

Quantitative Bestimmung von E. coli in Wasserproben - Vergleich von ECD-Agar und Petrifilm TM = Quantitative analysis of E. coli in water - comparison of ECD-agar and petrifilm TM

Autor(en): **Baumgartner, A. / Grand, M. / Simmen, Alice**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **84 (1993)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982142>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Quantitative Bestimmung von *E. coli* in Wasserproben – Vergleich von ECD-Agar und Petrifilm TM

Quantitative Analysis of *E. coli* in Water – Comparison of ECD-Agar and
Petrifilm TM

A. Baumgartner, M. Grand und Alice Simmen
Bundesamt für Gesundheitswesen, Bern

Marga Halvax
Kantonales Gewässer- und Bodenschutzlaboratorium, Bern

Einleitung

Die analytische Mikrobiologie entwickelt sich in Richtung empfindlicherer, schnellerer, automatisierter und miniaturisierter Nachweismethoden (1). Bezüglich des letztgenannten Aspektes ist der Petrifilm, ein von den 3M Laboratorien entwickeltes, gebrauchsfertiges System zur Keimzahlbestimmung, ein wesentlicher Fortschritt. An Stelle der klassischen Petrischale tritt eine Folie, die mit den für das Bakterienwachstum nötigen Nährstoffen und einem in kaltem Wasser löslichen Gel beschichtet ist (2). Der Petrifilm hat den Vorteil, dass das Vorbereiten von Nährmedien hinfällig wird, dass Lagerraum und Kapazität im Brutschrank gespart werden können und dass weniger Abfall zu entsorgen ist. Zurzeit sind Petrifilme zum Nachweis der aerob mesophilen Keime, der Coliformen, von *E. coli* sowie der Hefen und Schimmel im Handel erhältlich. In der Fachliteratur finden sich bereits zahlreiche Beiträge, die sich zur Praktikabilität, Sensitivität und Spezifität des neuen Verfahrens äussern. Wie weit sich der Petrifilm aber zur bakteriologischen Untersuchung von Wasser eignet, ist noch nicht untersucht worden. Die «Hygienesverordnung» (3) legt für Trinkwasser Toleranzwerte für die aerob mesophilen Keime, für *E. coli* und für die Enterokokken fest (3). Die entsprechenden Methoden sind im «Schweizerischen Lebensmittelbuch» aufgeführt (4). Gemäss diesem wird *E. coli* mit einem Membranfilterverfahren untersucht. Nach einer Vorinkubation auf Tryptic Soy Agar (TSA) werden die Nitrocellulosefilter auf *Escherichia coli* Direct (ECD)-Agar mit dem Zusatz von 4-Methylumbellyferyl-Glucuronid (MUG) weiterbebrütet. Der Nachweis von *E. coli* erfolgt fluoreszenzoptisch unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm. Diese Methode zeichnet sich bereits durch eine beträchtliche Einfachheit aus. Da in den amtlichen Laboratorien aber sehr viele

Wasseruntersuchungen durchgeführt werden, ist der Bedarf nach weiterer Rationalisierung gegeben. In der vorliegenden Studie wurde darum abgeklärt, ob der Petrifilm als Alternative zur amtlichen Nachweismethode für *E. coli* erwogen werden kann.

Material und Methoden

E. coli-haltige Wasserproben

In die Untersuchung wurden 168 Proben von Seen und Fliessgewässern einbezogen. Die Wässer wurden in sterile Glasflaschen entnommen und ungekühlt an den Ort der Untersuchung gebracht. Nach Eintreffen der Proben erfolgten die bakteriologischen Untersuchungen ohne weitere Verzögerung.

Bakteriologische Untersuchungen

Alle Proben wurden sowohl mit ECD-Agar als auch mit Petrifilm im Doppelansatz untersucht. Wegen dem unbekanntem *E. coli*-Gehalt der Wasserproben wurden jeweils 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} und 10^{-2} ml angesetzt. Zur Herstellung der Verdünnungen wurde mit Eppendorfpipetten gearbeitet. Das praktische Vorgehen wickelte sich wie folgt ab:

ECD-Agar: Der Arbeitsvorgang richtete sich nach Kapitel 56 «Mikrobiologie» des «Schweizerischen Lebensmittelbuches» (4). Dabei wurde dem ECD-Agar (Oxoid CM 649) 100 mg MUG (Oxoid BR 71) pro Liter zugegeben. Nach Filtration der Proben folgte eine Vorinkubation der Membranfilter auf TSA (Oxoid CM131) während 2 Stunden bei 37 °C. Danach wurden die Membranen auf ECD-Agar transferiert und während 16–20 Stunden bei 44 °C inkubiert.

