

Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis

Nachweismethoden, Bewertungskriterien,
Qualitätssicherung, Normen

*Herausgegeben von
Irmgard Feuerpfeil und Konrad Botzenhart*



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

**Hygienisch-mikrobiologische
Wasseruntersuchung in der
Praxis**

*Herausgegeben von
Irmgard Feuerpfeil
und Konrad Botzenhart*

***Beachten Sie bitte auch
weitere interessante Titel
zu diesem Thema***

Hein, H., Kunze, W.

Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie
Von der Laborgestaltung bis zur Dateninterpretation

2004

ISBN: 978-3-527-30780-7

Koelle, W.

Wasseranalysen – richtig beurteilt
Grundlagen, Parameter, Wassertypen, Inhaltsstoffe, Grenzwerte
nach Trinkwasserverordnung und EU-Trinkwasserrichtlinie

2003

ISBN: 978-3-527-30661-9

Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, in Gemeinschaft
mit dem Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN e.V. (Hrsg.)

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-,
Abwasser- und Schlamm-Untersuchung**
Physikalische, chemische, biologische und bakteriologische
Verfahren. Aktuelles Grundwerk

Loseblattwerk in Ordner

ISBN: 978-3-527-19010-2

Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis

Nachweismethoden, Bewertungskriterien,
Qualitätssicherung, Normen

*Herausgegeben von
Irmgard Feuerpfeil und Konrad Botzenhart*



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Herausgeber

Dr. Irmgard Feuerpfil

Umweltbundesamt
Fachgebiet II 3.5
Heinrich-Heine-Str. 12
08645 Bad Elster

Prof. Dr. Konrad Botzenhart

Universität Tübingen
Inst. für Med. Mikrobiologie
Wilhelmstr. 31
72074 Tübingen

■ Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Printed in the Federal Republic of Germany

Gedruckt auf säurefreiem Papier

Satz K+V Fotosatz GmbH, Beerfelden

Druck Betz-Druck GmbH, Darmstadt

Bindung Litges & Dopf GmbH, Heppenheim

Cover Design Schulz Grafik-Design, Fußgönheim

ISBN 978-3-527-31569-7

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort XV

Autorenverzeichnis XVII

1	Allgemeines	1
	<i>Konrad Botzenhart und Irmgard Feuerpfel</i>	
1.1	Zielsetzungen	1
2	Methodische Grundlagen	5
	<i>Benedikt Schaefer</i>	5
2.1	Reinigen und Sterilisieren der Labormaterialien	5
	<i>Benedikt Schaefer</i>	
2.1.1	Reinigung	6
2.1.2	Heißluftsterilisation	6
2.1.3	Lagerung von sterilen Labormaterialien	7
2.2	Herstellung und Aufbewahrung von Nährböden	7
	<i>Benedikt Schaefer</i>	
2.2.1	Fertignährböden	8
2.2.2	Zubereitung	8
2.2.3	Sterilisation	9
2.2.4	Lagerung der gebrauchsfertigen Nährböden	9
2.2.5	Konfektionierung	10
2.3	Entsorgung	10
	<i>Benedikt Schaefer</i>	
	Literatur zu Kapitel 2 bis 2.3	11
2.4	Entnahme und Transport von Proben	12
	<i>Peter Schindler</i>	
2.4.1	Allgemeines	12
2.4.2	Probenahmegefäße und Zubehör	13
2.4.3	Probenahmeführerschein	13
2.4.4	Entnahme von Trinkwasser	14
2.4.5	Entnahme von sonstigen Wasserproben	17
2.4.6	Probentransport	18
	Literatur	19

2.5	Mikrobiologisches Messen	19
	<i>Steffen Uhlig</i>	
2.5.1	Einführung	19
2.5.2	Modellierung des Messfehlers	20
2.5.3	Gussplattenverfahren	23
2.5.4	Membranfilterverfahren	24
2.5.5	Most Probable Number-Methode (MPN-Verfahren)	26
2.5.6	Titer-Methode	30
	Literatur	30
2.6	Vergleichbarkeit mikrobiologischer Messmethoden	30
	<i>Steffen Uhlig</i>	
	Literatur	32
2.7	Nationale/internationale Normung	32
	<i>Regine Szewzyk</i>	
2.7.1	Nationale Normung	32
2.7.2	Internationale Normung	33
	Literatur	37
3	Qualitätssicherung	39
	<i>Benedikt Schaefer</i>	39
	Literatur	41
3.1	Laborakkreditierung	
	<i>Haribert Schickling und Jürgen-M. Schulz</i>	41
3.1.1	Ablauf der Akkreditierung	47
3.1.1.1	Antragsverfahren	48
3.1.1.2	Begutachtungsverfahren	49
3.1.1.3	Akkreditierung	49
3.1.1.4	Überwachungsverfahren	50
3.1.2	Anforderungen nach ISO/IEC 17025	50
3.1.3	Schwerpunkte der Begutachtung	54
3.1.3.1	Interne Audits und Managementbewertungen	54
3.1.3.2	Zuverlässiger Umgang mit Referenzstämmen	54
3.1.3.3	Methodenvalidierung	55
3.1.3.4	Eignungsprüfung	56
3.1.3.5	Probenahme	56
3.1.3.6	Unparteilichkeit	57
3.1.3.7	Unterauftrag	58
3.1.4	Hinweis	58
3.2	Mikrobiologische Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle im Rahmen der Trinkwasserverordnung 2001	59
	<i>Ernst-August Heinemeyer und Katrin Luden</i>	
3.2.1	Einleitung	59
3.2.2	Qualität der Präparation im Vergleich	61
3.2.3	Präparation der Proben, Versendung, Auswertung	63
3.2.4	Ergebnisse der teilnehmenden Labore	64

3.2.5	Probleme	65
3.2.6	Coliforme Bakterien und <i>E. coli</i>	65
3.2.7	<i>Clostridium perfringens</i>	67
3.2.8	<i>Legionella</i>	69
3.2.9	Diskussion	70
3.2.10	Ringversuche und Messunsicherheit	71
3.2.11	Top-down-Ansatz (Beispiel: Nachweis von <i>Legionella</i>)	72
3.2.12	Bottom-up Ansatz – Messunsicherheit nach VAM	74
3.2.13	Messunsicherheit nach EUROLAB	75
3.2.14	Folgerungen	76
	Literatur	77
4	Bakteriologische Wasseruntersuchung	79
4.1	Koloniezahl	79
	<i>Irmgard Feuerpfeil</i>	
4.1.1	Begriffsbestimmung	79
4.1.2	Anwendungsbereich	79
4.1.3	Nährböden	81
4.1.3.1	Nähragar	82
4.1.3.2	Hefeextraktagar (nach DIN EN ISO 6222, 1999)	82
4.1.4	Untersuchungsgang	82
4.1.5	Störungsquellen	83
4.1.6	Auswertung	84
4.1.7	Angabe der Ergebnisse	84
	Literatur	85
4.2	<i>E. coli</i> -coliforme Bakterien (einschließlich pathogener Varianten)	85
	<i>Peter Schindler</i>	
4.2.1	Begriffsbestimmung	85
4.2.2	Anwendungsbereich	87
4.2.3	Nährböden und Reagenzien	88
4.2.3.1	Nährböden und Reagenzien für Trinkwasser	88
4.2.3.2	Nährböden und Reagenzien zur Untersuchung von Mineral-, Quell- und Tafelwasser	90
4.2.3.3	Nährböden und Reagenzien für Schwimmbeckenwasser	92
4.2.3.4	Nährböden und Reagenzien für Oberflächenwasser	93
4.2.3.5	Nährböden und Reagenzien für sonstige Untersuchungen	93
4.2.4	Untersuchungsgang	93
4.2.4.1	Untersuchung von Trinkwasser nach TrinkwV 2001 mit dem Referenzverfahren mit Lactose-TTC-Agar durch Membranfiltration (nach DIN EN ISO 9308-1, 2001)	93
4.2.4.2	Untersuchung von Trinkwasser (TrinkwV 2001) mit dem anerkannten Alternativverfahren Colilert®-18/Quanti-Tray® mittels MPN-Flüssiganreicherung	99
4.2.4.3	Untersuchung von Mineral-, Quell- und Tafelwasser	103

