

Quantitative Bestimmung von E. coli in Oberflächenwasser : Vergleich des Membranfilterverfahrens mit einer Mikrotiterplatten-MPN-Methode = Quantitative analysis of E. coli in surface water comparison of the membrane filtration technique with a microplat...

Autor(en): Gautsch, Sylvia / Krieger, Kathrin / Ewald, Roy

Objektyp: Article

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

Band (Jahr): **88 (1997)**

Heft 5

PDF erstellt am: **10.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982340>

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 Oberflächenwasser: Vergleich des Membranfilterverfahrens mit einer Mikrotiterplatten-MPN-Methode

Quantitative Analysis of *E. coli* in Surface Water
Comparison of the Membrane Filtration Technique with
a Microplate-MPN-Method

Key words: *E. coli*, Surface water, Microplate-MPN-method,
Membrane filtration, Miniaturized method

Sylvia Gautsch, Kathrin Krieger und Roy Ewald
Kantonales Laboratorium Basel-Stadt, Basel

Einleitung

Die zur Harmonisierung von Untersuchungen natürlicher Badegewässer herausgegebenen «Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern» (1) sehen unter anderem die Untersuchung von Oberflächengewässern während der Badesaison auf *Escherichia coli* (*E. coli*) als Fäkalindikator vor. Die entsprechende Methode hierfür ist ebenfalls in den genannten Empfehlungen aufgeführt. Gemäss diesen wird *E. coli* mit einem Membranfilterverfahren untersucht, wobei die Filter nach einer Vorinkubation auf nicht selektivem Tryptic Soy Agar auf *Escherichia coli* Direct Agar mit dem Zusatz von 4-Methylumbellyferyl-Glucuronid (MUG) transferiert und weiterbebrütet werden. Der Nachweis von *E. coli* erfolgt fluoreszenzoptisch unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm sowie mit Hilfe des Indoltests. Zwar liegen die Ergebnisse dieser bereits durch eine beträchtliche Einfachheit gekennzeichneten Methode schon nach 24 Stunden vor, rechnet man jedoch die Vorbereitung, wie Nährmedienherstellung, Lagerbewirtschaftung, Bereitstellung der Filtrationsanlage sowie die Filtration und das Transferieren der Filter mit ein, so handelt es sich um eine relativ zeit- und arbeitsaufwendige Methode. Gerade für das Durchführen sehr vieler Wasseruntersuchungen ist daher der Bedarf nach weiterer Rationalisierung gegeben. Eine Möglichkeit hierzu bietet der von der Firma Biokar Diagnostics entwickelte «Microplate MUG/EC»-Test (2). Hierbei handelt es sich um eine miniaturisierte Methode zur quantitativen

Bestimmung von *E. coli* in Wasser nach dem MPN-Verfahren. Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte, die ein mit dem Substrat MUG versehenes Nährmedium in dehydrierter Form enthalten, werden in unterschiedlicher Anzahl mit einer bestimmten Menge verschiedener Probeverdünnungen versetzt. Nach erfolgter Inkubation werden sämtliche Vertiefungen, die unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm eine blaue Fluoreszenz zeigen, als positiv bewertet und für jede Verdünnung ausgezählt. Ausgehend hiervon erfolgt die Ermittlung der wahrscheinlichsten Keimzahl.

Breite Anwendung findet diese Mikrotiterplatten-MPN-Methode bereits in Frankreich, wo für die quantitative Bestimmung von *E. coli* in Badegewässern zwecks besserer Vergleichbarkeit der Resultate die Anwendung einer miniaturisierten Methode nach dem MPN-Verfahren gesetzlich vorgeschrieben ist (3, 4). Eine in diesem Land durchgeführte Studie zeigte, dass die im Rahmen von Vergleichsuntersuchungen von Meerwasserproben auf *E. coli* mittels Mikrotiterplatten-MPN-Verfahren und Membranfiltration gemäss französischer Norm (AFNOR) erhaltenen quantitativen Ergebnisse statistisch nicht signifikant voneinander abwichen (5). Bei der eingehenderen Differenzierung und Identifikation typischer Kolonien bzw. der weiteren Untersuchung von Probeninhalt aus fluoreszierenden Vertiefungen auf die Anwesenheit von *E. coli* wurde für die Mikrotiterplatten-MPN-Methode jedoch eine bessere Spezifität als für das Membranfilterverfahren festgestellt.