Petrifilm TM: Volumina von 10^2 und 10^1 ml wurden membranfiltriert und die Filter anschliessend auf den Petrifilm, der zuvor während einer Stunde mit 1 ml Aqua dest. rehydratisiert worden war, überführt. Von den Verdünnungsstufen 10^0 – 10^{-2} wurde mittels Eppendorfpipette 1 ml direkt auf den Petrifilm appliziert. Die Inkubation der Petrifilme erfolgte während 24 Stunden bei 37 °C. Als *E. coli* wurden gemäss Angabe des Herstellers blaue Kolonien, die von einer Gasblase umgeben sind, gewertet.

Auszählen von bebrüteten Platten und Petrifilmen

Ausgewertet wurden jeweils die Ansätze derjenigen zwei Verdünnungsstufen, bei denen die Kolonien eindeutig zu zählen waren. Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte nach der Formel von Farmiloe (4). Für die zusammenfassende Darstellung der Resultate und die statistischen Berechnungen wurden die *E. coli*-Keimzahlen auf 100 ml umgerechnet.

Die durch die beiden Untersuchungsmethoden ermittelten Keimzahlen wurden einer linearen Regressionsanalyse unterzogen und mittels z-Test paarweise verglichen.

Resultate

Die Regressionsanalyse (logarithmierte Werte) zeigt sowohl im hohen als auch im niedrigen Keimzahlbereich eine hohe Korrelation zwischen den mit Petrifilm und ECD-Agar ermittelten Werten (Abb. 1). Mittels z-Test wurde jedoch festgestellt, dass auf ECD-Agar signifikant höhere Werte zu erwarten sind als auf Petrifilm (ermittelter z-Wert = 11,97, $p = 99,5\%$: z-Wert = 2,576). Für alle Wertepaare wurde daher der Quotient Keimzahl ECD : Keimzahl Petrifilm ermittelt. Die resultierenden Quotienten wurden in Klassen der Bandbreite 1 eingeteilt und graphisch dargestellt (Abb. 2). Auf diese Weise wird ersichtlich, dass bei 13 Analysen (7,7%) auf Petrifilm höhere *E. coli*-Keimzahlen gefunden wurden als auf

