezifischen Norm begutachten. Wenn das nicht möglich ist, dürfen sie für eine kurze Zeit (bis zu 24 h) bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden, vorausgesetzt, dies beeinflusst nicht die Anzahl, Erscheinung oder eine anschließende Bestätigung der Kolonien. Die vertretbare Aufbewahrungsdauer muss für jedes Verfahren und jede Probenart verifiziert werden.

ANMERKUNG In einigen Fällen, in denen große (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) oder schwärmende Kolonien erwartet werden, kann es hilfreich sein, die Platten nach einer kürzeren Inkubationszeit zu untersuchen, solange einzelne Kolonien noch sichtbar sind, und anschließend die Inkubation vor dem abschließenden Zählen für die festgelegte Dauer fortzusetzen.

9.1.5.2 Zu zählende und zu bestätigende Kolonien

Für die Gesamtanzahl auf nichtselektivem Medium werden alle Kolonien gezählt. Auf selektivem oder differenzierendem Medium werden nur die Kolonien, die ein für den gesuchten Organismus typisches Aussehen haben, gezählt. Vergrößerungshilfen dürfen eingesetzt werden (sofern nicht anderweitig angegeben), wenn die Koloniegröße klein ist und/oder wenn es schwierig ist, zwischen Kolonien und Partikeln bzw. Nicht-Zielkolonien zu unterscheiden. In einigen Fällen kann es schwierig sein, die Kolonien zu zählen (z. B. wenn schwärmende Mikroorganismen vorliegen). Schwärmende Kolonien werden als einzelne Kolonien betrachtet. Wenn weniger als ein Viertel der Platte durch Ausschwärmen überwachsen ist, die Kolonien auf dem nicht betroffenen Teil zählen und die theoretische Kolonienanzahl für die gesamte Platte durch Extrapolation berechnen. Wenn mehr als ein Viertel überwachsen ist, die Zählung verwerfen. Eine Kette von Kolonien als eine koloniebildende Einheit betrachten. In der Praxis ist es bei selektiven Zählungen unüblich, anzugeben, dass die Mikroorganismen nur zu einer Gruppe gehören, jedoch kann diese Diskrepanz akzeptiert werden und die Ergebnisse können als mutmaßlich („verdächtig“) eingestuft werden. Zur genaueren Charakterisierung sind Bestätigungstests notwendig.

Bei der Auswahl von Kolonien zur Bestätigung sollte der angewendete Ansatz den Zweck der Untersuchung berücksichtigen. Zum Beispiel kann es bei einigen Untersuchungen oder Vergleichsversuchen vorrangig sein, alle vorhandenen Kolonien (sowohl Ziel- als auch Nicht-Zielkolonien) zu zählen. In anderen Situationen (z. B. Überwachung oder Forschung) kann es wichtiger sein, die Vielfalt der vorhandenen Zielkolonien zu ermitteln, als eine genaue bestätigte Zählung zu bestimmen. In den meisten Versuchsszenarios, bei denen eine bestätigte Zählung erforderlich ist, sollte jedoch als Ansatz die Bestätigung aller mutmaßlichen Zielkolonien (oder einer nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Teilmenge) dienen, wie im folgenden Absatz beschrieben.

Wenn es zahlreiche Kolonien gibt, ist es unpraktisch, die Identität aller in Routinebestimmungen zu bestätigen. Wenn die mutmaßlichen Kolonien nur eine Art der morphologischen Erscheinung zeigen, sollte eine Teilmenge aus einem Teilbereich der Platte oder Membran herangezogen werden, um Subjektivität bei der Auswahl zu vermeiden. Alle Kolonien werden isoliert, wenn die Gesamtanzahl zwischen 1 und 10 beträgt, und 10 Kolonien werden isoliert, wenn die Gesamtanzahl größer als 10 ist. Wenn es verschiedene typische Koloniearten auf der Platte gibt, sollte jede Kolonieart bezüglich Bestätigung mit allen oder mindestens 3 Kolonien je Art untersucht werden, sofern in der spezifischen Norm nicht anderweitig angegeben.

Unter Berücksichtigung der Probenart und -quelle (z. B. Trinkwasser oder Brauchwasser) sowie des Ziels der Analyse (z. B. hygienische Überwachung oder wissenschaftliche Forschung) kann lediglich eine Teilmenge mutmaßlicher Kolonien für die Bestätigungsschritte gewählt werden.

9.1.6 Allgemeine Anleitung für die Berechnung der Ergebnisse

Ein großer Teil dieses Unterabschnitts und von 9.1.7 und dem zugehörigen Anhang C, wenn Doppelbestimmungen mit Platten erfolgen, wurde ISO 7218:2007/Amd.1:2013 [10] in abgewandelter Form entnommen. Die nachfolgenden Berechnungsverfahren sind für die am häufigsten auftretenden Fälle, in denen die Untersuchungen nach den Verfahren der guten Laborpraxis durchgeführt werden. Selten können Sonderfälle auftreten (zum Beispiel eine signifikante Abweichung der Anzahl an Kolonien auf zwei Platten derselben Verdünnungsstufe, wie in Anhang C behandelt, oder ein sehr unterschiedliches Verhältnis zwischen dem Verdünnungsfaktor und den Platten zweier aufeinander folgender Verdünnungsstufen), und es ist daher notwendig, die durch Zählen erhaltenen Ergebnisse durch einen qualifizierten Mikrobiologen begutachten, interpretieren und gegebenenfalls zurückweisen zu lassen.

