Erfahrungen mit der neuen DIN EN ISO 9308-1 in der Praxis

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

- Aus Sicht der Labore und der Normung -

Bernd Lange, IWW Zentrum Wasser

b.lange@iww-online.de

IWW

Institut an der UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN

Offen im Denken

Definition der coliformen Bakterien

- **Da es sich bei den coliformen Bakterien nicht um eine taxonomisch definierte Gruppe handelt, wurden in der Vergangenheit abhängig vom Nachweisverfahren unterschiedliche Bakterien als coliforme Bakterien erfasst.**

- **Seit Inkrafttreten der DIN EN ISO 9308-1 (12-2014) basieren alle Nachweisverfahren der Normenreihe 9308 auf dem Nachweis der Enzymaktivitäten der ß-D-Galactosidase (Coliforme) und der ß-D-Glucuronidase (*E. coli*).**
  - **Umsetzung des Beschlusses der ISO Arbeitsgruppe „Coliforme“ vom Januar 2006 in London**

Nachweis von coliformen Bakterien / *E. coli* gemäß DIN EN ISO 9308-1 (2014)

100 ml Wasserprobe

↓

Membranfiltration

↓

Membranfilter auf Chromogenen Coliformen-Agar (CCA) auflegen
(36 ± 2) °C, (21 ± 3) h

↓

rosa bis rote Kolonien

↓

Oxidase-Test
(optional TSA (36 ± 2) °C, (21 ± 3) h)

↓

Coliforme Bakterien: rosa bis rote, Oxidase-negative Kolonien und dunkelblaue bis violette Kolonien

dunkelblaue bis violette Kolonien

↓

E. coli

Methodenvergleich ISO 9308-1

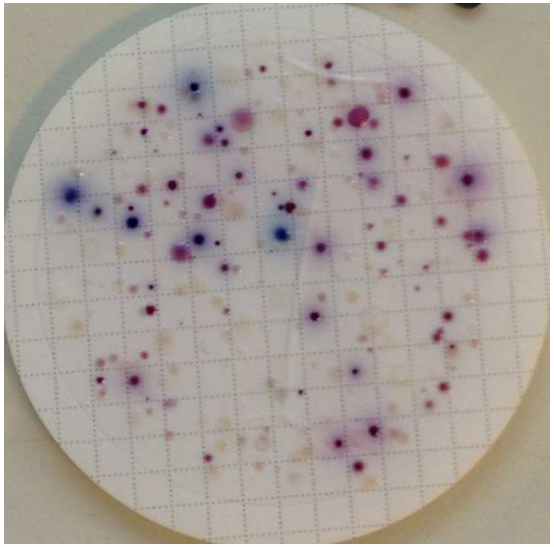
	ISO 9308-1:2001	ISO 9308-1:2014-12
Primärisolierung	Membranfiltration	Membranfiltration
Inkubation	(36 ± 2) °C für 21 ± 3 h	(36 ± 2) °C für 21 ± 3 h
Medium/ver-dächtige Kolonien	Lactose-TTC-Agar Gelbfärbung des Agars	Chromogener Coliformen Agar (CCA) Kolonien pink, rot, blau, violett
	Tergitol-7	Tergitol® 15-S-7
Prinzip / Enzyme	Säurebildung aus Laktose (Coliforme) Indolbildung aus Tryptophan (*E. coli)*	ß-Galactosidase (Coliforme) ß-Glucuronidase (*E.coli*)
Bestätigungstest	Oxidase (negativ) Indoltest ß-Glucuronidase	Oxidase
Dauer	1 - 3 Tage	1 - 2 Tage

Vorteile des Chromogenen Coliformen Agars

- **Die Ergebnisse liegen i.d.R. schon nach einem Tag vor**

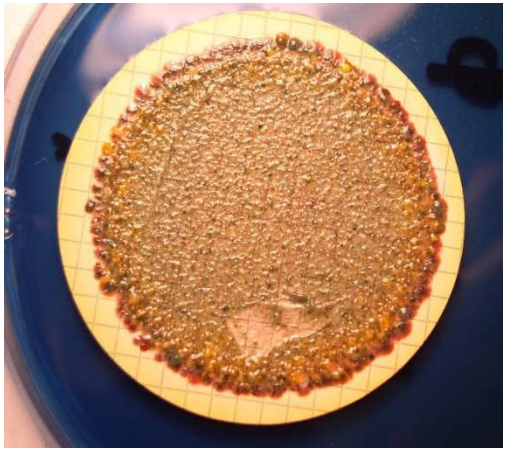
  Ausnahme: Falls es wegen der Begleitflora notwendig ist, vor dem Oxidase-Test eine Subkultur anzulegen, verlängert sich die Untersuchungszeit um einen weiteren Tag.