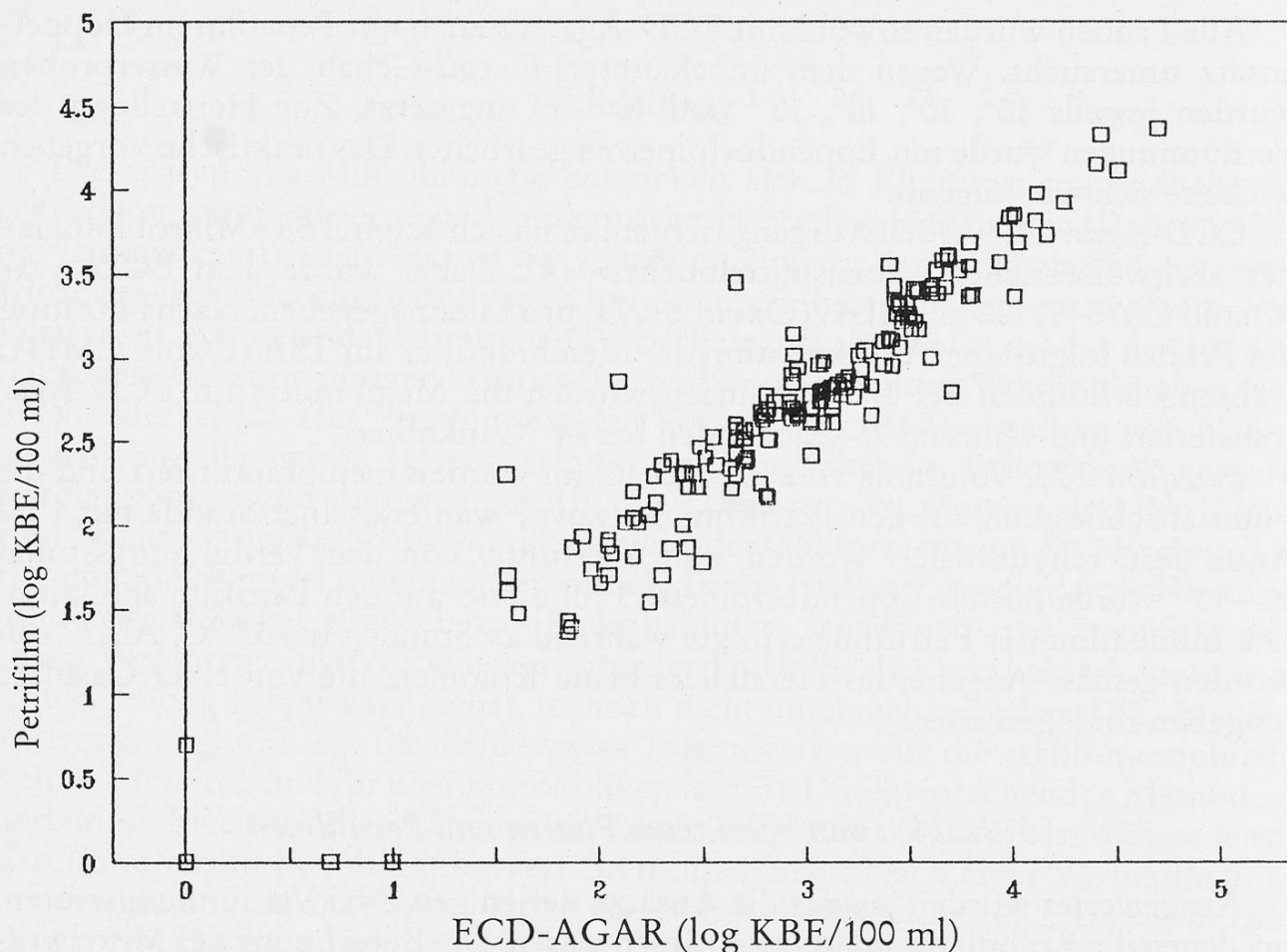


Abb. 1. Lineare Regressionsanalyse, der mittels ECD-Agar und Petrifilm bei 168 Wasserproben ermittelten *E. coli*-Keimzahlen

$\frac{KBE^{ECD}}{KBE^{PETRIF.}}$		Absolute Häufigkeit
0,2 - 0,99		13
1 - 1,99		88
2 - 2,99		47
3 - 3,99		7
4 - 4,99		8
5 - 5,99		2
6 - 6,99		0
7 - 7,99		1
8 - 8,99		1
9 - 9,99		0
10 - 10,99		1
Anzahl untersuchter Proben		168

Abb. 2. Grösse und Verteilung der Quotienten $KBE^{ECD} / KBE^{Petrifilm}$ von 168 vergleichend auf *E. coli* untersuchten Wasserproben

ECD-Agar. Bei 155 Wasserproben resultierten auf ECD-Agar die höheren Werte. Die festgestellten Abweichungen waren bei 142 Analysen (91,6%) kleiner als ein Faktor 3. Die höchste Abweichung bewegte sich in der Grössenordnung einer Zehnerpotenz.

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass auf ECD-Agar im Vergleich zu Petrifilm signifikant höhere *E. coli*-Keimzahlen erhalten wurden. Eine Erklärung dieses Phänomens könnte zum Beispiel sein, dass in Wasser vorhandene, sublethal geschädigte *E. coli*-Zellen auf Petrifilm keine Kolonien auszubilden vermögen. Bei der ECD-Methode werden solche Keime durch eine Vorinkubation der Membranfilter auf nicht selektivem TSA revitalisiert. Auf diesen Schritt wurde bei den Analysen mit Petrifilm bewusst verzichtet, um den Charakter der Schnellmethode beizubehalten.

Die auf dem ECD-Agar beruhende amtliche Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Bei 142 (91,6%) der 155 Wasserproben, wo mittels ECD-Agar höhere *E. coli*-Keimzahlen gefunden wurden, war die Mehrausbeute aber nicht