9.1.6.1 Allgemeiner Fall

Die in 9.1.7 angegebenen Berechnungsregeln und -beispiele für Ergebnisse von einzelnen Platten nach jeder Verdünnung werden angewendet, wenn die Anzahl an typischen Kolonien auf den Platten zwischen 10 und 300 (Plattenguss- und Ausplattierungsverfahren) oder 10 und 80 (Membranfiltrationsverfahren) beträgt.

Wie in 9.1.1.1, 9.1.2.1 und 9.1.3.1 beschrieben, hängen die akzeptablen Höchstzahlen von Ziel- und Nicht-Zielkolonien von vielen Faktoren wie dem spezifischen Verfahren, der Koloniegröße und der Art der Kolonien (z. B. schwärmend) ab und können auf den Ergebnissen von Verifizierungsversuchen beruhen. Als Beispiel für die oberen Zählgrenzwerte für Ziel- und Nicht-Zielkolonien kann 300 für eine 90-mm-Platte und 80 für ein 47-mm-Membranfilter erachtet werden.

Wenn Schalen mit einem anderen Durchmesser verwendet werden, muss der Beispielwert für die Höchstanzahl an zu zählenden Kolonien im Verhältnis zur Oberfläche der Schalen (oder Membranfilter) erhöht oder verringert werden.

ANMERKUNG Bei Gussplatten mit einem Durchmesser von 55 mm würde die größte zählbare Koloniezahl 110 betragen (entspricht einer Gesamtanzahl von 300 KBE auf einer 90-mm-Petrischale). Bei Gussplatten mit einem Durchmesser von 140 mm würde die größte zählbare Koloniezahl 730 betragen (entspricht einer Gesamtanzahl von 300 KBE auf einer 90-mm-Petrischale).

Bei den in 9.1.7 angegebenen, unterschiedlichen Berechnungsverfahren müssen auch die Platten einbezogen werden, die keine Kolonien enthalten, jedoch ausgewertet wurden. Für den Fall der Anwendung eines Spiralplatters die Herstelleranweisungen zur Kolonieauszählung befolgen.

Da angenommen wird, dass jede Kolonie aus einem Mikroorganismus oder aus einer einzelnen Ansammlung von Mikroorganismen hervorgegangen ist, wird das Ergebnis als Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) oder koloniebildender Partikel (KBP) in einem bestimmten Referenzvolumen der Probe (üblicherweise 100 ml oder 1 ml) angegeben.

Bezüglich der Berechnungsregeln und -beispiele bei Verwendung von zwei Platten zur Erhöhung der Zuverlässigkeit der Ermittlungsergebnisse siehe Anhang C.

9.1.6.2 Fall mit Bestätigung

Wenn im angewandten Verfahren eine Keimidentifizierung oder -bestätigung gefordert wird, sollten alle mutmaßlichen Kolonien idealerweise von jeder der zum Auszählen der Kolonien ausgewerteten Platten abgeimpft werden. Wenn dies auf Grund hoher Anzahlen unpraktisch ist, sollten zur Vermeidung von Subjektivität bei der Kolonieauswahl alle typischen Kolonien von einer zuvor definierten Teilfläche der Platte oder des Membranfilters untersucht werden. Wenn verschiedene typische Kolonien vorliegen, werden mindestens 3 Kolonien von jeder typischen Kolonieart untersucht (siehe 9.1.5.2).

Nach der Keimidentifizierung oder -bestätigung wird das bestätigte Ergebnis für jede der Platten wie folgt berechnet:

- Für jede gefundene Kolonieart den Anteil an mutmaßlichen Kolonien bestimmen, die mit den Identifizierungs- oder Bestätigungskriterien übereinstimmen (siehe 9.1.7.2).
- Für jede Kolonieart die Verdachtzählung mit dem Anteil multiplizieren, der bestätigt wurde, um die bestätigte Zählung zu erhalten.
- Alle bestätigten Zählungen summieren.

9.1.7 Angabe der Ergebnisse

Die in diesem Unterabschnitt behandelten Fälle sind allgemeine Fälle:

- Beimpfung einer Petrischale je Verdünnung, wenn mindestens zwei aufeinander-folgende Verdünnungen durchgeführt werden;
- höchste zählbare Anzahl aller vorhandenen Kolonien in Anlehnung an die in 9.1.6.1 beschriebenen Beispielwerte der oberen Kolonie-Grenzwerte;
- Anzahl der mutmaßlichen Kolonien, die zur Bestätigung (siehe 9.1.6.2) in jede beibehaltenen Schale abgeimpft werden: im Allgemeinen 10.

Wird mehr als eine Verdünnung verwendet, wird erwartet, dass das Verhältnis zwischen der Koloniezahl von Verdünnungsstufe d_1 und der Koloniezahl von Verdünnungsstufe d_2 10 % beträgt, im Allgemeinen sollte aber die Koloniezahl von Verdünnungsstufe d_2 nicht geringer als 5 % oder größer als 20 % der Koloniezahl von Verdünnungsstufe d_1 sein. Ist dies nicht der Fall, müssen die Ergebnisse mit Vorsicht ausgewertet werden (siehe ISO 14461-2 [15]). Wenn die Koloniezahl von Verdünnung d_1 250 ist, sollte die Koloniezahl von Verdünnung d_2 nicht kleiner als 12 und nicht größer als 50 sein

Das berechnete Ergebnis auf zwei signifikante Ziffern runden. Dabei, falls die dritte Zahl kleiner als 5 ist, die vorhergehende Zahl nicht verändern; falls die dritte Zahl größer als oder gleich 5 ist, die vorhergehende Zahl um eine Einheit vergrößern.

Das Ergebnis vorzugsweise als eine Zahl zwischen 1,0 und 9,9 angeben, multipliziert mit der jeweiligen Zehnerpotenz, oder eine ganze Zahl mit zwei signifikanten Ziffern.

Das Ergebnis als die Anzahl N der Mikroorganismen je festgelegtes Bezugsvolumen (im Allgemeinen 1 ml oder 100 ml) angeben

9.1.7.1 Berechnungsverfahren: allgemeiner Fall (Zählen der Gesamtkolonien oder Zielkolonien)

Damit ein Ergebnis quantitativ gültig ist, wird es im Allgemeinen als notwendig erachtet, die Kolonien auf mindestens einer Schale zu zählen, die mindestens 10 Kolonien (Gesamtkolonien, Zielkolonien oder den Bestätigungskriterien entsprechende Kolonien)

Die Anzahl N der im Testgut vorhandenen Mikroorganismen als gewichteten Mittelwert zweier aufeinanderfolgender Verdünnungen nach Gleichung (1) berechnen. $N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} \times V_s \quad (1)$ Dabei ist $\sum c$ die Summe der auf den beiden für zwei aufeinanderfolgende Verdünnungen ausgewerteten Platten gezählten Kolonien, wobei mindestens eine der Platten mindestens 10 Kolonien enthält; V das Volumen des in jede Schale gegebenen Inokulums, in Milliliter, ml; d die der ersten ausgewerteten Verdünnung entsprechende Verdünnung [$d = 1$, wenn die unverdünnte flüssige Teilprobe ausgewertet wird]; V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe.	BEISPIEL 1 Die Zählung von Platten, die nach dem Plattengussverfahren analysiert wurden, ergab folgende Ergebnisse: Bei der ersten Verdünnung ausgewertet (10^{-2}): 168 Kolonien. Bei der zweiten Verdünnung ausgewertet (10^{-3}): 14 Kolonien. $N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} \times V_s = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} \times 1$ $= \frac{182}{0,011} \times 1 = 16\,545$ Nach dem Runden der Ergebnisse nach 9.1.7 ist die Anzahl an Mikroorganismen $N = 17\,000$ oder $N = 1,7 \times 10^4$ KBE/ml. $d = 0,01 = 10^{-2}$ Verdünnungsfaktor entsprechend der ausgewerteten höher konzentrierten Verdünnung.	BEISPIEL Die Zählung von Platten, die nach dem Membranfiltrationsverfahren analysiert wurden, ergab folgende Ergebnisse: Beim ersten Untersuchungsvolumen (100 ml): 82 Kolonien. Beim zweiten Untersuchungsvolumen (10 ml): 11 Kolonien. $N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} \times V_s = \frac{82 + 11}{100 \times 1,1 \times 10^0} \times 100$ $= \frac{93}{110} \times 100 = 84,545$ Nach dem Runden der Ergebnisse nach 9.1.7 ist die Anzahl an Mikroorganismen $N = 85$ je 100 ml Probe. $d = 1 = 10^0$ Verdünnungsfaktor entsprechend der ausgewerteten höher konzentrierten Verdünnung.
--	--	---

9.1.7.2 Berechnungsverfahren: allgemeiner Fall mit Bestätigung

Wenn im angewandten Verfahren eine Bestätigung gefordert wird, wird eine festgelegte Anzahl A (im Allgemeinen 10) mutmaßlicher Kolonien von jeder für die Koloniezählung ausgewerteten Platte identifiziert. Nach der Bestätigung wird für jede der Platten die Anzahl der die Bestätigungskriterien erfüllenden Kolonien, a , nach Gleichung (2) berechnet:

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad (2)$$

Dabei ist

- A die Anzahl der abgeimpften verdächtigen Kolonien;
- b die Anzahl der die Bestätigungskriterien erfüllenden Kolonien;
- C die Gesamtzahl der auf der Platte gezählten mutmaßlichen Kolonien.

Die berechneten Ergebnisse auf die nächstliegende ganze Zahl runden. Dabei die vorhergehende Zahl nicht verändern, falls die erste Dezimalstelle kleiner als 5 ist. Falls die erste Dezimalstelle größer als oder gleich 5 ist, die vorhergehende Zahl um eine Einheit vergrößern.

Die Anzahl N der im Testgut vorliegenden bestätigten Mikroorganismen durch Ersatz von $\sum c$ durch $\sum a$ in Gleichung (1) (9.1.7.1) mit folgender Gleichung (3) berechnen:

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} \times V_s \quad (3)$$

Dabei ist

$\sum a$ die Summe der der die Bestätigungskriterien erfüllenden Kolonien für zwei aufeinanderfolgend Verdünnungen, von denen mindestens eine mindestens 10 Kolonien enthält;

V und d wie für Gleichung (1).

Das Ergebnis nach 9.1.7.1 runden und angeben.

BEISPIEL Die Auszählung hat folgende Ergebnisse erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 66 Kolonien;
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-4}): 4 Kolonien.

Die Untersuchung ausgewählter Kolonien wurde durchgeführt:

- von den 66 Kolonien wurden 10 Kolonien untersucht, von denen 6 die Kriterien erfüllten: daher ist $a = 40$;
- von den 4 Kolonien erfüllten alle 4 die Kriterien: daher ist $a = 4$.

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} \times V_s = \frac{40 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} \times 1 = \frac{44}{0,0011} \times 1 = 40\,000$$

Nach Runden des Ergebnisses, wie in 9.1.7 festgelegt, beträgt die Anzahl der Mikroorganismen 40 000 oder $4,0 \times 10^4$ je Milliliter Probe.

Wenn morphologische Typen mehrere Kolonien zur Bestätigung herangezogen werden (siehe 9.1.6.2), werden die Berechnungen für jeden morphologischen Typ durchgeführt und die Ergebnisse addiert, um die Gesamtanzahl an Kolonien, die die Bestätigungskriterien erfüllen, zu erhalten.