- **Die chromogenen Substrate erleichtern das Auswerten der Proben**

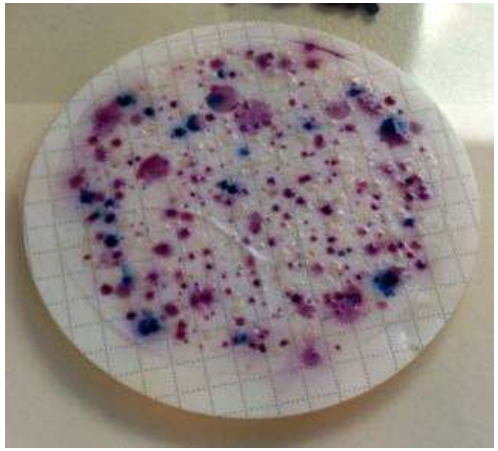


Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars

- **Genau wie beim Laktose-TTC-Agar kann wegen der geringen Selektivität des Nährbodens die Auswertung der Membranfilter durch die Begleitflora gestört werden.**



Laktose-TTC-Agar



Chromogener-Coliformen-Agar

Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars

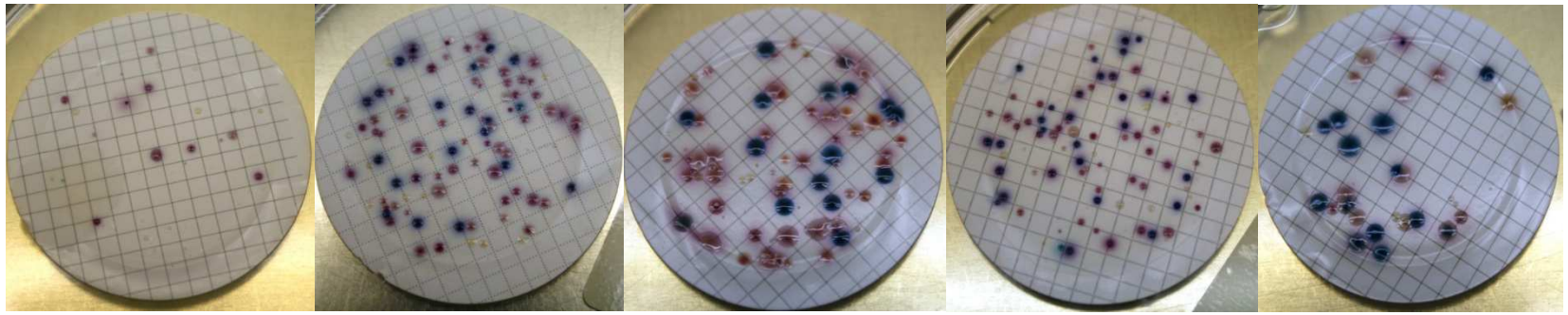
- **Wie bei allen Membranfiltrationsverfahren muss immer die Kombination aus Membranfilter und Nährboden gemäß ISO 11133 chargenweise überprüft werden.**

Tab: Auswirkung der eingesetzten Membranfilter auf die Wiederfindung coliformer Bakterien

Stamm / Nährmedium/Filter	*Escherichia coli* RV Aurich		*Escherichia coli* DSM 787		*Citrobacter freundii* DSM 30039		*Klebsiella pneumoniae* RV Aurich	
Colilert [MPN/100 ml]	78,2		78,2		94,5		101,3	
TSA Filter 1 [KBE/100 ml]	84	83	94	95	74	89	96	93
TSA Filter 2 [KBE/100 ml]	81	73	93	87	67	75	81	86
TSA Filter 3 [KBE/100 ml]	75	88	90	79	78	95	84	92
CCA Filter 1 [KBE/100 ml]	65	95	93	109	97	89	72	94
CCA Filter 2 [KBE/100 ml]	67	74	35	27	64	62	86	68
CCA Filter 3 [KBE/100 ml]	66	75	89	98	84	74	88	89

Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars / Probleme

- Wichtig: Testung der Kombination CCA und Membranfilter
- Deutliche Unterschiede einzelner Nährboden- und Membranfilterqualitäten (in Abhängigkeit von Hersteller und Charge)
- Untersuchung der Produktivität (Vorgaben der ISO 11133)



