



Roesebeckstr. 4-6  
30449 Hannover  
Fon 0511/4505-0  
Fax 0511/4505-140

# Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

- › ISO 14189                      C. perfringens
- › ISO 9308-1                    E. coli/Coliforme B.

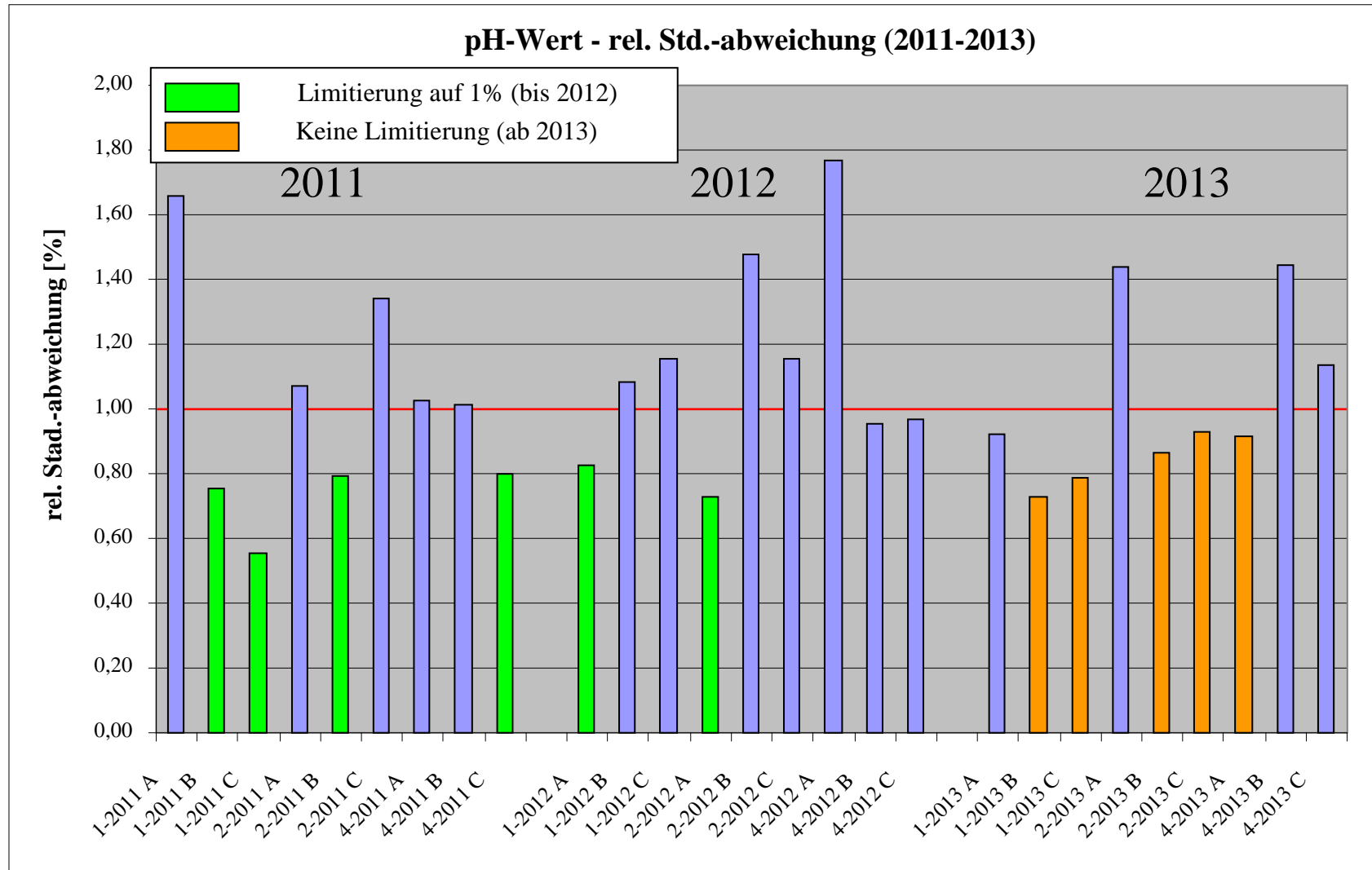


Lüchtenburger Weg 24  
26603 Aurich  
Fon 04941/9171-0  
Fax 04941/9171-10

---

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt  
Bereich: Wasserhygiene  
- Standort Aurich –  
Dr. Katrin Luden