Ziel der vorliegenden Studie war es abzuklären, ob die Mikrotiterplatten-MPN-Methode als Alternative zum empfohlenen amtlichen Nachweisverfahren für *E. coli* in natürlichen Badegewässern erwogen werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine grössere Anzahl Wasserproben aus Flussbädern mit beiden Methoden untersucht und die erhaltenen quantitativen Ergebnisse statistisch verglichen.

Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten 54 Proben Flusswasser von drei verschiedenen, das Kantonsgebiet Basel-Stadt durchquerenden Flüssen. Die Proben wurden in sterile Glasflaschen entnommen, ungekühlt innerhalb von zwei Stunden in das Untersuchungslabor gebracht und innerhalb von zwei weiteren Stunden bakteriologisch untersucht.

Bakteriologische Untersuchungen

In allen Proben erfolgte die Bestimmung der *E. coli*-Keimzahl sowohl mittels eines konventionellen auf Membranfiltration beruhenden Kulturverfahrens als auch mit einer Mikrotiterplatten-MPN-Methode.

Membranfilterverfahren

Der Untersuchungsgang richtete sich im wesentlichen nach den im Anhang I der «Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern» gemachten Angaben (1). Nach Filtration von 10^0 und 10^{-1} ml der Probe erfolgte eine Vorinkubation der Membranfilter auf Tryptic Soy Agar (Oxoid, CM 131) während 2–4 h bei 37 °C. Danach wurden die Membranfilter auf *Escherichia coli* Direct Agar MUG (Biolife, 401427) überführt und während 16–20 h bei 44 °C bebrütet. Nach Prüfung aller gewachsenen Kolonien unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm wurden sämtliche bläulich fluoreszierenden Kolonien zum Nachweis der Indolbildung mit Kovac's Indolreagenz (Biolife, 171000) versetzt. Fluoreszierende und indolpositive Kolonien wurden als *E. coli* ausgezählt, aus den beiden angesetzten Verdünnungsstufen der Mittelwert nach der Formel von Farmiloe (6) berechnet und die erhaltenen *E. coli*-Keimzahlen anschliessend auf 100 ml umgerechnet.

Mikrotiterplatten-MPN-Methode

Die Untersuchung sämtlicher Proben erfolgte mit Hilfe des «Microplate MUG/EC»-Tests (Biokar Diagnostics, OKM001) gemäss Anleitung des Produzenten. Dabei wurde ausgehend von der Probe eine 1:2 Verdünnung hergestellt, diese wiederum 1:10 verdünnt. Je 200 µl der 1:2 Verdünnung wurden in die Vertiefungen der ersten 8 Reihen einer Mikrotiterplatte pipetiert, während die verbleibenden 32 Vertiefungen mit je 200 µl der 1:20 Verdünnung versetzt wurden. Nach erfolgter Inkubation sämtlicher Mikrotiterplatten bei 44 °C während der vom Hersteller vorgegebenen Bebrütungsdauer von mindestens 36 h wurden diese unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm auf Fluoreszenz geprüft und für jede Verdünnung alle blau fluoreszierenden Vertiefungen ausgezählt. Die Prüfung auf Fluoreszenz erfolgte bei 21 Proben zusätzlich bereits nach 24 h Inkubation. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen erfolgte die Bestimmung der wahrscheinlichsten Anzahl *E. coli*-Keime in 100 ml einschliesslich des dazugehörigen Vertrauensbereiches anhand der vom Hersteller mitgelieferten statistischen Tabelle.

