

## Bepaling van totaal kiemgetal

## INHOUD

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b>	<b>4</b>
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.1.1	Autoclaaf 121 ± 3°C	4
4.1.2	Warmwaterbad afgestemd zodat het YEA medium in het gebruikte recipiënt voldoet aan 45 ± 1°C	4
4.1.3	Incubator 22 ± 2°C	4
4.1.4	Incubator 36 ± 2°C	4
4.1.5	Schudtoestel	4
4.1.6	Vortex	4
4.1.7	Kolonietelapparaat	4
4.1.8	Pipetus akku	4
4.1.9	Veiligheidskabinet	4
4.1.10	Koelkast 3 ± 2°C	4
4.2	<i>Materiaal</i>	4
4.2.1	Automatische pipet van 1000µl met steriele tips met filter	4
4.2.2	Glazen tubes en flessen	4
4.2.3	Wegwerppipetten	4
4.2.4	Steriele petriplaten	4
<b>5</b>	<b>REAGENTIA en bereidingen</b>	<b>4</b>
5.1	<i>Reagentia</i>	4
5.1.1	Yeast extract agar YEA	4
5.1.2	Ringer 1/40 oplossing	4
5.1.3	Umonium <sup>38</sup> 2,5% (of gelijkwaardig biocide)	4
5.1.4	gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)	4
5.1.5	ultra puur water	4
5.1.6	referentie bacterie	4
5.2	<i>Bereidingen</i>	4
5.2.1	Yeast extract agar	4
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b>	<b>5</b>
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Analyse via de gietplaatmethode</i>	5
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b>	<b>6</b>
<b>8</b>	<b>Rapportering</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>REFERENTIES</b>	<b>7</b>

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water, grondwater, afvalwater, oppervlaktewater en recreatiewater.

Bepaling van de parameter totaal kiemgetal in water bij 22°C en 36°C (ISO 6222).

Een aangewende analysemethode dient conform de normmethode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

Totaal kiemgetal of leefbare telling van water omvat alle cultiveerbare aërobe bacteriën, gisten en schimmels die kolonies vormen in het medium yeast extract agar volgens de hieronder beschreven omstandigheden.

Theoretisch kan de aanwezigheid van één kolonievormende eenheid per ml bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

## 2 PRINCIPE

Een monster, en/of verdunningen ervan worden rechtstreeks via de gietplaatmethode (inoculatie van het monster in een specifiek groeimedium in petriplaten) geanalyseerd. De platen worden geïncubeerd bij 22°C en bij 36°C.

Het aantal kve worden per ml bij een welbepaalde temperatuur bepaald.

## 3 OPMERKINGEN

Voor het bereiden van verdunningen en het inoculeren wordt er gewerkt in een veiligheidskabinet (4.1.9).

De besmette vaste afval (petriplaten, doekjes, pipettips...) worden in een speciale daartoe bestemde container verwijderd. Na het waarnemen van de resultaten worden de resterende monsters en suspensies verwijderd als vloeibare bacterie-afval.

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium<sup>38</sup> (5.1.3) en nadien met 70% ethanol (5.1.4).

Na het gieten van het YEA (5.1.1) agarmedium in petriplaten, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een veiligheidskabinet (4.1.9) of in een droogstoof. Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

## 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

### 4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf  $121 \pm 3^\circ\text{C}$
- 4.1.2 Warmwaterbad afgestemd zodat het YEA medium in het gebruikte recipiënt voldoet aan  $45 \pm 1^\circ\text{C}$
- 4.1.3 Incubator  $22 \pm 2^\circ\text{C}$
- 4.1.4 Incubator  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- 4.1.5 Schudtoestel
- 4.1.6 Vortex
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Pipetus akku
- 4.1.9 Veiligheidskabinet
- 4.1.10 Koelkast  $3 \pm 2^\circ\text{C}$

### 4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Automatische pipet van 1000 $\mu\text{l}$  met steriele tips met filter
- 4.2.2 Glazen tubes en flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten
- 4.2.4 Steriele petriplaten

## 5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

### 5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Yeast extract agar YEA
- 5.1.2 Ringer 1/40 oplossing<sup>1</sup>
- 5.1.3 Umonium<sup>38</sup> 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.4 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.5 ultra puur water
- 5.1.6 referentie bacterie

### 5.2 BEREIDINGEN

#### 5.2.1 YEAST EXTRACT AGAR

Los YEA (5.1.1) in ultra puur water (5.1.5), autoclaveer (4.1.1) bij  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  gedurende  $15 \pm 1$  minuten en breng de recipiënten (flessen of tubes 4.2.2) onmiddellijk in een warmwaterbad (4.1.1) tot het medium volledig op temperatuur van  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  gekomen is (nodige tijd te valideren en maximum 4 uren).

---

<sup>1</sup> Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/40 andere diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater of steriel demiwater.

Indien de YEA niet dagvers gebruikt wordt, stockeer het gestold medium gedurende maximum 3 maanden in een koelkast (4.1.10). Smelt het medium op vóór gebruik en breng in een warmwaterbad (4.1.1) tot het medium volledig op temperatuur van  $45\pm 1^\circ\text{C}$  gekomen is (voorwaarden zie hierboven).