- 4.2.4.4 Untersuchung von Schwimmbeckenwasser
(nach DIN 19643, 1997) 106
- 4.2.4.5 Untersuchung von Badegewässern auf *E. coli*
nach der EG-Richtlinie 2006/7/EG 106
- 4.2.4.6 Untersuchung von Oberflächengewässern auf Coliforme 108
- 4.2.4.7 Weitere Untersuchungsverfahren 109
- 4.2.4.8 Untersuchung sonstiger Proben 112
- 4.2.5 Störungsquellen 112
- 4.2.6 Auswertung 113
- 4.2.7 Angabe der Ergebnisse 113
- 4.2.8 Künftige Methoden 114
Literatur 114
- 4.3 Weitere Enterobakterien 116
Peter Schindler
- 4.3.1 Salmonellen 116
- 4.3.1.1 Begriffsbestimmung 116
- 4.3.1.2 Anwendungsbereich 117
- 4.3.1.3 Nährmedien und Reagenzien 117
- 4.3.1.4 Untersuchungsgang 123
- 4.3.1.5 Weitere Methoden 129
- 4.3.1.6 Störungsquellen 129
- 4.3.1.7 Auswertung 130
- 4.3.1.8 Angabe der Ergebnisse 130
Literatur 131
- 4.3.2 *Yersinia* 132
Irmgard Feuerpfeil
- 4.3.2.1 Begriffsbestimmung 132
- 4.3.2.2 Anwendungsbereich 132
- 4.3.2.3 Nährböden und Reagenzien 133
- 4.3.2.4 Untersuchungsgang 136
- 4.3.2.5 Störungsquellen 139
- 4.3.2.6 Auswertung 140
- 4.3.2.7 Angabe der Ergebnisse 140
Literatur 141
- 4.4 Enterokokken 142
Irmgard Feuerpfeil
- 4.4.1 Begriffsbestimmung 142
- 4.4.2 Anwendungsbereich 142
- 4.4.3 Nährböden 143
- 4.4.4 Untersuchungsgang 146
- 4.4.4.1 Nachweisverfahren nach Mineral- und Tafelwasserverordnung 147
- 4.4.4.2 Membranfiltration (Untersuchung von Trinkwasser) 149
- 4.4.5 Störungsquellen 153
- 4.4.6 Auswertung 154

- 4.4.7 Angabe der Ergebnisse 154
Literatur 155
- 4.5 Clostridien 156
Annette Hummel
 - 4.5.1 Begriffsbestimmung 156
 - 4.5.2 Anwendungsbereich 156
 - 4.5.3 Nährmedien und Reagenzien 158
 - 4.5.4 Nachweismethode 161
 - 4.5.4.1 Nachweisverfahren für sulfitreduzierende sporenbildende
Anaerobier: Flüssigkeitsanreicherung und Membranfiltration 161
 - 4.5.4.2 Nachweisverfahren für *C. perfringens* nach Trinkwasserverordnung
2001 (m-CP-Agar) 164
Literatur 167
- 4.6 *Pseudomonas aeruginosa* 168
Konrad Botzenhart
 - 4.6.1 Begriffsbestimmung 168
 - 4.6.2 Anwendungsbereich 170
 - 4.6.3 Nachweisverfahren nach DIN EN 12780 (2002) 171
 - 4.6.3.1 Grundlagen 171
 - 4.6.3.2 Nährmedien und Reagenzien 172
 - 4.6.3.3 Untersuchungsgang 174
 - 4.6.3.4 Zählung 176
 - 4.6.3.5 Angabe der Ergebnisse und Untersuchungsbericht 176
 - 4.6.4 Nachweisverfahren nach Mineral- und Tafelwasserverordnung 177
 - 4.6.4.1 Grundlagen 177
 - 4.6.4.2 Nährböden und Reagenzien 178
 - 4.6.4.3 Untersuchungsgang 179
 - 4.6.5 Störungsquellen, zusätzliche Hinweise 179
Literatur 181
- 4.7 *Aeromonas* 182
Irmgard Feuerpfel
 - 4.7.1 Begriffsbestimmung 182
 - 4.7.2 Anwendungsbereich 182
 - 4.7.3 Nährböden und Reagenzien 183
 - 4.7.4 Untersuchungsgang 185
 - 4.7.4.1 Flüssigkeitsanreicherungsverfahren 185
 - 4.7.4.2 Membranfiltrationsverfahren 187
 - 4.7.5 Störungsquellen 187
 - 4.7.6 Auswertung 188
 - 4.7.7 Angabe der Ergebnisse 189
Literatur 189
- 4.8 *Campylobacter* 190
Annette Hummel
 - 4.8.1 Begriffsbestimmung 190
 - 4.8.2 Anwendungsbereich 191

4.8.3	Nährmedien und Reagenzien	192
4.8.4	Untersuchungsgang	195
4.8.5	Störungsquellen	200
4.8.6	Auswertung und Angabe der Ergebnisse	200
	Literatur	202
4.9	Legionellen	203
	<i>Benedikt Schaefer</i>	
4.9.1	Begriffsbestimmung	203
4.9.2	Anwendungsbereich	203
4.9.3	Nährböden und Reagenzien	205
4.9.4	Untersuchungsgang	206
4.9.4.1	Probenahme	208
4.9.4.2	Direktausstrich	210
4.9.4.3	Membranfiltrationsverfahren	211
4.9.4.4	Inkubation und Auswertung	211
4.9.4.5	Zentrifugationsverfahren	212
4.9.5	Störungsquellen	212
4.9.6	Auswertung und Angabe der Ergebnisse	213
	Literatur	213
4.10	Atypische Mykobakterien	214
	<i>Roland Schulze-Röbbcke</i>	
4.10.1	Begriffsbestimmung	214
4.10.2	Anwendungsbereich	215
4.10.3	Nährböden und Reagenzien	215
4.10.3.1	Reagenzien für die Dekontamination	215
4.10.3.2	Löwenstein-Jensen-Medium (LJ)	215
4.10.3.3	Middlebrook-7H10-Agar mit OADC-Anreicherung und Glycerin (7H10)	216
4.10.3.4	Reagenzien für die Ziehl-Neelsen-Färbung	216
4.10.4	Untersuchungsgang	216
4.10.4.1	Dekontamination des Probenmaterials	218
4.10.4.2	Anreicherung des Probenmaterials durch Filtration	218
4.10.4.3	Kulturelle Anzüchtung	220
4.10.4.4	Abgrenzung von anderen Bakteriengattungen und Differenzierung	221
4.10.5	Störungsquellen	222
4.10.6	Auswertung	223
4.10.7	Angabe der Ergebnisse	223
	Literatur	223
4.11	Nachweis von <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> und anderen <i>Vibrio</i> -Arten	224
	<i>Martin Exner, Gerhard Hauk und Andrea Rechenburg</i>	
4.11.1	Begriffsbestimmung	224
4.11.2	Anwendungsbereich	225
4.11.3	Geräte, Nährmedien und Reagenzien	225

4.11.3.1	Benötigte Geräte	225
4.11.3.2	Nährböden und Reagenzien	225
4.11.3.3	Weitere Medien	226
4.11.4	Untersuchungsgang	226
4.11.4.1	Probenansatz zum Nachweis von <i>V. cholerae</i>	227
4.11.4.2	Probenansatz zum Nachweis von <i>V. vulnificus</i>	227
4.11.5	Auswertung	229
4.11.6	Differenzierung	230
4.11.6.1	Nachweis von <i>V. cholerae</i>	230
4.11.6.2	Nachweis von <i>V. vulnificus</i>	230
4.11.6.3	Biochemische Reaktionen	232
4.11.7	Angabe der Ergebnisse	232
4.11.8	Qualitätssicherung	232
	Literatur	232
5	Virologische und protozoologische Wasseruntersuchungen	233
5.1	Bakteriophagen	233
	<i>Stefanie Huber</i>	
5.1.1	Begriffsbestimmung	233
5.1.2	Anwendungsbereich	233
5.1.3	Nährmedien und Reagenzien	235
5.1.3.1	Medien für den Nachweis von FRNA-Phagen	236
5.1.3.2	Medien für den Nachweis somatischer Coliphagen	237
5.1.4	Untersuchungsgang	238
5.1.4.1	Nachweis von FRNA-Bakteriophagen	239
5.1.4.2	Nachweis von somatischen Coliphagen	241
5.1.4.3	Proben mit sehr geringen Phagenzahlen	242
5.1.5	Störungsquellen	243
5.1.6	Auswertung und Angabe der Ergebnisse	244
	Literatur	244
5.2	Enterale oder enteropathogene Viren	246
	<i>Jens Fleischer</i>	
5.2.1	Begriffsbestimmung	246
5.2.2	Anwendungsbereich	247
5.2.2.1	Viruskonzentrationen im Abwasser	247
5.2.3	Anreicherung von Viren aus Wasserproben	248
5.2.3.1	Filtration durch elektropositive Filter (Virosorb-1 MDS)	249
5.2.3.2	Filtration über Glaswolle-gepackte Säulen	250
5.2.4	Quantifizierungsmethoden auf Zellkultur	253
5.2.4.1	Plaque-Forming-Units (PFU)-Test für den direkten Nachweis von Enteroviren oder anderen enteropathogenen Viren auf Zell-Monolayern	255
5.2.4.2	Quantifizierung nach dem Most-Probable-Number (MPN) Verfahren	257
5.2.4.3	Quantifizierung nach Tissue Culture Infective Dose 50 (TCID ₅₀)	258

5.2.5	Nukleinsäure-Extraktion mittels Silicapartikeln	258
5.2.5.1	Nukleinsäure-Extraktion mittels Silicapartikeln	258
5.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	259
5.2.5.3	PCR-Beispiele	261
5.2.5.4	Agarose-Gel-Elektrophorese	268
5.2.6	3-stufiges Untersuchungsschema Wasserviologie	270
5.2.7	Störungsquellen	270
5.2.8	Angabe der Ergebnisse	270
	Literatur	270
5.3	Cryptosporidien und Giardien	274
	<i>Albrecht Wiedenmann</i>	
5.3.1	Begriffsbestimmung	274
5.3.2	Anwendungsbereich	276
5.3.3	Auswahl einer geeigneten Methode	276
5.3.4	Prüfung der Sinnhaftigkeit einer Untersuchung auf Cryptosporidien und Giardien	278
5.3.5	Prinzipielle Verfahrensschritte	278
5.3.6	Spezielle Geräte und Reagenzien	279
5.3.6.1	Ermittlung der Wiederfindungsrate	279
5.3.6.2	Probennahme	279
5.3.6.3	Filtration	279
5.3.6.4	Transport	281
5.3.6.5	Filterelution	281
5.3.6.6	Eluatkonzentrierung	281
5.3.6.7	Separation	281
5.3.6.8	Detektion	282
5.3.6.9	Reinigung und Desinfektion der Geräte	282
5.3.7	Untersuchungsgang	282
5.3.7.1	Ermittlung der Wiederfindungsrate	282
5.3.7.2	Probengewinnung und Transport	283
5.3.7.3	Filterelution	285
5.3.7.4	Eluatkonzentrierung	285
5.3.7.5	Immunomagnetische Separation	285
5.3.7.6	FITC-MAB Markierung und mikroskopischer Nachweis	286
5.3.7.7	Desinfektion und Reinigung der Geräte	286
5.3.7.8	Auswertung	287
5.3.8	Störungsquellen	289
5.3.9	Angabe der Ergebnisse	291
5.3.10	Interne Qualitätskontrolle	291
5.3.11	Externe Qualitätskontrolle	291
5.3.12	Laborakkreditierung	292
5.3.13	Alternativ-Verfahren, weitergehende Diagnostik und Methoden-Entwicklungen	292
	Literatur	293

- 6 Molekularbiologische Methoden 297**
Konrad Botzenhart
- 6.1 Molekularbiologische Verfahren mit praktischer Bedeutung
(nach Köster et al. 2003) 298
- 6.1.1 Nachweis von Antigenen der gesuchten Mikroorganismen durch spezifische Antikörper 298
- 6.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopie 298
- 6.1.3 Durchflusszytometrie, Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) 299
- 6.1.4 Immunomagnetische Separation (IMS) 299
- 6.1.5 Molekulare Hybridisierung (MH) 299
- 6.1.6 Restriktionsfragmentkartierung, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) 300
- 6.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 300
- 6.1.8 DNA Chip Array, Biochips 302
- 6.1.9 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) 302
- 6.2 Praktische Bedeutung 304
Literatur 304
- 7 Spezifische Kriterien 305**
- 7.1 Untersuchung des Einflusses von Werkstoffen auf die Vermehrung von Mikroorganismen im Trink- und Badewasserbereich in der Praxis und im Laborversuch 305
Dirk Schoenen
- 7.1.1 Einleitung 305
- 7.1.2 Untersuchungen der Besiedlung bzw. Bewuchsbildung in der Praxis 307
- 7.1.3 Exposition von Testkörpern und Untersuchung der Bewuchsbildung unter Laborbedingungen 308
- 7.1.4 Beurteilung nach dem DVGW Arbeitsblatt W270 310
- 7.1.5 Andere Beurteilungsverfahren 312
- 7.1.6 Ausblick 313
Literatur 313
- 7.2 Bakterienvermehrungspotential 315
Beate Hambsch und Peter Werner
- 7.2.1 Begriffsbestimmung 315
- 7.2.2 Anwendungsbereich 316
- 7.2.3 Geräte und Chemikalien 316
- 7.2.3.1 Geräte 316
- 7.2.3.2 Chemikalien 317
- 7.2.4 Untersuchungsgang 318
- 7.2.4.1 Allgemeines 318
- 7.2.4.2 Vorbereitung der Wasserproben 318
- 7.2.4.3 Herstellung des Inokulums und Animpfung der vorbereiteten Wasserprobe 320

