

4 APPARATUUR EN MATERIAAL

4.1 APPARATUUR

- 4.1.1 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 4.1.2 Warmwaterbad afgestemd zodat het YEA medium in het gebruikte recipiënt voldoet aan 45 ± 1°C
- 4.1.3 Incubator 22 ± 2°C
- 4.1.4 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.5 Schudtoestel
- 4.1.6 Vortex
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Pipetus akku
- 4.1.9 Veiligheidskabinet

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Automatische pipet van 1000µl 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 oplossing¹
- 5.1.3 Umonium³⁸ 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±3°C gedurende 15±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±1°C gekomen is (nodige tijd te valideren en maximum 4 uren).

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

¹ 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.

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 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 confluyente groei vertoond.
- 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 RAPPORTERING

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

Overgroeide telplaten mogen niet worden beoordeeld.

7.1 BEREKENING VAN HET RESULTAAT

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

Cs 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

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

Vtot 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 $9,9 \cdot 10^x$ kve/ml.

7.2 RAPPORT

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monsternamen
- de verwijzing naar de gebruikte methode bvb. de betreffende WAC methode
- (incubatietijd) en -temperatuur
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

8 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 8199:2018 Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters.