Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023

http://www.emis.vito.be

Bepaling van totaal kiemgetal

INHOUD

1 TOEPASSINGSGEBIED 3

2 PRINCIPE 3

3 OPMERKINGEN 3

4 APPARATUUR EN MATERIAAL 4

4.1 Apparatuur 4

4.2 Materiaal 4

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN 4

5.1 Reagentia 4

5.2 Bereidingen 4

5.2.1 Yeast extract agar 4

5.2.2 EasyDisc YEA 5

6 PROCEDURE 5

6.1 Monstervoorbereiding 5

6.2 Analyse 5

6.3 Incubatie 6

7 RAPPORTERING 6

7.1 Berekening van het resultaat 6

7.2 Rapport 7

8 REFERENTIES 7

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023

http://www.emis.vito.be

emis

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023

http://www.emis.vito.be

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 de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.
Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.9) en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).
Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.3).

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 MVK (4.1.9). Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023

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 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK
4.1.10 Koelkast 5±3°C

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 of EasyDisc YEA[1]
5.1.2 Ringer 1/4 of 1/40 oplossing[2]
5.1.3 Umonium[38] 2,5% of gelijkwaardig biocide
5.1.4 ultra puur water

5.2 BEREIDINGEN

5.2.1 YEAST EXTRACT AGAR

Los YEA (5.1.1) in ultra puur water (5.1.4), 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 (4.1.2) 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] NF validatie versus ISO 6222
[2] Om een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/4 of 1/40 andere geschikte diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater. De ISO lijst is niet beperkend.

http://www.emis.vito.be

warmwaterbad (4.1.2) tot het medium volledig op temperatuur van 45±1°C gekomen is (voorwaarden zie hierboven).

5.2.2 EASYDISC YEA

Gebruik de kant en klare EasyDisc YEA. Deze dienen bewaard te worden bij 2 - 25°C, buiten bereik van licht en vochtigheid. Ongebruikte platen moeten in een afgesloten zakje bewaard worden.

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVOORBEREIDING

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 diluent (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 450 ml steriele diluent (voor ringtestmonsters) (5.1.2) waaraan 50 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

Volgens ISO 6222 is theoretisch het inzetten in enkelvoud van de platen per verdunning en per temperatuur voldoende, maar het is aanbevolen om telkens twee platen te testen.

6.2.1 via de gietplaatmethode

- 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).

6.2.2 via EasyDiscs[3]

- Identificeer telkens één/twee EasyDisc YEA platen (4.2.4) per temperatuur voor elke verdunning.

[3] Voor het gebruik van EasyDisc YEA dient een beperkte implementatie-verificatie uitgevoerd te worden (intra-labo reproduceerbaarheid en terugvinding) ten opzichte van de ISO 6222 referentiemethode.

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023
http://www.emis.vito.be
emis

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023

- Nadat het te analyseren monster goed gehomogeniseerd is, verwijder het wit deksel en voeg telkens 1 ml van elke verdunning (aan de hand van een automatische pipet (4.2.1) met steriele tip) toe aan een EasyDisc YEA-plaat bestemd voor de twee incubatietemperaturen.
- Draai elke plaat voorzichtig rond om de vloeistof over het volledig oppervlak te verdelen, plaats het deksel erop en laat de plaatjes gedurende ±20 minuten bij kamertemperatuur staan.

6.3 INCUBATIE

- Incubeer de platen (YEA geïnverteerd / EasyDiscs met wit deksel naar boven) in een incubator van:
- 36 ± 2°C (4.1.4) gedurende 40 - 48 h.
- 22 ± 2°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 confluente groei vertoond.
- Tel de kolonies met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.7). Voor de EasyDiscs tel de kolonies doorheen de transparante zijde van een plaatje. Bepaal (indien twee platen werden geïnoculeerd) de gemiddelde waarde van de kolonie-aantallen, en dit voor beide temperaturen. De ideale uitplating bij YEA gietplaten bevat tussen 25 en 300 kolonies, bij EasyDiscs tussen 10 en 100 kolonies.

7 RAPPORTERING

Bepaal voor elke temperatuur de kve waarden per ml watermonster aan de hand van onderstaande berekening.
Overgroeide platen mogen niet worden beoordeeld.

7.1 BEREKENING VAN HET RESULTAAT

$$Cs = \frac{Z}{Vtot} \times Vs$$

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, ..., *di*
Vs is het referentievolume om de concentratie van het aantal micro-organismen in het monster uit te drukken (= 1ml)
Vtot is berekend totaal volume van het monster overeenkomstig de getelde platen:

$Vtot = (n_1V_1d_1) + (n_2V_2d_2) + ... + (n_iV_id_i)$

met
$n_1, n_2, ..., n_i$ is het aantal platen geteld met dilutie $d_1, d_2, ..., d_i$
$V_1, V_2, ..., V_i$ is het getest volume met dilutie $d_1, d_2, ..., d_i$
$d_1, d_2, ..., d_i$ is de dilutie van het getest volume $V_1, V_2, ..., V_i$ (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.

http://www.emis.vito.be

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 (YEA gietplaten), resp. 100 (EasyDiscs), kolonies op de geïnoculeerde platen met de grootste verdunning 10^{-x} voorkomen, wordt het resultaat als benaderend weergegeven (geschat aantal >3,0. 10^{x+2}, resp. >1,0. 10^{x+2}, kve/ml).
Het resultaat wordt uitgedrukt als een waarde tussen 1,0 en 9,9. 10^{X} kve/ml.

7.2 RAPPORT

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar 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
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
- https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/easydisc-water-microbiology-tests/easydisc-yea-test/

Ministerieel besluit van 16 juni 2023 --- Belgisch Staatsblad van 06 juli 2023
http://www.emis.vito.be
emis