grösser als ein Faktor 3. Für die Beurteilung von Trinkwasser, wo *E. coli* als Indikator einer frischen fäkalen Kontamination gilt, ist die Grössenordnung der festgestellten Abweichung aber unerheblich. Petrifilm kann darum grundsätzlich für die Analyse und Beurteilung von Trinkwasser auf *E. coli* empfohlen werden. Es stellt sich somit die Frage, ob das Petrifilm-Verfahren nicht auch für die Anwendung im amtlichen Kontrolllabor in Frage kommt. Gemäss Artikel 3 der «Hygieneverordnung» (3) müssen zur Überprüfung von Grenz- und Toleranzwerten zwingend die in Kapitel 56 des «Schweizerischen Lebensmittelbuches» (4) festgelegten Methoden angewendet werden. Der Grund für diese Auflage liegt darin, dass in der mikrobiologischen Analytik das erzielte Ergebnis ausgesprochen methodenabhängig ist. Ein einheitlicher Rechtsvollzug bedingt aber die Vergleichbarkeit von Resultaten und somit exakt festgelegte Analysemethoden. Gemäss gültigem Recht wäre es nicht ausgeschlossen, dass zum Nachweis eines bestimmten Keimes mehrere Methoden zugelassen werden. Voraussetzung dazu wäre allerdings, dass die durch Parallelmethoden erzielten Resultate statistisch nicht signifikant voneinander abweichen. Wie die vorliegende Studie zeigt, ist das im Falle des *E. coli*-Nachweises in Wasser mit Petrifilm und ECD-Agar nicht gegeben. Petrifilm kommt deshalb als Zweitmethode zum offiziellen ECD-Agar nicht in Frage. Es bleibt somit zu diskutieren, ob der heute gesetzlich vorgeschriebene ECD-Agar nicht vollumfänglich durch die Petrifilm-Technik ersetzt werden könnte. Bei der Auswahl mikrobiologischer Nachweismethoden wurde vom Gesetzgeber unter anderem darauf geachtet, dass sämtliche Nährbodenkomponenten und Chemikalien durch den Anwender bei verschiedenen Anbietern zugekauft werden können. Beim Petrifilm wäre dies nicht mehr möglich, da es sich um ein patentiertes und fertig konfektioniertes Produkt handelt. Zudem würde mit der Einführung des Petrifilms als alleinige amtliche Methode eine Monopolstellung zu Gunsten des Patentinhabers geschaffen. Dies wäre zum Nachteil der anderen Diagnostikanbieter und natürlich auch der Anwender, die nicht von einer Konkurrenzsituation auf dem Markt profitieren könnten. Aus dem letztgenannten Grund kann Petrifilm als mögliche alleinige amtliche Nachweismethode zurzeit nicht erwogen werden. Im industriellen Kontrolllabor hingegen steht der Verwendung dieser Methode nichts im Wege. Ein naheliegendes Einsatzgebiet der Petrifilm-Technik könnten auch Katastrophengebiete mit mangelhafter oder fehlender Laborinfrastruktur sein. In Hinsicht auf eine solche Einsatzdoktrin sind im Rahmen des B-Dienstes der Schweizer Armee unter Feldbedingungen bereits Vorversuche unternommen worden (Resultate zur Publikation vorgesehen). Nach Ablauf des Patentschutzes für Petrifilm ist zu erwarten, dass vergleichbare Konkurrenzprodukte auf dem Markt erscheinen werden und dem Eingang der miniaturisierten «Plate Count»-Technik ins amtliche Kontrolllabor nichts mehr im Wege steht.

Zusammenfassung

168 Proben von See- und Flusswasser wurden mittels *Escherichia coli* Direct (ECD)-Agar und der Petrifilm-Methode auf *E. coli* untersucht. Die statistische Auswertung (z-Test) zeigte, dass auf ECD-Agar signifikant höhere Keimausbeuten zu erwarten sind. Die Abwei-

chung liegt allerdings in einer Grössenordnung, die für die Qualitätsbeurteilung eines Trinkwassers unerheblich ist. Petrifilm kann demzufolge für die Kontrolle von Trinkwasser auf *E. coli* empfohlen werden. Die Möglichkeit, Petrifilm als amtliche Methode einzuführen, muss aber vorerst ausgeschlossen werden, da patentrechtlich geschützten Verfahren im «Schweizerischen Lebensmittelbuch» keine Monopolstellung eingeräumt werden darf.

Résumé

E. coli a été dénombré dans 168 échantillons d'eaux de lacs et de rivières en parallèle sur la gélose *Escherichia coli* Direct (ECD)-agar et le Petrifilm. L'interprétation statistique (z-test) de l'essai montre que les résultats obtenus avec la gélose ECD sont significativement plus élevés qu'avec le Petrifilm. Les écarts mesurés entre les 2 méthodes se situent toutefois dans un ordre de grandeur qui permet tout de même l'utilisation du Petrifilm pour l'appréciation de la qualité bactériologique de l'eau. Pour de raison de monopole, une incorporation du Petrifilm dans la méthode officielle de contrôle de l'eau potable n'entre actuellement pas en considération.

Summary

168 samples of water from lakes and rivers were examined for *E. coli* both with *Escherichia coli* Direct (ECD)-agar and the Petrifilm method. Statistical analysis (z-test) showed, that with ECD-agar, significantly higher results have to be expected than with Petrifilm. The variation between the two methods however lies in an order of magnitude which is irrelevant in bacteriological quality control. Petrifilm can therefore be recommended for counting *E. coli* in water and drinking water respectively. Nevertheless, it was excluded to consider Petrifilm as an official control method at the moment. Petrifilm is a diagnostic system protected by a patent and its admission by authorities of food control would create a monopoly for a particular manufacturer.

Literatur

1. Baumgartner, A.: Lebensmittelmikrobiologische Diagnostik gestern, heute und in Zukunft. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 82, 496–512 (1991).
2. Anon.: Le Pétrifilm TM. Département Microbiologie, Laboratoires 3M Santé, 3 rue Danton, 92245 Malakoff Cedex, France.
3. Eidgenössisches Departement des Innern: Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände vom 1. Juli 1987.
4. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56 «Mikrobiologie», Neuauflage 1985. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern.

Dr. A. Baumgartner
Bundesamt für Gesundheitswesen
Abteilung Lebensmittelwissenschaft
Sektion Mikrobiologie
Postfach
CH-3000 Bern 14