9.1.7.3 Berechnungsverfahren: niedrige Zählungen

9.1.7.3.1 Fall, bei dem eine Schale weniger als 10 Kolonien enthält

Wenn die mit dem Testgut (Flüssigkeiten) bzw. der Erstverdünnung (andere Proben) oder ersten Verdünnungsstufe beimpfte oder ausgewertete Schale weniger als 10 Kolonien enthält, sollten die Ergebnisse wie folgt angegeben werden:

- bei 3 bis 9 Kolonien sollte das Ergebnis als Schätzwert angegeben werden;
- bei 1 bis 2 Kolonien sollte das Ergebnis als Vorhandensein angegeben werden.

Koloniezahlen von 10 bis zum (praktischen) oberen Grenzwert jedes Verfahrens liegen im optimalen Präzisionsbereich. Die Präzision nimmt schnell ab, wenn die Koloniezahlen unter 10 sinken. Demzufolge kann die niedrigere Bestimmungsgrenze für eine Zählung von 10 festgelegt werden.

Nach ISO 13843:2017 [14] ist die Definition der Bestimmungsgrenze: „niedrigste durchschnittliche Partikelkonzentration x je Untersuchungsvolumen, bei der die erwartete relative Standardunsicherheit einem festgelegten Wert (RSD) entspricht.“ RSD ist die relative Standardabweichung, die durch Dividieren des Schätzwerts der Standardabweichung s einer Population aus einer Stichprobe durch das arithmetische Mittel $\bar{x}$ dieser Probe berechnet wird. Anstelle von RSD wird das Formelzeichen w für die relative Standardabweichung verwendet. Demzufolge ist $w = s/\bar{x}$.

Im Falle einer Poisson-Verteilung, wird x mit Gleichung (4) berechnet:

$$x = \frac{1}{(w)^2} \quad (4)$$

In der Mikrobiologie wird 10 allgemein als niedrigste zuverlässige Zählung anerkannt und ist daher die untere Bestimmungsgrenze. Die zugehörige vertretbare relative Präzision (w) bei der Bestimmungsgrenze Zehn beträgt bei Anwendung von Gleichung (4) 32 %.

$$w = \sqrt{\frac{1}{x}}$$
$$w = \sqrt{\frac{1}{10}} = 0,32 - 32 \%$$

Demnach sollten Ergebnisse, die auf Zählungen von weniger als 10 beruhen, lediglich als Nachweis des Vorhandenseins des Organismus behandelt werden.

Bei mittleren Zählungen von 3 Partikeln je Teilprobe ist die Chance, das Vorhandensein eines Analyten nachzuweisen (d. h. Feststellen von mindestens 1 Kolonie), unter der Voraussetzung, dass die Poisson-Verteilung vorliegt, gleich 95 %. Daher entspricht diese mittlere Zählung von 3 der Nachweisgrenze. Dies wird durch nachfolgende Gleichung (5) beschrieben.

Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses $p(+)$ bei vorliegender Poisson-Verteilung kann berechnet werden aus:

$$p(+) = 1 - e^{-x} \quad (5)$$

Auflösen der Gleichung nach x ergibt:

$$x = -\ln [1 - p(+)]$$

Dabei ist

e die Basis des natürlichen Logarithmus;

x die Partikelanzahl je Untersuchungsmenge.

Entsprechend der Gleichung gilt $x = -\ln(1-0,95) = -\ln(0,05) = 3,0$.

Zusammenfassend gilt für Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze, dass das Vorhandensein von Zielorganismen nicht wirksam nachgewiesen werden kann. Bei Ergebnissen unterhalb der Bestimmungsgrenze, aber oberhalb oder gleich der Nachweisgrenze, kann das Vorhandensein von Zielorganismen wirksam nachgewiesen werden, kann aber keine wirksame quantitative Bestimmung erfolgen. Aus diesem Grund wird bei einer Platte, die weniger als 10 Kolonien, aber mindestens 3 Kolonien enthält, das Ergebnis nach Gleichung (6) berechnet:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times d} \times V_s \quad (6)$$

Dabei ist

$\sum c$ die Summe der auf den beiden für zwei aufeinanderfolgende Verdünnungen ausgewerteten Platten gezählten Kolonien, wobei mindestens eine der Platten mindestens 3 Kolonien enthält;

V das Volumen des in jede Schale gegebenen Inokulums, in Milliliter, ml;

d die der ersten ausgewerteten Verdünnung entsprechende Verdünnung [$d = 1$, wenn die unverdünnte flüssige Teilprobe ausgewertet wird];

V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe;

N_E die geschätzte Anzahl an Mikroorganismen je untersuchten Volumen.

Daher wird das Ergebnis bei 3 bis 9 gefundenen Kolonien als geschätzte Anzahl im untersuchten Volumen angegeben.

ANMERKUNG Die Benennung „geschätzte Anzahl“ steht für einen weniger präzisen Schätzwert des wahren Wertes.

Falls die Gesamtkoloniezahl zwischen 1 und 2 liegt, ist die Präzision des Ergebnisses so gering, dass es anzugeben ist mit:

„Mikroorganismen sind im untersuchten Volumen vorhanden“.

Wenn die Gesetzgebung ein Zahlenwert als Ergebnis fordert, z. B. für Überwachungszwecke, dann wird ein geschätzter Zahlenwert mit zugehöriger statistischer Unzuverlässigkeit angegeben.