Statistische Analyse

Die durch die beiden Untersuchungsmethoden ermittelten Keimzahlen wurden logarithmiert, einer linearen Regressionsanalyse unterzogen und mittels t-Test verglichen.

Resultate

Wie in den Abbildungen 1 und 2 gezeigt, besteht zwischen den mittels Membranfilterverfahren und Mikrotiterplatten-MPN-Methode ermittelten Keimzahlen eine hohe Korrelation. Dies sowohl im Fall einer längeren Bebrütungsdauer von mindestens 36 h ($n = 54$, $r = 0,88$) als auch bereits nach 24 h ($n = 21$, $r = 0,83$).

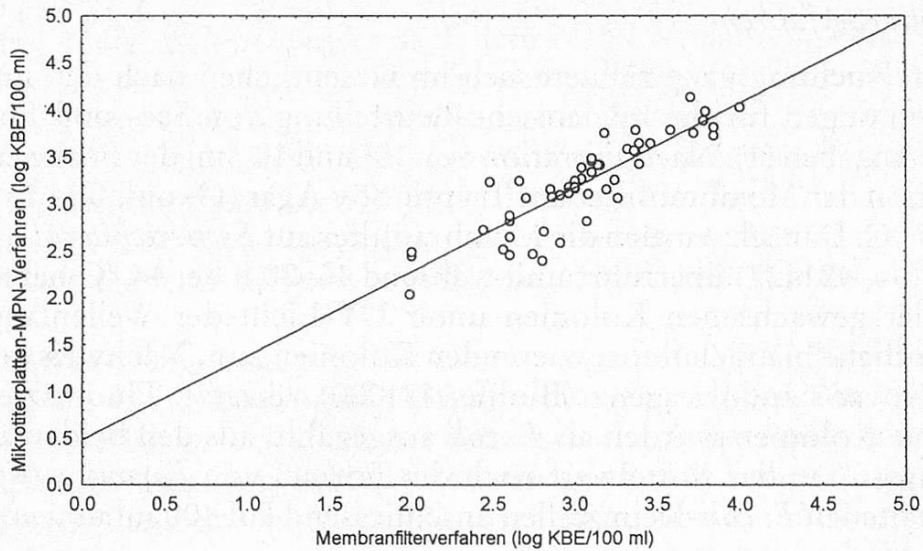


Abb. 1. Korrelation der mittels Membranfilterverfahren und Mikrotiterplatten-MPN-Methode mit mindestens 36stündiger Inkubation bei 54 Proben Flusswasser ermittelten *E. coli*-Keimzahlen

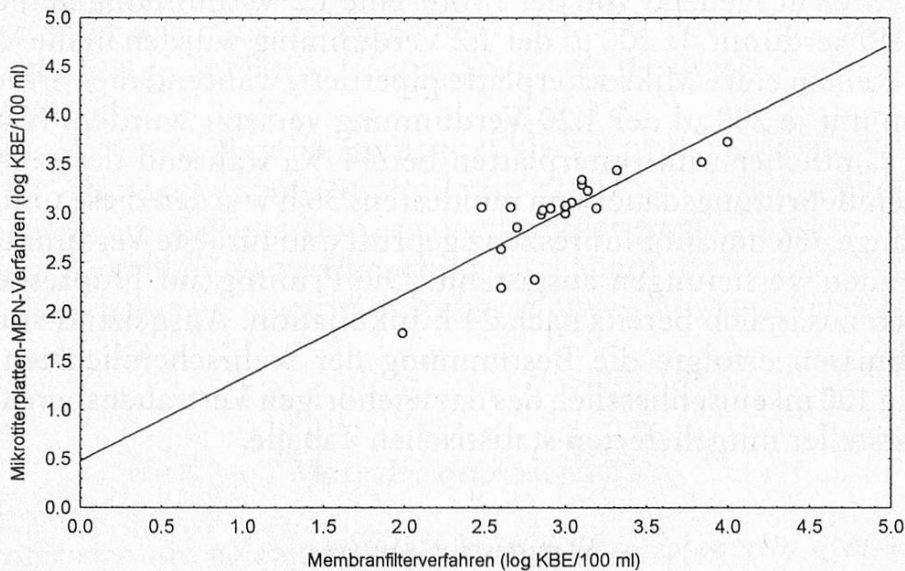


Abb. 2. Korrelation der mittels Membranfilterverfahren und Mikrotiterplatten-MPN-Methode mit 24stündiger Inkubation bei 21 Proben Flusswasser ermittelten *E. coli*-Keimzahlen