## 6 PROCEDURE

### 6.1 MONSTERVEROORBEREIDING

Een monster wordt zo snel mogelijk bij aankomst in het laboratorium geanalyseerd, en maximaal gedurende 24 uur na bemonstering bewaard in een koelkast bij  $3\pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.10).

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.5) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt -indien nodig- een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd  $10^0$  tot  $10^{-2}$ , of van  $10^{-1}$  tot  $10^{-3}$ .

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.8) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in tubes (4.2.2) gevuld met 9 ml (of een veelvoud hiervan) steriele Ringer 1/40 (5.1.2) waaraan 1 ml (of een veelvoud hiervan) van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met vortex (4.1.6).
- in flessen (4.2.2) gevuld met 900 ml steriele Ringer 1/40 (voor ringtestmonsters) (5.1.2) waaraan 100 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.5).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

### 6.2 ANALYSE VIA DE GIETPLAATMETHODE

Volgens ISO 6222 is theoretisch het aantal platen dat per verdunning en per temperatuur in enkelvoud voldoende, maar het is aanbevolen om twee platen per temperatuur te testen.

- Identificeer telkens één/twee petriplaten (4.2.4) per temperatuur voor elke verdunning.
- Nadat het te analyseren monster goed gehomogeniseerd is, inoculeer de platen bestemd voor de twee incubatietemperaturen telkens met 1 ml van elke verdunning aan de hand van een automatische pipet (4.2.1) met steriele tip. Voeg hieraan 15 - 20 ml vloeibare YEA.
- Na grondig vermengen door cirkelvormige beweging worden de platen gedroogd in de veiligheidskabinet (4.1.9) door de deksels dakpansgewijs op een half open petrischaal te verplaatsen (zie punt 3).
- Incubeer de platen geïnverteerd in een incubator van:
  - $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.4) gedurende 40 - 48 h.
  - $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.3) gedurende 64 - 72 h.
- Lees de platen zo vlug mogelijk af na verwijderen uit de incubator, zoniet bewaar ze eerst in de koelkast (4.1.10) en lees ze af binnen de 48 uur.
- Elimineer elke schaal die een confluerende groei vertoont.
- Tel de kolonies met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.7), en bepaal (indien twee platen werden geïnoculeerd) de gemiddelde waarde van de kolonie-aantallen, en dit voor beide temperaturen. De ideale uitplating bevat tussen 25 en 300 kolonies.

## 7 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: blanco YEA bij 22°C en bij 36°C en indien verdunningen zijn uitgevoerd, YEA met 1 ml Ringer 1/40 bij 22°C en bij 36°C. Deze controles worden gelijktijdig de analyses ingezet.

Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie bacterie (5.1.6).

De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.

Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet aan de vooropgestelde verwachtingen voldoen, of de blanco controle een positief resultaat (>3 kve/ml) geeft, wordt de proef als niet betrouwbaar beschouwd. De test wordt dan opnieuw uitgevoerd. Ook indien onjuiste verdunningen van een monster zijn ingezet.

De analyseverantwoordelijke volgt de test op en beslist over de geldigheid van de resultaten.

Validatie van de analysemethode: herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid testen.

De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

## 8 RAPPORTERING

Bepaal voor elke temperatuur de kve waarden per ml watermonster **aan de hand van onderstaande berekening**.

Overgroeide telplaten mogen niet worden beoordeeld.

### **Berekening van het resultaat**

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s$$

$C_s$  is het aantal kve / ml monster

$Z$  is de som van de kolonies geteld op een gietplaat van de verschillende diluties  $d_1, d_2, \dots, d_i$

$V_s$  is het referentievolumen om de concentratie van het aantal micro-organismen in het monster uit te drukken (= 1ml)

$V_{tot}$  is berekend totaal volume van het monster overkomstig de getelde platen:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$$

met

$n_1, n_2, \dots, n_i$  is het aantal platen geteld met dilutie  $d_1, d_2, \dots, d_i$

$V_1, V_2, \dots, V_i$  is het getest volume met dilutie  $d_1, d_2, \dots, d_i$

$d_1, d_2, \dots, d_i$  is de dilutie van het getest volume  $V_1, V_2, \dots, V_i$  ( $d = 1$  voor een onverdund monster,  $d = 0,1$  voor een 1/10 verdunning enz.).

Het eindresultaat is dus functie van het gemiddelde per verdunning van het resultaat op elke plaat.

Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monster, wordt het resultaat als < 1 kve / ml of als 0 kve / ml weergegeven.

Indien meer dan 300 kolonies op de geïnculeerde platen met de grootste verdunning  $10^x$  voorkomen, wordt het resultaat als benaderend weergegeven (geschat aantal  $>3,0 \cdot 10^{x+2}$  kve/ml).

Het resultaat wordt uitgedrukt als een waarde tussen 1,0 en 9,9.  $10^x$  kve/ml.

**Rapport**

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de gebruikte methode
- (incubatietijd) en -temperatuur
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

**9 REFERENTIES**

- ISO 6222 (1999) Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- NPR 6267 (2002/07) Toelichting bij NEN-EN-ISO 6222:1999. Water - Telling van kweekbare micro-organismen – Bepaling van het koloniegetal door enting in voedingsbodem van gistextract.
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.