9.1.7.3.2 Fall, bei dem die Schale keine Kolonien enthält

Falls die mit dem Testgut (Flüssigkeiten), der Erstverdünnung (andere Proben) oder mit der ersten Verdünnungsstufe beimpfte oder ausgewertete Schale keine Kolonie enthält, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

„weniger als $\frac{1}{V \times d} \times V_s$ Mikroorganismen je V Milliliter“

Dabei ist

d der Verdünnungsfaktor der Erstverdünnung oder der ersten Verdünnungsstufe, mit der beimpft oder ausgewertet wurde ($d = 10^0 = 1$, wenn das direkt abgeimpfte Testgut von Flüssigkeiten ausgewertet wird);

V das Volumen des in jeder Schale verwendeten in Milliliter, ml;

V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe.

ANMERKUNG Bei geforderten Angaben zur Messunsicherheit (Unrichtigkeit) in der Angabe des Ergebnisses ist es vorzuziehen, diese anzugeben als „nicht nachgewiesen in der untersuchten Teilprobe“.

(Entsprechend der Poisson-Verteilung ist die Nachweisgrenze des Verfahrens 3 Organismen je untersuchter Teilprobe).

9.1.7.3.3 Sonderfälle

Diese Fälle betreffen das Auszählen von Zielkolonien oder mutmaßlichen Kolonien.

9.1.7.3.3.1 Fall 1: Hohes Hintergrundwachstum mit Zielkolonien

Falls die Anzahl von Ziel- und Nicht-Zielkolonien bei der Schale mit der ersten Verdünnungsstufe d_1 mehr als 300 (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) beträgt, mit sichtbaren Zielkolonien oder bestätigten Kolonien, und wenn die Schale, die die nachfolgende Verdünnung d_2 enthält, weniger als 300 Kolonien (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) enthält, und keine Zielkolonie oder bestätigte Kolonie erkennbar ist, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

„weniger als $\frac{1}{V_2 \times d_2} \times V_s$ und mehr als $\frac{1}{V_1 \times d_1} \times V_s$ Mikroorganismen je Milliliter“

Dabei ist/sind

d_1 und d_2 die Verdünnungsfaktoren entsprechend den Verdünnungsstufen d_1 und d_2 ;

V_1 das Volumen des in die Schale mit der ersten Verdünnungsstufe d_1 eingebrachten Inokulums, in Milliliter, ml;

V_2 das Volumen des in die Schale mit der nachfolgenden Verdünnungsstufe d_2 eingebrachten Inokulums, in Milliliter, ml;

V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe.

BEISPIEL Die Auszählung hat folgende Ergebnisse bei mit 1 ml beimpften Platten erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): mehr als 300 Kolonien auf der Platte mit vorhandenen Zielkolonien oder bestätigten Kolonien;
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 33 Kolonien ohne vorhandene Zielkolonien oder bestätigte Kolonien.

Das Ergebnis beträgt weniger als 1 000 Mikroorganismen und mehr als 100 Mikroorganismen je Milliliter Probe.

9.1.7.3.3.2 Fall 2: Hohes Hintergrundwachstum ohne Zielkolonien

Falls die Anzahl von Ziel- und Nicht-Zielkolonien bei der Schale mit der ersten Verdünnungsstufe d_1 mehr als 300 (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) beträgt, ohne sichtbare Zielkolonien oder bestätigte Kolonien, und wenn die Schale, die die nachfolgende Verdünnung d_2 enthält, weniger als 300 Kolonien (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) enthält, und keine Zielkolonie oder bestätigte Kolonie erkennbar ist, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

„weniger als $\frac{1}{V_2 \times d_2} \times V_s$ Mikroorganismen je Milliliter“

Dabei ist

d_2 der Verdünnungsfaktoren entsprechend den Verdünnungsstufe d_2 ;

V_2 das Volumen des in der Schale der nachfolgenden Verdünnung d_2 verwendeten Inokulums, in Milliliter, ml;

V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe.

BEISPIEL Die Auszählung hat folgende Ergebnisse bei mit 1 ml beimpften Platten erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): mehr als 300 Kolonien auf der Platte ohne vorhandene Zielkolonien oder bestätigte Kolonien;
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 33 Kolonien ohne vorhandene Zielkolonien oder bestätigte Kolonien.

Das Ergebnis beträgt weniger als 1 000 Mikroorganismen je Milliliter Probe.

ANMERKUNG Wenn es viele Nicht-Zielkolonien gibt, können die Zielkolonien durch Überwachsen maskiert werden und ist es hilfreich, dies aufzuzeichnen und eine Wiederholungsprobe anzufordern.

9.1.7.4 Berechnungsverfahren: ungewöhnliche, geschätzte und unannehmbare Zählungen

Einige Beispiele entsprechen nicht den Regeln von 9.1.7.1. Wenn eine Wiederholung der Analyse nicht möglich oder angemessen ist, können die Ergebnisse berechnet und wie in 9.1.7.1 angegeben werden, die Präzision ist jedoch geringer und das muss im Untersuchungsbericht angegeben werden.

9.1.7.4.1 Unerwartete Verdünnungsverhältnisse

Diese Situation tritt ein, wenn die Anzahl der gezählten Kolonien (Gesamtkoloniezahl, Zielkolonien oder mutmaßliche Kolonien) größer ist als 300 (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) bei der Schale mit der ersten Verdünnungsstufe d_1 , bei einer Anzahl der Kolonien (Gesamtkolonien, Zielkolonien oder die Bestätigungskriterien erfüllende Kolonien) von weniger als 10 in der Schale, die die nachfolgende Verdünnung d_2 enthält.

Falls die Anzahl der Kolonien in der Schale mit der Verdünnungsstufe d_1 innerhalb des Bereichs von 334 bis 300 (oberer Bereich des Vertrauensintervalls für Koloniezählung von 300) liegt und die Koloniezählung der Verdünnungsstufe d_2 nicht weniger als 8 (unterer Grenzwert des Vertrauensintervalls für 15 Kolonien) beträgt, wird das Berechnungsverfahren für allgemeine Fälle (siehe 9.1.7.1) angewendet.