Bei 43 von 54 (79,6%) untersuchten Wasserproben resultierten nach mindestens 36stündiger Inkubation im Mikrotiterplatten-MPN-Verfahren die höheren Keimzahlen als im Membranfilterverfahren (Abb. 3). Dabei waren die beobachteten Abweichungen bei 13 Analysen (30,2%) grösser als ein Faktor 2. Im Fall der kürzeren Bebrütungsdauer von 24 h zeigten 15 von 21 (71,4%) in die Analysen miteinbezogenen Proben im Mikrotiterplatten-MPN-Verfahren höhere Keimzahlen als im Membranfilterverfahren (Abb. 4). Bei 2 Proben (13,3%) betrug die Abweichungen mehr als das Doppelte.

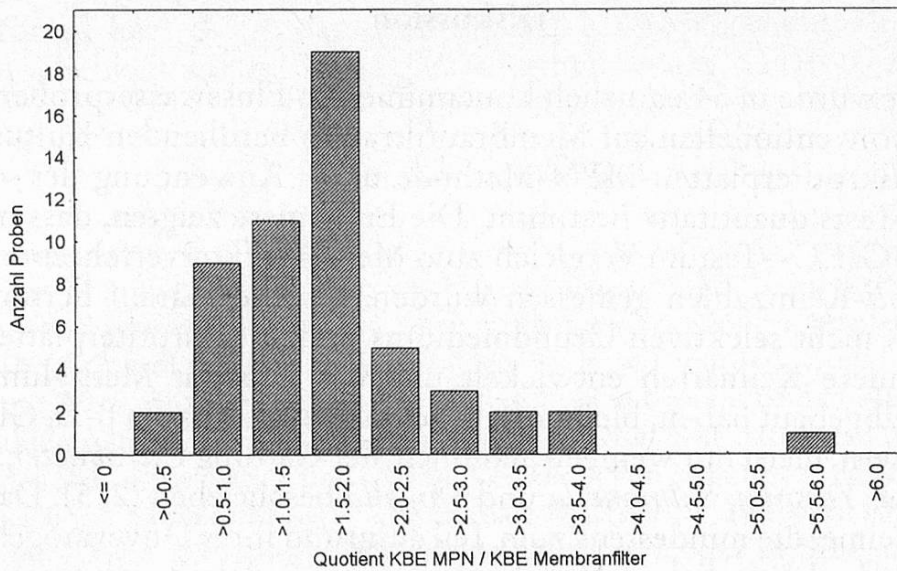


Abb. 3. Grösse und Verteilung der Quotienten aus den mittels Mikrotiterplatten-MPN-Methode mit mindestens 36stündiger Inkubation und Membranfilterverfahren bei 54 Proben Flusswasser erhaltenen *E. coli*-Keimzahlen