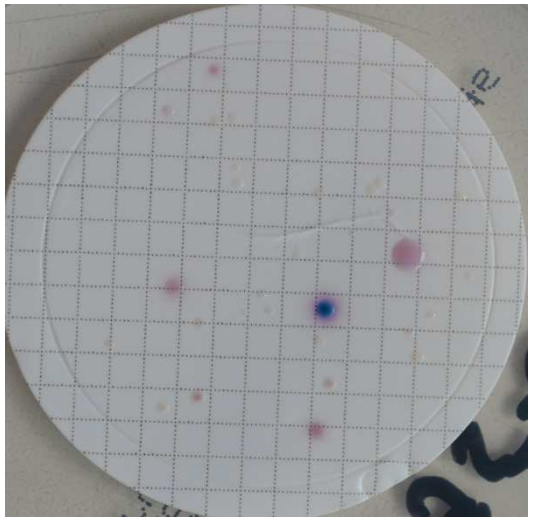
Vergleich Kläranlagenauslauf mit verschiedenen Membran/Nährmedien-Kombinationen

Bilder: C. Schuster, FH Rhein-Main

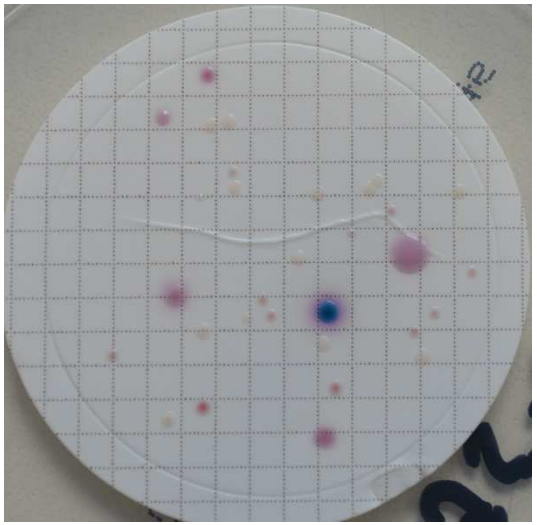
Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars

- **Rosafärbung unterschiedlich deutlich ausgeprägt, je nach Nährbodenqualität**
- **Teilweise verzögerte Galactosidase-Reaktion; daher wird eine Inkubationszeit von 21 h (bei desinfizierten Wässern 24 h) empfohlen.**

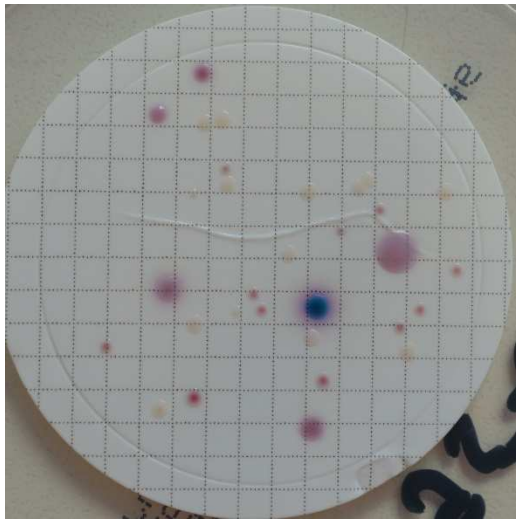
18 h



21 h



24 h



Die Kolonien, bei denen die Rotfärbung erst nach 24 h ablesbar war, waren Oxidase positiv.

Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars

Die Auswertung des Oxidase-Test der roten Kolonien erfordert Erfahrung bei den Labormitarbeitern

Der Teststreifen bzw. das Filterpaper mit dem Oxidase-Reagenz sind während der Reaktionsdauer zu beobachten, ob sich eine blaue oder violette Färbung ausbildet. Die durch die rote Kolonie verursachte Rotfärbung des Filterpapiers ist nicht relevant.