ANMERKUNG 1 Die Koloniezahl von 15 entspricht 5 % von 300.

BEISPIEL 1 Die Auszählung hat folgende Ergebnisse erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): 310 Kolonien.
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 8 Kolonien.

Das Berechnungsverfahren für allgemeine Fälle (9.1.7.1) unter Verwendung von zwei Schalen für die beiden ausgewerteten Verdünnungen anwenden.

BEISPIEL 2 Auszählung bei Festlegung einer Höchstanzahl von 150 Kolonien:

Wenn die Koloniezahl für die Schale mit der Verdünnungsstufe d_1 innerhalb des Bereichs von 175 bis 150 liegt, ergab die Auszählung folgende Ergebnisse:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): nicht mehr als 175 Kolonien in der Schale (oberer Grenzwert des Vertrauensintervalls für 150);
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 3 Kolonien (unterer Grenzwert des Vertrauensintervalls für 7).

Das Berechnungsverfahren für allgemeine Fälle (9.1.7.1) mit den Schalen für die zwei ausgewerteten Verdünnungen anwenden.

ANMERKUNG 2 Die Koloniezahl von 7 entspricht 5 % von 150.

Wenn die Koloniezahl für die Schale mit der Verdünnungsstufe d_1 größer als 175 (oberer Grenzwert des Vertrauensintervalls für eine Koloniezahl von 150) ist, nur das Ergebnis der Zählung von Verdünnungsstufe d_2 berücksichtigen und eine abgeschätzte Zählung berechnen (siehe 9.1.7.3.1).

BEISPIEL 3 Die Auszählung ergab folgende Ergebnisse:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): mehr als 175 Kolonien in der Schale;
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 9 Kolonien.

Für die in der Schale mit der Verdünnungsstufe 10^{-3} ausgezählten Kolonien eine geschätzte Keimzahl angeben (9.1.7.3.1): $N_E = 9,0 \times 10^{-3}$.

Wenn die Koloniezahl auf eine Höchstanzahl von 300 festgelegt wurde und die geschätzte Keimzahl geringer als 8 ist, dann ist die Differenz zwischen den beide Verdünnungsstufen unannehmbar.

BEISPIEL 4 Die Zählung (bei Festlegung einer Höchstanzahl von 300 für die Koloniezählung) hat folgende Ergebnisse erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): mehr als 334 Kolonien in der Schale;
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 7 Kolonien. Das Ergebnis dieser Zählung ist unannehmbar.

BEISPIEL 5 Die Auszählung (bei Festlegung einer Höchstanzahl von 150 für die Koloniezählung) hat folgende Ergebnisse erbracht:

- bei der ersten ausgewerteten Verdünnung (10^{-2}): mehr als 175 Kolonien in der Schale (oberer Grenzwert des Vertrauensintervalls für 150);
- bei der zweiten ausgewerteten Verdünnung (10^{-3}): 2 Kolonien. Das Ergebnis dieser Zählung ist unannehmbar.

Die sich auf das Vertrauensintervall beziehenden Zahlen müssen an die für die Koloniezählungen angegebene Höchstzahl angepasst werden.

9.1.7.4.2 Sämtliche Schalen über den oberen Auszählgrenzwerten

Wenn die Koloniezählung (Gesamtkolonien, Zielkolonien oder mutmaßliche Kolonien) bei jeder der Schalen bei allen abgeimpften Verdünnungen eine Anzahl von mehr als 300 (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) ergibt, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

„mehr als $\frac{300}{V \times d} \times V_s$ “ (im Fall der Gesamtkolonien oder Zielkolonien); oder

„mehr als $\frac{300}{V \times d} \times V_s \times \frac{b}{A}$ “ (im Fall der bestätigten Kolonien), angegeben in Mikroorganismen

je gewählten Bezugsvolumen

Dabei ist

- d die Verdünnung der letzten abgeimpften Verdünnungsstufe;
- V das Volumen des in jeder Schale verwendeten Inokulums, in Milliliter, ml;
- V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe;
- b die Anzahl an Kolonien, die den Bestätigungskriterien entsprechen;
- A die Anzahl an mutmaßlichen Kolonien, die zur Bestätigung abgeimpft wurden.

9.1.7.4.3 Nur die Schale mit der letzten Verdünnungsstufe ist zählbar

Wenn nur die Schale mit der letzten abgeimpften Verdünnung zählbar ist und mehr als 10 Kolonien und weniger als 300 Kolonien (oder eine andere in der einschlägigen Norm angegebene Anzahl) (Gesamtkolonien, Zielkolonien oder mutmaßliche Kolonien) aufweist, wird die Anzahl N' der festgestellten Mikroorganismen nach Gleichung (5) berechnet:

$$N' = \frac{c}{V \times d} \times V_s \quad (7)$$

Dabei ist

- c die Anzahl der in der Schale gezählten Kolonien;
- V das Volumen des in jeder Schale verwendeten Inokulums, in Milliliter, ml;
- d die der ausgewerteten Verdünnung entsprechende Verdünnungsstufe;
- V_s das gewählte Bezugsvolumen für die Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in der Probe.

Das Ergebnis nach 9.1.7 runden.

Das Ergebnis angeben als die Anzahl N' an Mikroorganismen je gewähltes Bezugsvolumen.

BEISPIEL Die Auszählung hat folgende Ergebnisse erbracht:

— bei der letzten abgeimpften Verdünnung (10^{-4}): 120 Kolonien.