- 7.2.4.4 Registrierung der Wachstumskurven 320
- 7.2.4.5 Zusätzliche Analysen 321
- 7.2.5 Störungsquellen 321
- 7.2.6 Auswertung 322
- 7.2.7 Angabe der Ergebnisse 322
 - Literatur 323

8 Bewertung 325

Konrad Botzenhart und Irmgard Feuerpfeil

- 8.1 Trinkwasser 325
 - 8.1.1 Indikatorbakterien 327
 - 8.1.2 Koloniezahl 328
 - 8.1.3 E. coli 329
 - 8.1.4 Coliforme Bakterien 331
 - 8.1.5 Enterokokken 332
 - 8.1.6 Clostridien 333
 - 8.1.7 Pathogene Bakterien 334
 - 8.1.8 Salmonellen 335
 - 8.1.9 Shigellen 336
 - 8.1.10 Vibrio cholerae, Vibrio vulnificus und weitere Vibrionen 337
 - 8.1.11 Campylobacter 338
 - 8.1.12 Yersinien 339
 - 8.1.13 Pseudomonas aeruginosa 340
 - 8.1.14 Aeromonaden 341
 - 8.1.15 Legionellen 342
 - 8.1.16 Atypische Mykobakterien 343
- 8.2 Enterale Viren, Coliphagen 344
- 8.3 Cryptosporidium und Giardia 345
- 8.4 Mikrobieller Bewuchs/Biofilme 347
- 8.5 Qualitätssicherung 347
- 8.6 Badewasser 348
 - 8.6.1 Badegewässer 349
 - 8.6.2 Kleinbadeteiche 350
 - 8.6.3 Wasser in Beckenbädern 352
- 8.7 Mineral-, Quell- und Tafelwasser 352
- 8.8 Rohwasse 353
 - Literatur 355

9 Anhang 359

Irmgard Feuerpfeil

Sachregister 367

Geleitwort

Trinkwasser muss frei sein von Krankheitserregern

So streng diese grundsätzliche Forderung der Hygiene ist, so schwierig sie in letzter Konsequenz in der Praxis der Trinkwasserversorgung in voller Konsequenz umzusetzen ist, so profitiert die Praxis doch von der Tatsache, dass Krankheitserreger im Trinkwasser fast immer die Folge einer Kontamination mit tierischen oder menschlichen Abgängen sind.

Im Vergleich zur chemischen Analyse hat die Mikrobiologie den unschätzbaren Vorteil, über einen Indikator zu verfügen, um nicht auf alle erdenklichen Krankheitserreger prüfen zu müssen: *E. coli*. Eine Differenzierung war von untergeordnetem Interesse, solange enteropathogene *E. coli* (z. B. EHEC) keine besondere Aufmerksamkeit erforderten.

Für den Praktiker wäre es natürlich erfreulich, wenn es dabei bliebe. Dieser Standpunkt wurde viele Jahrzehnte in der Praxis vertreten und so konnten sich Fachbücher wie das von Karl Höll auf einige wenige Bestimmungsmethoden beschränken, einschließlich der Koloniezahl auf Nährböden bei verschiedenen Temperaturen und dem Nachweis der so genannten Coliformen, was immer darunter zu verstehen sein mag. Nun haben sich die wissenschaftlichen Erkenntnisse weiterentwickelt und neben den Indikatoren haben eine große Zahl von Pathogenen zunächst ein wissenschaftliches und darüber hinaus auch ein praktisches Interesse gefunden. Oder umgekehrt: so lange keine praktikablen Nachweismethoden vorlagen, mussten mit überdehnten Vermutungen, um nicht zu sagen Spekulationen, Schlussfolgerungen aus den Befunden von Indikatororganismen hilfsweise abgeleitet werden.

Die Weiterentwicklung von mikrobiologischen Nachweismethoden ist also nicht nur wissenschaftlichem Interesse sondern auch praktischer Notwendigkeit geschuldet. Die Methodik hat inzwischen einen solchen Umfang erreicht, dass sie schon seit einiger Zeit nicht mehr in Wasserlehrbüchern abgehandelt werden kann, sondern eine eigenständige Sammlung erfordert. Diesem Ziel dient das vorliegende Buch. Es ist die Fortentwicklung einer ersten umfassenden Methodensammlung für das Wasserfach des vormaligen Instituts für Hygiene und Mikrobiologie in Bad Elster, der jetzigen Dienststelle des Umweltbundesamtes und Teil seiner Trinkwasserabteilung.

Auf eine Besonderheit sei noch hingewiesen: Grundsätzlich ist neben dem tatsächlichen Nachweis von Krankheitserregern auch und besonders die Indikation der Reinheit, also der Abwesenheit von Indikatororganismen, das Ziel der mikrobiologischen Untersuchung zur seuchenhygienischen Bewertung der Wasserqualität. Unter diesem Aspekt kommt es nicht so sehr auf wissenschaftliche Genauigkeit bei der Erfassung einer Gruppe von Bakterien an, als auf die Zuverlässigkeit und Einfachheit der Bestimmung. Gemeint sind die Coliformen. Hierüber besteht eine wissenschaftliche Meinungsvielfalt, der die Praxis etwas verständnislos gegenübersteht. Einen Ausweg aus einer solchen Vielfalt, die durchaus ihre Berechtigung haben kann und die im vorliegenden Buch reflektiert wird, kann nur ein normativer Konsens bieten, der entweder in internationalen Standards oder in besonderen Fällen als Legaldefinition in einer Rechtsnorm, also in der Trinkwasserverordnung, eingebracht wird. Die Entwicklung unterschiedlicher kommerzieller Methoden für den mikrobiologischen Nachweis wird zwar die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren. Das ist aber für die Eigenkontrolle des Trinkwassers hinnehmbar, wenn dafür die immer noch viel zu lange Zeit zwischen dem Ansatz der mikrobiologischen Probe und dem Vorliegen eines Ergebnisses abgekürzt werden kann, wenn keine falsch negativen Ergebnisse erzielt werden und wenn im Zweifel eine Legaldefinition dessen, was als maßgeblicher Befund zu werten ist, herangezogen werden kann.

Hygiene des Trinkwassers ist ein weltweites Problem und die mikrobiologische Überwachung überall erforderlich. Eine entsprechend weite Verbreitung wird dem vorliegenden Buch gewünscht.