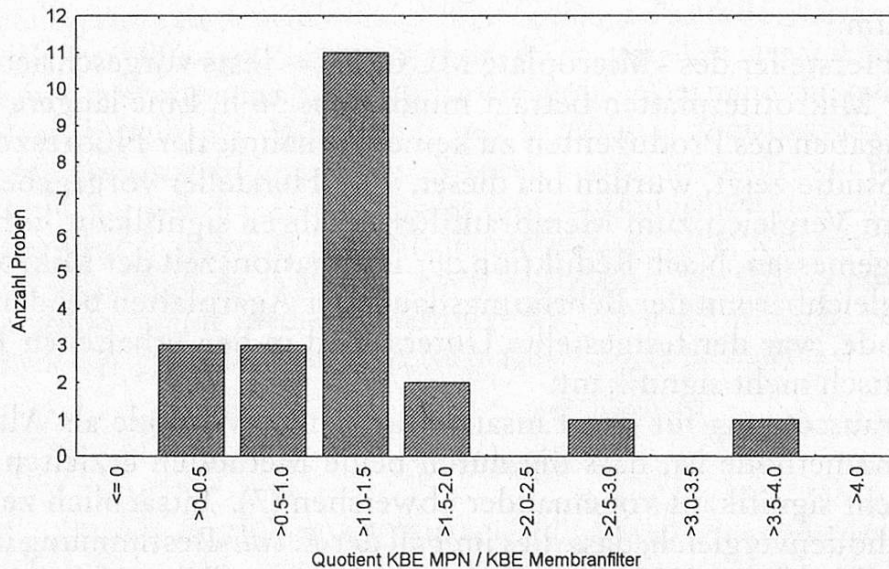


Abb. 4. Grösse und Verteilung der Quotienten aus den mittels Mikrotiterplatten-MPN-Methode mit 24stündiger Inkubation und Membranfilterverfahren bei 21 Proben Flusswasser erhaltenen *E. coli*-Keimzahlen

Während im Fall der längeren Bebrütungszeit von mindestens 36 h mit Hilfe des *t*-Tests gezeigt werden konnte, dass die Mikrotiterplatten-MPN-Methode signifikant höhere Werte liefert als das Membranfilterverfahren (ermittelter *t*-Wert: 5,44; $t_{53; 0,05; zweiseitig}$: 2,00), stellte sich im Fall der kürzeren Inkubationszeit heraus, dass der festgestellte Unterschied in den mit den beiden Methoden ermittelten Keimzahlen statistisch nicht signifikant war (ermittelter *t*-Wert: 0,63; $t_{20; 0,05; zweiseitig}$: 2,09).

Diskussion

Insgesamt wurde in 54 natürlich kontaminierten Flusswasserproben *E. coli* mit Hilfe eines konventionellen auf Membranfiltration beruhenden Kulturverfahrens und einer Mikrotiterplatten-MPN-Methode unter Anwendung des «Microplate MUG/EC»-Tests quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass mittels «Microplate MUG/EC»-Test im Vergleich zum Membranfilterverfahren mehrheitlich höhere *E. coli*-Keimzahlen gemessen wurden. Ob dies darauf beruht, dass sich aufgrund des nicht selektiven Grundmediums in den Mikrotiterplatten ausser *E. coli* noch andere Keimarten entwickelt und das Substrat Methylumbellyferyl-Glucuronid abgebaut haben, bleibt offen. So wurde das Enzym β -D-Glucuronidase bei Vertretern, meist nur wenigen Stämmen, der Gattung *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Salmonella* und *Shigella* beschrieben (2, 5). Dabei handelt es sich um Keime, die mindestens zum Teil aufgrund ihres Unvermögens, Indol zu bilden, beim herkömmlichen Verfahren zu keinen falsch positiven Resultaten führen. Auf der anderen Seite ist in der Literatur für den «Microplate MUG/EC»-Test eine hohe Spezifität ausgewiesen (5). Möglich wäre auch, dass sich die im Wasser vorhandenen *E. coli*-Keime, vor allem sublethal geschädigte, im flüssigen Medium der Mikrotiterplattenvertiefungen besser zu entwickeln vermögen als auf festem Medium.