Folglich ist

$$N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} \times 1 = 1\,200\,000$$

Durch Runden des Ergebnisses, wie in 9.1.7 festgelegt, beträgt die Anzahl N' an Mikroorganismen 1 200 000 oder $1,2 \times 10^6$ je Milliliter.

9.1.7.5 Unsicherheit der Ermittlungsergebnisse

Bezüglich einer Anleitung zur Abschätzung und Angabe der Unsicherheit der Ermittlungsergebnisse von quantitativen Verfahren siehe Anhang A, A.2 und ISO 29201 [22].

9.2 Zählung unter Einsatz eines flüssigen Mediums

Teilproben werden in ein flüssiges Medium abgeimpft, das dafür ausgelegt ist, das Wachstum eines bestimmten Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen zu fördern. Derartige Medien sind oft so definiert, dass sie eine starke Vermehrung von Nicht-Zielkeimen hemmen.

Um zu bestimmen, ob ein Wachstum der Zielkeime stattgefunden hat, können verschiedene Kriterien angewendet werden, z. B. visuelle Feststellung von Trübung, Gasbildung, Farbänderungen, die nachfolgende Isolierung der Mikroorganismen auf einem selektiven Agarmedium. Die Zusammensetzung der Wachstumsmedien und die Kriterien für das Unterscheiden zwischen positiven und negativen Ergebnissen sind in den entsprechenden Normen definiert.

Bei dieser Vorgehensweise kann jeder Teilprobe nur ein qualitativer Wert zugeordnet werden, d. h. das Ergebnis ist entweder positiv oder negativ. Um einen Schätzwert für die Menge der vorliegenden Mikroorganismen zu erhalten, ist es erforderlich, mehrere Teilproben zu untersuchen und statistische Verfahren anzuwenden, um die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN, en: Most Probable Number) zu bestimmen. Diese Teilproben können entsprechend dem angewendeten Verfahren in Röhrchen, Flaschen oder Mikrotiterplatten enthalten sein (siehe Literaturhinweise [11], [12], [13]).

Wird ein selektives Wachstumsmedium verwendet, sollte die Zugabe der Teilprobe die selektive Eigenschaften nicht verringern und dadurch das Wachstum von Nicht-Zielkeimen zulassen. In den meisten Normen werden im Anwendungsbereich Informationen zur Kompatibilität einer spezifischen Matrix mit dem flüssigen Medium gegeben, aber Inkompatibilität kann sich aufgrund der biologischen Zusammensetzung der Matrix ergeben, z. B. stark kontaminierte Umweltproben. Bei derartigen problematischen Matrices müssen Beimpfungsversuche mit repräsentativen Mikroorganismen durchgeführt werden, um nachzuprüfen, ob das Verfahren für die Matrix geeignet ist.

9.2.1 Durchführung

Sofern in den entsprechenden Normen nicht anders angegeben, werden Teilprobenvolumina von 1 ml oder weniger zum Fünf- bis Zehnfachen des Volumens des Mediums einfacher Konzentration zugegeben. Teilproben zwischen 1 ml und 100 ml werden normalerweise zu gleichen Volumina des doppelt konzentrierten Mediums zugegeben.

Bei Volumina über 100 ml dürfen stärker konzentrierte Medien verwendet werden. Wie in 9.1.3.5 beschrieben, dürfen größere Teilprobenvolumina auch durch Aufkonzentrieren mit Membranfilter und nachfolgende direkte Überführung des Membranfilters in ein flüssiges Medium zur Bestimmung des Vorhandenseins/nichtvorhandenseins oder zur MPN-Zählung untersucht werden. In Abhängigkeit von Größe

der Teilproben können diese in Röhrchen oder Flaschen abgeimpft werden, die die erforderliche Menge des flüssigen Mediums enthalten. Bei kleinen Teilproben können auch Mikrotiterplatten verwendet werden.

Für besondere Zwecke dürfen sterile Trockennährmedien in der kalten (oder auf 30 °C vorgewärmten) zu analysierenden Probe gelöst werden. Außerdem dürfen Probenvolumina zu Mikrotiterplatten gegeben werden, die Trockennährmedien enthalten.

Sofern nicht anderweitig angegeben, sollte die Zeit zwischen der Herstellung der ersten Verdünnungsstufe der Probe und dem Beimpfen des letzten Röhrchens bzw. der letzten Flasche oder Mikrotiterplatte weniger als 15 min betragen.

Für jede Verdünnung muss eine neue sterile Pipette verwendet werden, es sei denn, die am meisten verdünnte Probe wird zuerst pipettiert.

9.2.2 Wahl des Beimpfungssystems

Das Grundprinzip des MPN-Verfahrens besteht darin, eine Probe bis zu einem Grad zu verdünnen, dass die Inokula teilweise, jedoch nicht immer, lebensfähige Ziel-Mikroorganismen enthalten. Das „Ergebnis“, d. h. die Anzahl der Inokula, die bei jeder Verdünnung Wachstum erzeugen, lässt auf einen Schätzwert der Ausgangskonzentration der Bakterien in der Probe schließen. Um Schätzwerte für einen großen Bereich möglicher Konzentrationen zu erhalten, werden Verdünnungsreihen verwendet, wobei bei jeder Verdünnung mehrere Röhrchen (oder Platten usw.) bebrütet werden. Die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) der in der ursprünglichen Probe vorliegenden Mikroorganismen sowie die Präzision des Schätzwertes können auf der Grundlage der nach der Inkubation beobachteten Anzahl positiver und negativer Röhrchen mittels statistischer Verfahren berechnet werden.