Berlin, November 2007

Prof. Dr. Andreas Grohmann

Autorenverzeichnis

Konrad Botzenhart

Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene
Wilhelmstraße 31
72074 Tübingen

Martin Exner

Hygiene Institut der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Straße 25
53105 Bonn

Irmgard Feuerpfeil

Umweltbundesamt
Fachgebiet II 3.5
„Mikrobiologie des Trink-
und Badebeckenwassers“
Heinrich-Heine-Straße 12
08645 Bad Elster

Jens Fleischer

Regierungspräsidium Stuttgart
Landesgesundheitsamt
Referat 93 – Wasserhygiene
Nordbahnhofstraße 135
70191 Stuttgart

Andreas Grohmann

Holbeinstr. 17
12203 Berlin

Beate Hambsch

DVGW – Technologiezentrum Wasser
(TZW) Abteilung Mikrobiologie
Karlsruher Straße 84
76139 Karlsruhe

Gerhard Hauk

Facharzt für Hygiene
und Umweltmedizin
Landesamt für Gesundheit
und Soziales MV
Abteilung 3
Gertrudenstraße 11
18057 Rostock

Ernst-August Heinemeyer

Niedersächsisches
Landesgesundheitsamt
Außenstelle Aurich
Lüchtenburger Weg 24
26603 Aurich

Stefanie Huber

Bayerisches Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit
Sachgebiet Umweltmikrobiologie (S5)
Veterinärstraße 2
85764 Oberschleißheim

Annette Hummel

Umweltbundesamt
Fachgebiet II 3.5
„Mikrobiologie des Trink-
und Badebeckenwassers“
Heinrich-Heine-Straße 12
08645 Bad Elster

Katrin Luden

Niedersächsisches
Landesgesundheitsamt
Außenstelle Aurich
Lüchtenburger Weg 24
26603 Aurich

Andrea Rechenburg

Hygiene Institut der Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53105 Bonn

Roland Schulze Röbbcke

Universitätsklinikum Düsseldorf
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Krankenhaushygiene
Universitätsstr. 1
40225 Düsseldorf

Benedikt Schaefer

Umweltbundesamt
Dienstgebäude Bad Elster
FG II 3.5
Heinrich-Heine-Straße 12
08645 Bad Elster

Haribert Schickling

AKS Staatliche Akkreditierungsstelle
Hannover
Calenberger Straße 2
30169 Hannover

Peter Schindler

Landesuntersuchungsamt
für das Gesundheitswesen Südbayern
Veterinärstraße 2
85764 Oberschleißheim

Oliver Schneider

Regierungspräsidium Stuttgart
Landesgesundheitsamt
Referat 93 – Wasserhygiene
Nordbahnhofstraße 135
70191 Stuttgart

Dirk Schoenen

Hygiene-Institut der Universität
Sigmund-Freud-Straße 25
53127 Bonn

Jürgen-M. Schulz

AKS Staatliche Akkreditierungsstelle
Hannover
Calenberger Straße 2
30169 Hannover

Regine Szewzyk

Umweltbundesamt
FG II 1.4
Corrensplatz 1
14195 Berlin

Steffen Uhlig

quo data Gesellschaft für Qualitäts-
management und Statistik mbH
Kaitzer Straße 135
01187 Dresden

Peter Werner

Institut für Abfallwirtschaft
und Altlasten
Technische Universität Dresden
Pratzschwitzerstr. 15
01796 Pirna

Albrecht Wiedenmann

Gesundheitsamt des
Landkreises Esslingen
Sachgebiet Infektionsschutz
und Umwelthygiene
Beblinger Str. 2
73728 Esslingen

1

Allgemeines

Konrad Botzenhart und Irmgard Feuerpfeil

Zum Schutz der menschlichen Gesundheit kommt der Sicherung der Trinkwasserversorgung eine hohe Bedeutung zu. Krankheitserreger können über das Trinkwasser wie durch kein anderes Medium in großen Teilen der Bevölkerung verteilt werden. Durch die Schaffung großer, zentraler Wasserversorgungen können gleichzeitig viele Menschen erkranken, wenn ein mit Krankheitserregern belastetes Trinkwasser verteilt wird. Um derartige Gesundheitsgefährdungen auszuschließen, sind strenge Anforderungen an das Trinkwasser festgelegt.

Bereits am 16. Juni 1906 veröffentlichte das Kaiserliche Gesundheitsamt die „Anleitung für die Errichtung, den Bau und die Überwachung öffentlicher Wasserversorgungsanlagen, welche nicht ausschließlich technischen Zwecken dienen“. Damit wurde vor 100 Jahren ein Ordnungsrahmen für die Trinkwasserhygiene in Deutschland geschaffen, der nicht an Aktualität eingebüßt hat. In der dazu entwickelten Strategie spielten bereits die bakteriologische Untersuchung des Trinkwassers und das Indikatorprinzip eine hervorragende Rolle.

Das Erkennen der Zusammenhänge zwischen Seuchenausbrüchen und Wasserqualität war eng verbunden mit der Entwicklung der bakteriologischen Untersuchungsverfahren für Trinkwasser.

Neuere Entwicklungen seit Bekanntmachung der EG-Richtlinie zur „Qualität des Wassers für den menschlichen Gebrauch“ (98/83/EG, 1998) wurden in der TrinkwV 2001 in nationales Recht umgesetzt.

Mit der Bezeichnung „Wasser für den menschlichen Gebrauch“ wurde durch die EG-Richtlinie und die TrinkwV 2001 der Geltungsbereich dahingehend erweitert, dass nicht nur das Wasser zum Trinken hohen Anforderungen im hygienischen Sinn gerecht werden muss, sondern die gleichen Anforderungen an das Wasser zur Körperreinigung, zur Zubereitung von Speisen und zum Wäschewaschen eingehalten werden müssen.

Um in der EG und auch in Deutschland vergleichbare Untersuchungsergebnisse zu erhalten, wurden in der EG-Richtlinie und in der TrinkwV 2001 für die mikrobiologischen Parameter die Untersuchungsverfahren, die Untersuchungsvolumina, die Untersuchungshäufigkeit und die Stelle der Einhaltung der Parameterwerte verbindlich vorgeschrieben.

Die Untersuchungsverfahren sind in den meisten Fällen genormt. Die in den letzten Jahrzehnten zur Untersuchung der Trink- und Badewasserproben eingesetzten Verfahren waren sog. „presence-absence“ Tests und wiesen die Mikroorganismen nur qualitativ nach. Die neuen Anforderungen an die Überwachung mit konzentrationsabhängiger Bewertung erfordern Untersuchungsverfahren, die eine quantitative Bestimmung der Parameter ermöglichen.

Durch die Einführung generell neuer Referenzmethoden zum Nachweis der mikrobiologischen Überwachungsparameter gibt es auch in dieser Hinsicht für Deutschland Neuerungen.

Im Falle der Bestimmung von *E. coli* werden z. B. durch Änderung des Nachweisprinzips jetzt auch anaerogene *E. coli* mit erfasst.

Das neue Nachweisverfahren für Enterokokken grenzt die nach TrinkwV 1990 bestimmte physiologische Gruppe der Fäkalstreptokokken auf den Nachweis von 4 typisch „fäkalen“ Enterokokkenarten ein.

Ebenso wird mit der Bestimmung von *C. perfringens* der „fäkale“ Vertreter der Clostridien anstatt der physiologischen Gruppe „sulfitreduzierende sporenbildende Anaerobier“ erfasst.

Neu ist auch, dass nach § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001 die Anwendung anderer, alternativer Methoden ermöglicht wird, sofern sie gleichwertige Ergebnisse zum Referenzverfahren (nach DIN EN ISO 17994) liefern.