# Chemische Ringversuche 2013



# Einführung neuer Verfahrensnormen

## Richtlinie 98/83/EG des Rates

„Die nachstehenden Verfahrensgrundsätze für mikrobiologische Parameter haben, sofern ein CEN/ISO-Verfahren angegeben ist, Referenzfunktion; andernfalls dienen sie - bis zur etwaigen künftigen Annahme weiterer internationaler CEN/ISO-Verfahren für diese Parameter nach dem Verfahren des Artikels 12 — als Orientierungshilfe.

## TrinkwV 2001 Anlage 5 Teil I

„Die nachstehenden Verfahrensgrundsätze für mikrobiologische Analysen haben Referenzfunktion, sofern ein CEN/ISO-Verfahren angegeben ist; andernfalls dienen sie – bis zur etwaigen künftigen Annahme weiterer internationaler CEN/ISO-Verfahren für diese Parameter \_\_\_\_\_ - als Orientierungshilfe“

## Das Dilemma

- Ab wann ist eine neue Norm bei der Untersuchung mikrobiologischer Parameter im Rahmen der TrinkwV 2001 anzuwenden?
- Gibt es eine Übergangsfrist?
- Erfordert die Einführung eines neuen mikrobiologischen Verfahrens die Vor-Ort-Begutachtung durch die DAkkS?

# 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.

## *C. perfringens*

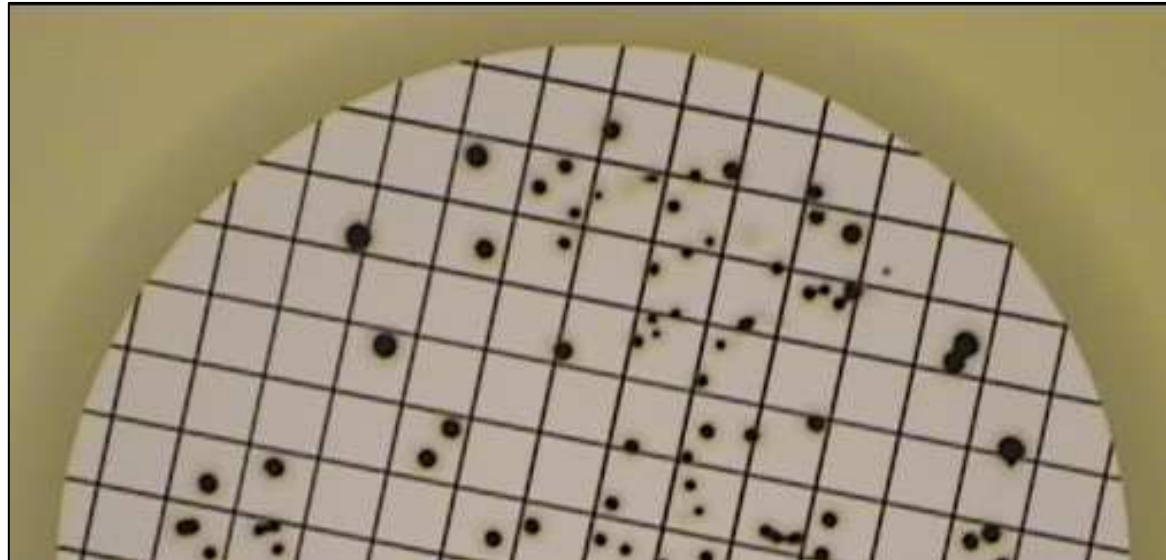
ISO 14189: 2013-11	TrinkwV 2001
Membranfiltration	Membranfiltration
TSC-Agar (Tryptose Sulfite Agar) schwarze, graue, gelb-braun auch schwach gefärbte	mCP-Agar gelbliche Kolonien
44 ± 1 °C	44 ± 1 °C
21 ± 3 Stunden	21 ± 3 Stunden
anaerob	anaerob
D-Cycloserin	D-Cycloserin, PolymyxinB-Sulfat
Bestätigung: Subkultur saure Phosphatase	Bestätigung: Bedampfen (saure Phosphatase)
Gesamtdauer: 2 Tag	Gesamtdauer 1 Tage

## mCP-Agar



<b>Reaktion</b>		<b>Farbumschlag</b>
Saccharose	→ Säure	Bromkresolpurpur: purpur → gelb bei pH 5,2
Phenolphthalein-diphosphat	→ Phenolphthalein	
Alkalisierung durch Ammoniakbedampfung		Phenolphthalein: farblos → rot bei pH 8,2

## TSC-Agar



<i>Reaktion</i>	<b>Farbumschlag</b>
Sulfitreduktion → $\text{H}_2\text{S}$ → FeS  <b>Subkultur</b> auf nichtselektivem Nährmedium  1-Naphtylphosphate disodium + FastBlue B	Eisensulfid: schwarz <b>Achtung:</b> nicht stabil, kann schwach ausfallen  Purpur <b>Achtung:</b> Reagenz instabil



# TSC im Zusatzringversuch 2-2002

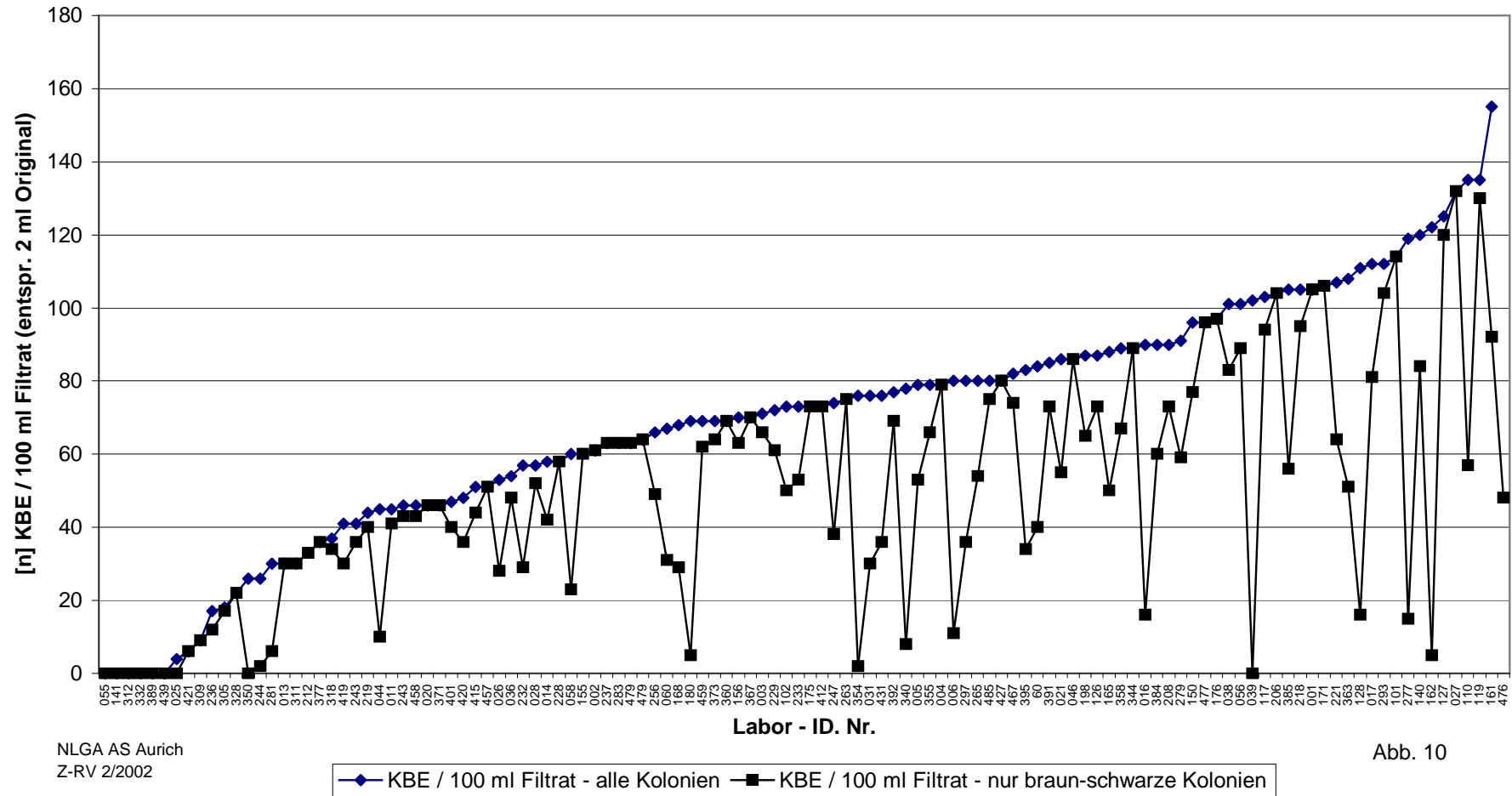


Abb. 10

## neue ISO-Normen

- enthalten Validierungsdaten (falsch positiv/falsch negativ-Rate/Linearer Messbereich...)
- geben Stämme vor zur Qualitätskontrolle
- *Hinweis: ISO 11133 erscheint ebenfalls 2014*

## C. perfringens im Ringversuch

- Parameter wird 2014 2x angeboten (März und Juli)
- Anwendung beider Verfahren möglich
- Anmeldung 2x, wenn beide Verfahren im selben Ringversuch durchgeführt werden sollen (dann Vergabe von 2 Code-Nummern)
- Wechsel des Verfahrens nach Anmeldung führt zum Ausschluss aus der mathematischen Auswertung
  
- Anforderung UBA-Empfehlung: 1 bestandener Ringversuch/Jahr für den Parameter

## E. coli/coliforme Bakterien

ISO 9308-1: 2001	ISO ISO 9308-1: 2014-?
Membranfiltration	Membranfiltration
Lactose-TTC Agar Gelbfärbung des Agars	Chromogenic Coliform Agar (CCA) Kolonien pink, rot, blau, violett
Tergitol-7	Tergitol® 15-S-7
Säurebildung aus Laktose	$\beta$ -Galaktosidase (Colif.) $\beta$ -Glucuronidase (E. coli)
$36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
