



Institut luxembourgeois de la normalisation
de l'accréditation, de la sécurité et qualité
des produits et services

ILNAS-EN ISO 9308-1:2014

Wasserbeschaffenheit - Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für

Water quality - Enumeration of
Escherichia coli and coliform bacteria -
Part 1: Membrane filtration method for
waters with low bacterial background

Qualité de l'eau - Dénombrement des
Escherichia coli et des bactéries
coliformes - Partie 1: Méthode par
filtration sur membrane pour les eaux à

09/2014



Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm EN ISO 9308-1:2014 wurde als luxemburgische Norm ILNAS-EN ISO 9308-1:2014 übernommen.

Alle interessierten Personen, welche Mitglied einer luxemburgischen Organisation sind, können sich kostenlos an der Entwicklung von luxemburgischen (ILNAS), europäischen (CEN, CENELEC) und internationalen (ISO, IEC) Normen beteiligen:

- Inhalt der Normen beeinflussen und mitgestalten
- Künftige Entwicklungen vorhersehen
- An Sitzungen der technischen Komitees teilnehmen

<https://portail-qualite.public.lu/fr/normes-normalisation/participer-normalisation.html>

DIESES WERK IST URHEBERRECHTLICH GESCHÜTZT

Kein Teil dieser Veröffentlichung darf ohne schriftliche Einwilligung weder vervielfältigt noch in sonstiger Weise genutzt werden - sei es elektronisch, mechanisch, durch Fotokopien oder auf andere Art!

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit - Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wasser mit niedriger Begleitflora (ISO 9308-1:2014)

Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014)

Qualité de l'eau - Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes - Partie 1: Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries (ISO 9308-1:2014)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. August 2014 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Grundlage des Verfahrens	6
5 Geräte und Glasgefäße	6
6 Kulturmedien und Reagenzien	6
7 Probenahme	7
8 Durchführung	7
8.1 Probenvorbereitung.....	7
8.2 Filtration.....	7
8.3 Bebrütung und Differenzierung.....	7
9 Angabe der Ergebnisse.....	7
10 Analysenbericht	8
11 Qualitätssicherung	8
11.1 Allgemeines	8
11.2 Leistungsprüfung des Chromogenen Coliformen Agars (CCA).....	8
11.3 Leistungsprüfung des Oxidase-Tests	8
Annex A (informativ) Weitere mikrobiologische Informationen über coliforme Bakterien.....	9
Annex B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien und Reagenzien.....	10
B.1 Chromogener Coliformen Agar (CCA).....	10
B.2 Oxidase-Reagenz	11
B.3 Trypton Soja Agar (TSA)	11
Annex C (informativ) Verfahrenskenndaten	12
Literaturhinweise	13

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 9308-1:2014) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2015, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2015 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 9308-1:2000.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 9308-1:2014 wurde vom CEN als EN ISO 9308-1:2014 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Vorkommen und Ausmaß fäkaler Verunreinigungen sind ein wichtiger Faktor bei der Einschätzung der Wasserqualität und des Risikos einer Infektion für die menschliche Gesundheit. Eine Untersuchung von Wasserproben auf *Escherichia coli* (*E. coli*), die normalerweise im Darm von Warmblütern vorkommen, gibt einen Hinweis auf solch eine Verschmutzung. Eine Untersuchung auf coliforme Bakterien kann schwieriger zu interpretieren sein, da einige coliforme Bakterien im Boden und im Oberflächenwasser leben und nicht ausschließlich im Darm. Daher kann das Vorkommen von coliformen Bakterien, auch wenn es kein Beweis einer fäkalen Verunreinigung ist, ein Hinweis auf Fehler in der Wasseraufbereitung, -speicherung und -verteilung sein.

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

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

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 9308 beschreibt ein Verfahren für die Zählung von *Escherichia coli* (*E. coli*) und coliformen Bakterien. Das Verfahren beruht auf einer Membranfiltration, einer anschließenden Kultivierung auf dem Chromogenen Coliformen Agar (CCA) und der Berechnung der Anzahl der Zielorganismen in der Probe. Aufgrund der geringen Selektivität des Agars zur Primäranreicherung kann die Begleitflora eine verlässliche Zählung von *E. coli* und coliformen Bakterien stören, z. B. in Oberflächenwässern oder Wasser aus oberflächennahen Brunnen. Dieses Verfahren ist für solche Wasserarten nicht geeignet.