Die Entwicklung führt neuerdings zu Methoden, mit denen typische Enzymwirkungen durch chromogene oder fluorogene Substrate nachgewiesen werden.

Die Trinkwasserinstallation von öffentlichen Gebäuden wurde verstärkt in die Überwachung der Trinkwasserqualität einbezogen, um neu erkannte Gefährdungen durch Biofilme und Wiederverkeimungen nach der Verteilung des Trinkwassers unter den Bedingungen der Hausinstallation erkennen und wirkungsvoll bekämpfen zu können. Hier kommt der Trinkwasserinstallation in medizinischen Einrichtungen, wie Krankenhäusern und Pflegeheimen, insbesondere Kontaminationen mit Legionellen und *P. aeruginosa*, besondere Bedeutung zu. Diese nicht fäkal bedingten Krankheitserreger werden durch das Indikatorprinzip nicht erfasst und müssen innerhalb der Überwachung direkt untersucht werden. Im Falle der Legionellen wurde erstmals die direkte Bestimmung eines Krankheitserregers in der TrinkwV 2001 gefordert. Legionellen und *P. aeruginosa* sind aber auch in die Überwachung von nach DIN 19643 betriebenen Beckenbädern einbezogen worden.

Im Falle weiterer Krankheitserreger, wie wasserübertragbarer Viren oder Parasitendauerformen, ist eine sog. „Endproduktkontrolle“ des Trinkwassers zur Überwachung aus methodischen Gründen nicht sinnvoll, zu aufwendig und zu kostenintensiv.

Hier sollten zur Risikoabschätzung vor möglichen Kontaminationen des Trinkwassers sog. „water safety plans“, die durch die WHO vorgeschlagen wurden, eingesetzt werden.

Die „Endproduktkontrolle“ des Trinkwassers wird hier ersetzt bzw. ergänzt durch die „Prozesskontrolle“ mit Ermittlung der Rohwasserbelastung durch sog. Indexpathogene (z. B. *Campylobacter*) und Bestimmung der Reduktionsraten durch die Trinkwasseraufbereitungsverfahren mittels Indikatoren.

Auch für die Badegewässer gibt es seit 2006 eine neue EG-Richtlinie (2006/7/EG, 2006), deren Vorgaben in deutsches Recht umgesetzt werden müssen. Hier sind ebenfalls wesentliche Neuerungen zu beachten, die auf den verbesserten Gesundheitsschutz der Badenden gerichtet sind. Unter anderem werden ebenfalls neue mikrobiologische Überwachungsparameter und Nachweisverfahren vorgegeben.

Die mikrobiologischen Untersuchungen zur Überwachung der Trink- und Badewasserqualität erfordern von den Untersuchungsstellen auch die Einhaltung neuer Qualitätskriterien – sie müssen eine Akkreditierung nachweisen. Damit soll sichergestellt werden, dass die Labore mit hoher Zuverlässigkeit und Sachkenntnis die Untersuchung der Wasserproben, einschließlich der Probenahme, nach den vorgeschriebenen Nachweisverfahren und Normen durchführen.

Die fachlich kompetente Untersuchung der Wasserproben, die Befundinterpretation durch den Amtsarzt oder in speziellen Fällen gemeinsam mit einem dafür geeigneten Hygieneinstitut stellen sicher, dass den Verbrauchern ein den Anforderungen der TrinkwV 2001 und weiterer technischer Regeln entsprechendes Trinkwasser zur Verfügung gestellt werden kann. Dies gilt in gleichem Maße für die Qualität des Badewassers.

Zu Fragen der hygienisch-mikrobiologischen Untersuchung der Wasserproben und zur Befundbewertung sollen die Beiträge in diesem Buch Antworten und Unterstützung geben.

2

Methodische Grundlagen

Benedikt Schaefer

Die gesetzlichen Rahmenbestimmungen zum Betrieb eines Labors für mikrobiologische Wasseruntersuchungen umfassen neben den Arbeitsschutzbestimmungen auch seuchenrechtliche Aspekte. Da bei der Anzucht von Mikroorganismen aus Umweltproben nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch pathogene Erreger angereichert werden, sind die Bestimmungen des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) zu beachten. Eine Ausnahme kann man für Laboratorien annehmen, in denen nur Koloniezahlbestimmungen, Untersuchungen auf das Vorkommen von *E. coli* und coliforme Keime und auf intestinale Enterokokken durchgeführt werden. Bei allen anderen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass im Labor mit Krankheitserregern umgegangen werden muss, beispielsweise im Rahmen der Qualitätssicherung (Positivkontrollen, Ringversuchsproben). Die wichtigste Voraussetzung für den Umgang mit Krankheitserregern ist eine entsprechende Erlaubnis für den Laborleiter gemäß § 44 Infektionsschutzgesetz (IfSG). Die geplante Aufnahme von Tätigkeiten mit Krankheitserregern ist gemäß § 49 IfSG anzeigepflichtig.

Laboratorien, die Untersuchungen gemäß Trinkwasserverordnung (TrinkwV) durchführen, müssen gemäß § 15 Abs. 4 von der zuständigen Behörde des jeweiligen Bundeslandes dafür zugelassen sein. Voraussetzung für die Zulassung ist eine Akkreditierung (s. a. Kapitel 3.1).

2.1

Reinigen und Sterilisieren der Labormaterialien

Benedikt Schaefer

Vor der Beschaffung von Labormaterialien ist die grundsätzliche Frage zu klären, ob Einwegmaterial oder wieder verwendbare Artikel verwendet werden sollen. Einwegmaterial ist in der Regel gebrauchsfertig und wird nach Gebrauch entsorgt. Das führt zu großen Mengen Müll. Die Kosten für die Müllentsorgung müssen bei der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung berücksichtigt werden. Das

Waschen der wieder verwendbaren Materialien erfordert den Einsatz von Arbeitszeit, Waschwasser und Reinigungsmitteln.

Petrischalen sind aus Kunststoff oder aus Glas. Glaspetrischalen werden vor Befüllen mit Nährboden durch Heißluft sterilisiert, Kunststoffpetrischalen genügen bei üblichen Verwendungszwecken ohne weitere Sterilisation den Anforderungen. Bei längeren Inkubationszeiten wie zum Beispiel bei der Untersuchung auf Legionellen sollte strahlensterilisierten Petrischalen der Vorzug gegeben werden.

2.1.1

Reinigung

Glasgeräte und wieder verwendbare Kunststoffartikel werden grundsätzlich vor jedem Gebrauch, auch vor dem Erstgebrauch, mit handelsüblichen Spülmitteln heiß gewaschen. Vorteilhaft ist die Verwendung von Laborglas-Waschautomaten mit den dazugehörigen Spezialwaschmitteln. Für die verschiedenartigen Glasgefäße und Geräte gibt es Wascheinsätze. Besonders für die Innenreinigung von engen Röhren wie Glaspipetten sind dafür konstruierte Wascheinsätze unverzichtbar. Bei manuellem Waschen ist unter Waschmittelzugabe ebenfalls heiß zu waschen. Hier empfiehlt sich mehrmaliges Nachspülen mit heißem Wasser. Wichtig für die Sauberkeit des Glases ist ein abschließendes Klarspülen mit Wasser von hoher Reinheit. Für mikrobiologische Untersuchungen reicht in der Regel das Spülen mit destilliertem Wasser oder vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) aus.