$21 \pm 3$ Stunden	$21 \pm 3$ Stunden
Oxidase negativ Indoltest $\beta$ -Glucuronidase	Oxidase
Gesamtdauer: 1-3 Tage	Gesamtdauer 1-2 Tag

## E. coli/Coliforme B. im Ringversuch

- Parameter wird 4x angeboten
- Planung: Anwendung des neuen Verfahrens ab Veröffentlichung möglich
- Anmeldung 2x, wenn beide Verfahren im selben Ringversuch durchgeführt werden sollen (dann Vergabe von 2 Code-Nummern)
- Wechsel des Verfahrens nach Anmeldung kann zum Ausschluss aus der mathematischen Auswertung führen
- Anforderung UBA-Empfehlung: 2 bestandene Ringversuche/Jahr für den Parameter

## Fazit

- rechtliche Lage unklar
- frühzeitig neue Methoden testen und etablieren
- NLGA strebt an: Anwendung im Ringversuch möglich, sobald veröffentlicht

## Interpretation TrinkwV 2001 – Variante 1

- Neues ISO-Verfahren muss angewendet werden, sobald es veröffentlicht ist (auf englisch?)
- Voraussetzung für die gültige Anwendung im Rahmen der TrinkwV ist die Akkreditierung
- Aussetzen der Untersuchung bis Akkreditierung für das neue Verfahren vorliegt
  - flexible Akkreditierung                      abhängig vom Labor
  - Dokumentenprüfung                             abhängig von DAkkS kurz
  - Zwischenbegutachtung                         abhängig von DAkkS mittel
  - Reakkreditierung                                bis 5 Jahre

## Interpretation TrinkwV 2001 – Variante 2

- Neues ISO-Verfahren muss angewendet werden, nach Aktualisierung der Anhänge der EU-Richtlinie
- Übergangsfristen für die Umsetzung in nationales Recht werden bei Aktualisierung festgelegt
- Frage der Akkreditierung des Verfahrens wie bei Variante 1