5 sec

10 sec

15 sec

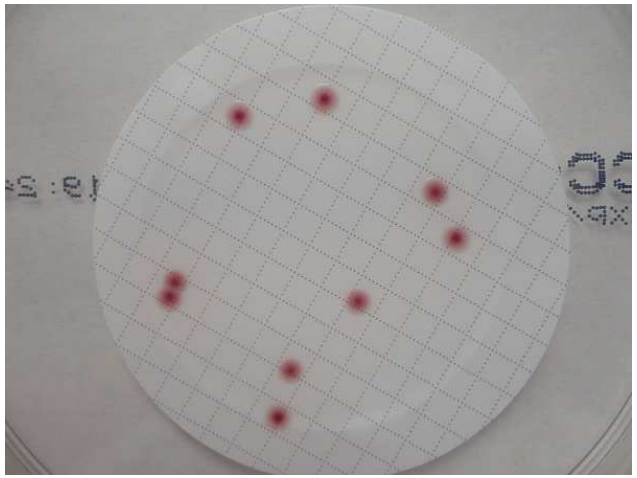
20 sec

25 sec

30 sec

Anmerkungen zur Anwendung des Chromogenen Coliformen Agars

Eine Subkultur der roten/rosa Kolonien auf einem nicht selektiven Vollmedium vereinfacht das Ablesen des Oxidase-Tests.



Bei sehr kleinen Kolonien ist es ebenfalls erforderlich, den Oxidasetest erst nach Subkultivierung durchzuführen

Änderungen der DIN EN ISO 9308-1

Wie auf der Sitzung der ISO/TC 147/SC 4/WG 2 “Coliforme” im Juni 2015 in Conshohocken, Philadelphia, USA beschlossen, werden folgende Änderungen an der Norm vorgenommen:

1. Die Anforderung für die Überprüfung der Selektivität mit *Enterococcus faecalis* wird von “vollständige Hemmung” in “vollständige oder teilweise Hemmung” geändert.

   Hintergrund:

   - Im Rahmen der Validierung des Verfahrens wurde *E. faecalis* direkt auf CCA ausgestrichen. Dabei wird der Stamm vollständig gehemmt.
   - Bei Verwendung des Membranfilterverfahrens kann *E. faecalis* allerdings als sehr kleine farblose bis schwach rosa gefärbte Kolonie auf dem Filter erscheinen.

2. Zur Überprüfung der Selektivität wird ein zweiter *Enterococcus faecalis* Stamm (WDCM 00087) zur Auswahl gestellt.

Änderungen der DIN EN ISO 9308-1

Wie auf der Sitzung der ISO/TC 147/SC 4/WG 2 “Coliforme” im Juni 2015 in Conshohocken, Philadelphia, USA beschlossen, werden folgende Änderungen an der Norm vorgenommen:

3. Die Bebrütungszeit wird von (21 ± 3) Stunden auf 21 bis 24 Stunden eingeschränkt.

   Hintergrund:

   - Es hat sich gezeigt, dass die Anzahl der nachgewiesenen Zielorganismen im Laufe der Bebrütungszeit von 18 bis 24 Stunden signifikant ansteigt. Dieser Anstieg ist innerhalb der ersten 3 Stunden deutlich größer als in der Spanne zwischen 21 und 24 Stunden.

Ab wann muss die aktuelle Fassung der DIN EN ISO 9308-1 umgesetzt werden?

MITTEILUNG

Umwelt Bundesamt

03. Februar 2014

Mitteilung des UBA zu den mikrobiologischen Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001 zur Bestimmung von *Clostridium perfringens* und *E. coli*/coliformen Bakterien

Clostridium perfringens:

Am 1.11.2013 wurde ISO 14189 (Nachweis von *C. perfringens* aus Wasserproben) veröffentlicht. Die ISO-Norm 14189 kann beim Beuth-Verlag in Berlin bezogen werden. Eine deutsche Übersetzung und Übernahme der Norm als EN und DIN ist vorgesehen.

Weiteres Vorgehen:

Da Anlage 5 Teil I TrinkwV 2001 das m-CP-Verfahren als Orientierungshilfe festlegt, andererseits aber auch bereits auf die Annahme weiterer internationaler CEN/ISO-Verfahren abstellt, wird vorgeschlagen, bis zu einer neuen Entscheidung des Verordnungsgebers sowohl das m-CP-Verfahren als auch das Verfahren nach ISO 14189 als zulässige mikrobiologische Analyseverfahren für *C. perfringens* (einschließlich Sporen) zu behandeln.

E. coli/coliforme Bakterien:

Voraussichtlich im Sommer diesen Jahres ändert sich die Norm für das Nachweisverfahren für E. coli/coliforme Bakterien ISO 9308-1 (Lactose TTC-Agar wird durch Chromokult-Coliformen-Agar ersetzt). Ob es für den Einsatz im Laborbereich hier eine Übergangsfrist geben wird, ist noch nicht absehbar.