2.1.2

Heißluftsterilisation

Nach dem Waschen wird das Glas im Trockenschrank getrocknet und anschließend in Heißluftsterilisatoren sterilisiert. Öffnungen bei Flaschen, Kolben u.ä. werden vor der Sterilisation mit Verschlüssen oder mit Aluminiumfolie abgedeckt. Verschlüsse müssen dabei locker sitzen, um ein Platzen der Gefäße zu vermeiden (Ausnahme: Autoklav mit Stützdruck). Bei Verwendung von Glasflaschen mit Schliffstopfen ist zwischen Flaschenschliff und Stopfen ein schmaler Streifen Aluminiumfolie oder Papier anzubringen. Das Ende des Streifens wird dazu umgeknickt und vor Einsetzen des Stopfens in die Flaschenöffnung gehängt. Den danach eingesetzten Stopfen deckt man mit Aluminiumfolie ab, so dass Verschluss und Flaschenhals bedeckt sind. Geräte, wie Pinzetten oder Spatel, werden in ein Becherglas gegeben, und der Behälter wird mit Aluminiumfolie abgedeckt. Bei geringem Verbrauch können Kleingeräte auch in größeren Petrischalen oder einzeln in Aluminiumfolie gewickelt sterilisiert werden.

Beim Beschicken eines Heißluftsterilisators ist darauf zu achten, ob das Material die erforderlichen hohen Temperaturen verträgt. Probleme bereiten dabei insbesondere Kunststoffartikel und Stopfen aus Zellstoff. Materialien, die nicht mindestens 160 °C vertragen, sollten durch Autoklavieren sterilisiert werden (s. a. Abschnitt 2.2.3). Bei Kunststoffteilen, die Erhitzung vertragen, ist häufig die

maximal zulässige Temperatur eingeprägt oder aufgedruckt. Die gebräuchlichen Laborflaschen mit blauen Schraubverschlüssen und Ausgießringen können nur bis 140 °C autoklaviert werden; gleiche Flaschen mit etwas teureren roten Verschlüssen und Ausgießringen können bis 200 °C erhitzt werden. Wenn Kunststoffartikel nicht mit der Angabe der maximal zulässigen Temperatur gekennzeichnet sind, helfen Nachfragen bei der Bezugsquelle weiter.

Die Hitzesterilisation kann durch Einwirkzeiten von mindestens zwei Stunden bei 160 °C, einer Stunde bei 170 °C oder einer halben Stunde bei 180 °C erfolgen. Siehe hierzu auch die Hinweise in der DIN EN ISO 19458 (2006) oder im Deutsches Arzneibuch (DAB, 2006). Besonders bei großen Heißluftsterilisatoren ist die Aufheizzeit zu berücksichtigen. Auch ist darauf zu achten, dass die Luftumwälzung im Heißluftsterilisator nicht zu sehr durch dichte Beschickung behindert wird. An allen Wänden muss entsprechender Abstand eingehalten werden, bei großen Geräten sollte auch in der Mitte eine Schneise für Luftumwälzung freigelassen werden. Der Erfolg der Heißluftsterilisation ist mit Indikatoren regelmäßig zu überprüfen.

2.1.3

Lagerung von sterilen Labormaterialien

Es ist darauf zu achten, dass einmal sterilisierte Artikel nicht unbegrenzt lange steril bleiben. Glaspetrischalen müssen spätestens nach einer Woche Lagerung erneut sterilisiert werden, andere Laborartikel in der Regel nach einem Monat. Bereits sterilisierte Labormaterialien sind so zu lagern, dass immer die Artikel mit der längsten Lagerzeit zum Gebrauch entnommen werden. Es soll verhindert werden, dass nur ein Teil der Materialien umgeschlagen wird und der nicht umgeschlagene Rest überlagert wird. Als Merksatz hierzu hat sich der Begriff „LIFO“ (Last In Last Out) etabliert. Die Länge der Lagerzeit ist für die verschiedenen Materialien durch Sterilkontrollen zu evaluieren und zu dokumentieren.

2.2

Herstellung und Aufbewahrung von Nährböden

Benedikt Schaefer

Die Herstellung der Nährböden ist in den einzelnen Kapiteln im Zusammenhang mit der Beschreibung des Untersuchungsverfahrens detailliert beschrieben. Hier sollen einige grundlegende Bemerkungen genügen. Hinweise finden sich auch in den Normen ISO/TS 11133-1 sowie dem Entwurf ISO 11133-2. Beide Normen gelten für Nährmedien aus der Lebensmittelmikrobiologie. Derzeit wird daran gearbeitet, die beiden Teile zu einer neuen einteiligen ISO 11133 mit Geltungsbereich für Lebensmittelmikrobiologie und Wassermikrobiologie fortzuentwickeln. Diese Norm wird Hinweise zu Qualitätskontrollen beim Hersteller sowie beim Verbraucher von Nährmedien enthalten. Dazu wird eine Liste

mit Referenzstämmen aufgenommen, die für qualitative oder quantitative Qualitätskontrollen einzusetzen sind.

Nährmedien sind hitzeempfindlich. Sie sollten daher so schonend wie möglich erwärmt und autoklaviert werden. Die Gefäße für die Zubereitung von Nährmedien sollten so groß gewählt werden, dass der Inhalt auf einmal verbraucht wird.

2.2.1

Fertignährböden

Die Vorschrift zur Verwendung von Fertignährböden ist normalerweise auf den Behältern zu finden, in denen sie gekauft werden. Hersteller von mikrobiologischen Medien oder einzelnen Bestandteilen bieten häufig ein Buch über die Verwendung, Zubereitung und Zusammensetzung der Medien an. Da Angaben zur Charge und zum Haltbarkeitsdatum auf der Handlungspackung zu finden sind, sollten die Medien nicht umgefüllt werden. Die Größe der Packungseinheiten und die jeweils bestellte Menge müssen sich am Verbrauch orientieren. Die Lagerung erfolgt trocken und dunkel bei Raumtemperatur in den dicht verschlossenen Behältern. Nach Überschreiten des Mindesthaltbarkeitsdatums dürfen Medien und ihre Bestandteile nicht mehr verwendet werden. Verklumpte Pulver und Granulate sind zu verwerfen. Es werden gebrauchsfertige Petrischalen, Kolben, Flaschen oder Nährkartonscheiben mit verschiedenen Nährmedien angeboten. Bei allen Produkten dieser Art wird die Verwendung vom Hersteller genau beschrieben. Trotz großer Anstrengungen der Hersteller zur Chargenkontrolle ist eine Eingangskontrolle der Fertignährböden beim Kunden unverzichtbar. Sinnvoll ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von Regelkarten zur Überprüfung des möglichen Einflusses von Chargenwechseln auf das Untersuchungsergebnis (s. Kapitel 3). Dabei sollten die Nährböden so überprüft werden, wie es dem späteren Einsatz bei Untersuchungsaufträgen entspricht. So muss zum Beispiel bei Medien, die für Membranfiltrationen eingesetzt werden, auch die Chargenkontrolle mit Membranfiltrationsansätzen durchgeführt werden.