Dieser Teil von ISO 9308 eignet sich besonders für die Untersuchung von Wässern mit niedrigen Bakterienzahlen, bei denen insgesamt weniger als 100 Kolonien auf dem Chromogenen Coliformen Agar (CCA) wachsen. Dies können Trinkwässer, desinfizierte Schwimmbeckenwässer oder fertig aufbereitete Wässer aus Wasseraufbereitungsanlagen sein.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

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

ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

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

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

3 Begriffe

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

3.1

coliforme Bakterien

Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae*, die das Enzym β -D-Galactosidase exprimieren

3.2

Escherichia coli

E. coli

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

4 Grundlage des Verfahrens

Das zu prüfende Probevolumen durch einen Membranfilter filtrieren, das die Bakterien zurückhält; anschließend den Membranfilter auf eine Platte mit dem Chromogenen Coliformen Agar auflegen.

Den Chromogenen Coliformen Agar mit dem Membranfilter bei $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ für (21 ± 3) h bebrüten.

Die β -D-Galactosidase-positiven Kolonien (rosa bis rot) als verdächtige coliforme Bakterien, die nicht *E. coli* sind, zählen. Um falsch positive Ergebnisse, die durch Oxidase-positive Bakterien wie z. B. *Aeromonas* spp. verursacht werden können, zu vermeiden, müssen die verdächtigen Kolonien durch eine negative Oxidase-Reaktion bestätigt werden.

Die β -D-Galactosidase- und β -D-Glucuronidase-positiven Kolonien (dunkelblau bis violett) als *E. coli* zählen.

Die Gesamtanzahl an coliformen Bakterien ist die Summe der Oxidase-negativen rosa bis roten Kolonien und aller dunkelblauen bis violetten Kolonien.

5 Geräte und Glasgefäße

Übliche Ausrüstung für mikrobiologische Laboratorien wie folgt:

5.1 Gerät, geeignet zur Dampfsterilisation (Autoklav), den Anweisungen nach ISO 8199 folgen.

5.2 Brutschrank, thermostatisierbar auf $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

5.3 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ bei $20 ^\circ\text{C}$ bis $25 ^\circ\text{C}$.

5.4 Ausrüstung, zur Membranfiltration.

5.5 Membranfilter, bestehend aus Zelluloseestern oder anderem geeigneten Material, üblicherweise mit einem Durchmesser von 47 mm oder 50 mm, mit Filtrationscharakteristiken, die einem nominalen Porendurchmesser von $0,45 \mu\text{m}$ entsprechen, vorzugsweise mit Gitternetzlinien.

Die Membranfilter müssen frei von wachstumshemmenden oder wachstumsfördernden Eigenschaften sein und die Farbe für das Gitter darf das Wachstum der Bakterien nicht beeinflussen. Falls sie nicht steril erhältlich sind, müssen sie nach den Angaben des Herstellers sterilisiert werden. Jede Charge von Membranfiltern muss auf ihre Eignung für diesen Test nach ISO 7704 geprüft werden, insbesondere, weil die Verwendung unterschiedlicher Membranfilter zu unterschiedlichen Wiederfindungen und Farbentwicklungen führen kann.

5.6 Desinfizierte Pinzetten, zur Handhabung der Membranfilter.

6 Kulturmedien und Reagenzien

Die Herstellung der Kulturmedien und Reagenzien erfolgt nach ISO 8199 und ISO 11133. Es müssen Zutaten von gleichbleibender Qualität und Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ (siehe Anmerkung) verwendet werden; den Anweisungen, die in Anhang B gegeben werden, folgen. Alternativ im Handel erhältliche Medien und Reagenzien verwenden, die den Zusammensetzungen in Anhang B entsprechen und die Angaben des Herstellers genau befolgen.

ANMERKUNG Die Verwendung von Chemikalien anderer Reinheitsgrade ist möglich, wenn nachgewiesen wurde, dass diese in dem Verfahren gleiche Ergebnisse erzielen.

Für die Zubereitung von Kulturmedien destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden, das frei von Substanzen ist, die das Wachstum der Bakterien unter den Testbedingungen hemmen und das den Anforderungen nach ISO 3696 entspricht.