Eine Auswahl aus den verschiedenen verfügbaren MPN-Konfigurationen wird getroffen aufgrund:

- der erwarteten Anzahl von Mikroorganismen in der untersuchten Probe;
- gesetzlichen Anforderungen;
- der erforderlichen Präzision;
- jeglicher weiterer praktischer Erwägungen.

Die Unsicherheit der MPN-Ergebnisse ist auf gleiche Weise von der Anzahl der beobachteten Teilproben mit positivem Befund abhängig, wie die Unsicherheit einer Koloniezählung von der Anzahl der Kolonien auf der Platte abhängt. Die Unsicherheit ändert sich als Funktion der Quadratwurzel der Anzahl der verwendeten Röhrchen, da sich die Präzision mit zunehmender Anzahl von Paralleluntersuchungen erhöht; die Anzahl der Röhrchen muss jedoch vervierfacht werden, um eine Halbierung der Unsicherheit zu erreichen. Bei Systemen mit nur wenigen parallel untersuchten Röhrchen ist die relative Unsicherheit hoch.

9.2.2.1 Systeme mit Einfachverdünnung

Wenn die erwartete Konzentration der Mikroorganismen gering ist oder erwartet wird, dass sie nur mäßig schwankt, ist das am besten geeignete Beimpfungssystem eine einzige Reihe gleicher Teilproben. Wo das erwartete Verhältnis zwischen der Höchst- und Mindestzahl der Mikroorganismen kleiner als etwa 25 ist, sind 10 parallel laufende Teilproben die kleinste Anzahl, von der brauchbare Angaben erwartet werden können; bei 50 parallel laufenden Röhrchen ist ein Verhältnis von 200 der Grenzwert. Wenn die tatsächliche Konzentration in der Nähe des Extremwerts der möglichen MPN-Werte liegt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass voraussichtlich alle Röhrchen ein Wachstum oder kein Wachstum aufweisen, zu hoch.

9.2.2.2 Systeme mit Mehrfachverdünnungen

Wenn die Konzentration der Mikroorganismen in der Probe unbekannt ist oder große Schwankungen vorauszusehen sind, kann es erforderlich sein, Reihen von Röhrchen mit mehreren Verdünnungen zu beimpfen. Es wird eine ausreichende Anzahl von Verdünnungen abgeimpft, um ein System mit sowohl positiven als auch negativen Ergebnissen sicherzustellen. Die zu verwendende Anzahl der Verdünnungen hängt auch von dem Berechnungsverfahren ab, das für die Schätzung des MPN-Werts verwendet wird. Falls MPN-Tabellen benutzt werden müssen, sind die Konfigurationen der Systeme auf diejenigen eingeschränkt, die in den Tabellen zur Verfügung stehen. Bei Anwendung von Rechnerprogrammen ist die Anzahl der Verdünnungen und der parallel laufenden Röhrchen nicht begrenzt, was für die Anwendung neuer handelsüblicher MPN-Testkits von Bedeutung ist.

9.2.2.2.1 Systeme mit symmetrischen Verdünnungen

Das am häufigsten angewandte symmetrische MPN-System verwendet drei oder fünf parallele Röhrchen je Verdünnung. Die mit diesen Systemen mit geringen Anzahlen von Röhrchen je Verdünnung erhaltene Präzision ist sehr gering. Die Ergebnisse der Ausführung mit drei Röhrchen sind kaum mehr als Hinweise auf die Größenordnung der Keimkonzentration. Ist eine höhere Präzision gefordert, wird empfohlen, fünf oder mehr parallele Röhrchen zu wählen.

Alternativ werden für bestimmte Wasserarten (z. B. Oberflächenwasser und Abwasser) häufig Ansätze mit miniaturisierten Verfahren oder Mikrotiterplatten-Systemen gewählt [11] [13].

9.2.2.2.2 Systeme mit nicht symmetrischen Verdünnungen

Bei nicht symmetrischen Systemen liegt eine unterschiedliche Anzahl von Röhrchen bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen vor; diese Systeme sollten nur angewendet werden, um die Anzahl der Mikroorganismen innerhalb eines klar definierten Bereichs abzuschätzen. Gelegentlich führt ein möglicherweise verlorenes oder zerbrochenes Röhrchen zu einem ungewollten asymmetrischen System. Einige handelsübliche Testkits beruhen jedoch auf einem nicht symmetrischen System. Es wird empfohlen, Daten von derartigen Systemen unter Anwendung eines geeigneten Rechnerprogramms auszuwerten (siehe 9.2.5.3).

9.2.3 Inkubation

Die beimpften Röhrchen, Kolben oder Flaschen in einem Brutschrank oder Wasserbad bebrüten. Mikrotiterplatten werden in einen Brutschrank gestellt, wobei sicherzustellen ist, dass sie angemessen vor Austrocknung geschützt sind.

Dauer und Temperatur der Bebrütung unter Bezug auf die einschlägige Norm wählen, da sie vom gesuchten Mikroorganismus oder der Gruppe der gesuchten Mikroorganismen abhängen.

Bei einigen Mikroorganismen kann/können ein zweistufiges Bebrütungsverfahren und/oder ein Bestätigungsschritt erforderlich sein. Hinsichtlich Einzelheiten siehe die einschlägigen Normen, es ist jedoch zu beachten, dass die Ableitung von MPN-Werten möglicherweise zusätzlich erschwert (siehe Literaturhinweis [24]).

9.2.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Kriterien, die positive von negativen Ergebnissen unterscheiden, sind für jeden Mikroorganismus oder jede Gruppe von Mikroorganismen unterschiedlich und sind in den einschlägigen Normen festgelegt. Die Anzahl der von allen aus einer Probe abgeleiteten Einwaagen erhaltenen positiven Ergebnisse unter Anwendung dieser Kriterien zählen und aufzeichnen.