2.2.2

Zubereitung

Die meisten Nährmedien werden in Pulver- oder Granulatform angeboten. Diese werden gegebenenfalls mit den weiteren Bestandteilen des Mediums in ein genügend großes Gefäß eingewogen und durch Zugabe von entsalztem oder frisch destilliertem Wasser aufgeschlämmt. Die Bestandteile werden durch Umschütteln und bei agarhaltigen Medien nach ca. 20-minütigem Quellenlassen durch Erhitzen im Dampftopf gelöst. Erst wenn die Lösung homogen ist, kann der pH-Wert mittels Indikatorpapier oder hitzebeständiger Elektrode kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden. Dabei ist die Abhängigkeit des pH-Wertes von der Temperatur zu beachten. Nach Einstellen des pH-Wertes wird mit Aqua dest. zum End-

volumen aufgefüllt. Als Gefäße für die Zubereitung von Nährmedien haben sich neben Glaskolben und „Nährbodenflaschen“, die mit Kappen oder Stopfen verschlossen werden, auch Laborglasflaschen mit Schraubverschluss durchgesetzt.

2.2.3

Sterilisation

Sie ist im Anschluss an die Bereitung des Nährbodens erforderlich, weil Peptone bzw. Trockennährboden immer in geringem Maße keimhaltig oder sporenhaltig sind. Die Sterilisation erfolgt im Autoklav bei 121 °C in 15–20 min. Die Zeitspanne vom Erreichen der Sterilisationstemperatur am Thermometer des Autoklaven bis zum Erreichen der Sterilisationstemperatur im Nährboden, die sog. Ausgleichszeit, beträgt bei kleinen Volumina (bis 50 ml) etwa 3 min. Dies fällt kaum ins Gewicht. Die Ausgleichszeit beträgt jedoch bei einem Liter etwa 20 min. Daher ist von dem Ansatz größerer Volumina als einem Liter abzusehen. Wenn ein Autoklav ohne Stützdruck verwendet wird, empfiehlt es sich, ein Volumen Nährboden in einem doppelt so großen Gefäß zu autoklavieren, also z. B. 1 l in einer 2 l-Flasche. Bei flüssigem Beschickungsgut ist eine Deckelverriegelung vorgeschrieben, die ein Öffnen des Gerätes erst erlaubt, wenn das Beschickungsgut auf Temperaturen unter 80 °C abgekühlt ist. Das soll verhindern, dass es zum Siedeverzug und damit zur Gefährdung des Personals kommen kann. Die Kontrolle der Temperatur des Beschickungsgutes muss dabei mit einem Messfühler in einem Referenzgefäß erfolgen. Wenn diese direkte Kontrolle der Flüssigkeitstemperatur nicht möglich ist (z. B. bei alten Autoklaven oder Autoklaven mit einem geringen Kammervolumen), muss die Kammertemperatur auf 50–60 °C gefallen sein, bevor der Deckel geöffnet werden darf. Der Erfolg des Autoklavierens ist wie bei der Heißluftsterilisation durch geeignete Indikatoren zu überprüfen.

Empfindliche Nährböden, besonders zuckerhaltige, werden für 30 min bei maximal 110 °C oder fraktioniert an drei aufeinanderfolgenden Tagen für 30 min bei 100 °C im strömenden Wasserdampf sterilisiert. Für Sterilisation bei Atmosphärendruck kann auch ein Dampftopf eingesetzt werden. Zur Herstellung von Agarplatten ist der Nährboden nach dem Autoklavieren in einem Wasserbad auf 48–50 °C abzukühlen und dann in sterile Petrischalen auszugießen. Wird zu heiß gegossen, bildet sich sehr viel Kondenswasser. Müssen nach der Sterilisation dem Nährboden hitzeunverträgliche Substanzen oder deren sterilfiltrierte Lösungen zugegeben werden, so sind sterile Arbeitsbedingungen und die in der Gebrauchsanweisung vorgeschriebene Temperatur einzuhalten.

2.2.4

Lagerung der gebrauchsfertigen Nährböden

Nährböden sollten nach der Herstellung nicht unnötig gelagert, sondern bedarfsgerecht jeweils frisch zubereitet werden. Wenn eine Lagerung notwendig erscheint, sollten die sterilen Flüssignährmedien in dicht verschlossenen Gefäßen bei 4–8 °C dunkel aufbewahrt werden.

Vor der Verwendung ist das Medium auf Anzeichen einer Kontamination wie zum Beispiel Trübung oder Kahmhautbildung zu kontrollieren. Agarhaltige Nährböden sollten in Petrischalen gegossen und ebenfalls bei 4–8 °C aufbewahrt werden. Die Petrischalen müssen bei längerer Lagerung vor Austrocknung geschützt werden, z. B. in einem Plastikbeutel.

Wie bei anderen sterilen Labormaterialien ist die maximale Lagerzeit der Nährmedien in Petrischalen oder anderen Gefäßen festzulegen und zu dokumentieren. Auch für die Lagerung gebrauchsfertiger Nährböden muss sichergestellt sein, dass keine überlagerten Materialien verwendet werden (s. Abschnitt 2.1.3).

Vor der Verwendung müssen Petrischalen auf Raumtemperatur erwärmt und erforderlichenfalls getrocknet werden. Die Schalen werden dazu mit dem Deckel nach unten für einige Minuten bis zu einer halben Stunde in einen Brutschrank gelegt und die Unterteile etwas seitlich schräg auf die Deckel gesetzt.

2.2.5

Konfektionierung

Im mikrobiologischen Wasserlabor werden üblicherweise Petrischalen mit ca. 90 mm Durchmesser eingesetzt. Diese Petrischalen werden mit ca. 15–20 ml agarhaltigem Nährmedium befüllt. Eine zu geringe Füllmenge kann erhebliche Auswirkungen auf das Wachstum von Bakterien haben. Eventuell sich an der Oberfläche des Mediums bildende Luftblasen können durch Fächeln mit der Bunsenbrennerflamme entfernt werden. Hierbei ist besonders bei der Verwendung von Kunststoffschalen Vorsicht angebracht. Zur Herstellung von Röhrrchen mit Flüssigmedium für die Untersuchung auf Gasbildung durch Bakterien, müssen diese Röhrrchen vor oder nach Füllung mit Flüssigmedium so mit den Gärröhrrchen (sog. Durham-Röhrrchen) versehen werden, dass die Öffnung der Gärröhrrchen nach unten zeigt. Um die Sterilität zu gewährleisten und gleichzeitig die Luft aus den Röhrrchen zu treiben, müssen die so gefüllten Röhrrchen autoklaviert werden. Wenn aus Gründen der Nährbodenstabilität ein Dampftopf benutzt wird, ist mehrfach zu erhitzen und anschließend zu kontrollieren, ob die Luft vollständig aus den Gärröhrrchen verdrängt worden ist.

2.3

Entsorgung

Benedikt Schaefer

Alle bei mikrobiologischen Wasseruntersuchungen verwendeten Materialien sind nach Benutzung ordnungsgemäß zu entsorgen. Dabei ist davon auszugehen, dass alle Gegenstände mit Krankheitserregern kontaminiert sein können. Aus Gründen der Arbeitssicherheit und auch zur Vereinfachung der Arbeitsorganisation werden ausnahmslos alle Abfälle und alle verwendeten Laborgeräte und Gefäße autoklaviert. Eine chemische Desinfektion ist nicht mehr Stand der