Die vom Hersteller des «Microplate MUG/EC»-Tests vorgeschriebene Bebrütungszeit der Mikrotiterplatten beträgt mindestens 36 h. Eine längere Inkubation führt laut Angaben des Produzenten zu keiner Abnahme der Fluoreszenz. Wie die vorliegende Studie zeigt, wurden bei dieser, vom Hersteller vorgegebenen Bebrütungszeit im Vergleich zum Membranfilterverfahren signifikant höhere *E. coli*-Keimzahlen gemessen. Nach Reduktion der Inkubationszeit der Mikrotiterplatten auf 24 h, vergleichbar mit der Bebrütungszeit der Agarplatten bei der herkömmlichen Methode, war der festgestellte Unterschied in den erhaltenen Keimzahlen jedoch statistisch nicht signifikant.

Grundvoraussetzung für den Einsatz einer neuen Methode als Alternative zu einer Referenzmethode ist, dass die durch beide Methoden erzielten Ergebnisse statistisch nicht signifikant voneinander abweichen (7). Tatsächlich zeigt der vorliegende Methodenvergleich, dass dies im Fall der *E. coli*-Bestimmung in Flusswasser mittels «Microplate MUG/EC»-Test und Membranfilterverfahren gegeben ist, sofern die Inkubationsdauer der Mikrotiterplatten entgegen den vom Hersteller gemachten Angaben auf 24 h reduziert wird. Diese, auf demselben Prinzip wie das Membranfilterverfahren – Nachweis des Enzyms β -D-Glucuronidase – beruhende Mikrotiterplatten-MPN-Methode kann somit als Alternative zur empfohlenen kulturellen Nachweisteknik mittels Membranfiltration eingesetzt werden.

Durch die Verkürzung der ursprünglich vorgesehenen Inkubationszeit liegen auch die endgültigen Resultate der Untersuchungen gleich schnell vor wie bei der konventionellen Methode. Dank der Einfachheit der Durchführung sowie der wesentlich kürzeren und weniger Material und Arbeitsschritte umfassenden Vorbereitungsphase wird der «Microplate MUG/EC»-Test zu einer weniger arbeits- und zeitaufwendigen Methode als das herkömmliche Membranfilterverfahren. Ein

weiterer Vorteil liegt darin, dass sich bei der Mikrotiterplatten-MPN-Methode auch die Möglichkeit zur vollständigen Automatisierung bietet.

Zusammenfassung

In 54 Flusswasserproben wurde *E. coli* mit einem konventionellen Membranfilterverfahren und einer kommerziell erhältlichen Mikrotiterplatten-MPN-Methode («Microplate MUG/EC»-Test) quantitativ bestimmt. Auch wenn mittels der Mikrotiterplatten-MPN-Methode mehrheitlich höhere *E. coli*-Keimzahlen gemessen wurden, zeigte die statistische Auswertung (*t*-Test), dass der festgestellte Unterschied in den mit beiden Methoden erhaltenen Keimzahlen statistisch nicht signifikant war. Voraussetzung dafür war, dass die Inkubationsdauer der Mikrotiterplatten beim MPN-Verfahren von 36 auf 24 h reduziert wurde. Der einfach und schnell durchzuführende «Microplate MUG/EC»-Test kann somit als Alternative zur empfohlenen amtlichen Nachweismethode für *E. coli* in See- und Flussbädern erwogen werden.

Résumé

E. coli (colibacille) a été dénombré dans 54 échantillons d'eaux de rivière avec une méthode conventionnelle par filtration sur membrane et en parallèle avec le test «Microplate MUG/EC», une méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide (NPP). Dans la plupart des cas, les taux d'*E. coli* obtenus avec la méthode miniaturisée NPP étaient plus élevés. L'interprétation statistique (*t*-test) de l'essai a toutefois montré que la différence entre les résultats obtenus avec les deux méthodes était statistiquement non significative. Ceci à condition que dans le cadre de la méthode miniaturisée NPP, la durée d'incubation des microplaques soit réduite de 36 à 24 h. Le test «Microplate MUG/EC» est rapide et simple et peut être utilisé comme méthode alternative à la méthode officielle conseillée pour le dénombrement d'*E. coli* dans les eaux de baignade de lacs et de rivières.

Summary

In 54 samples of river water, *E. coli* counts were assessed with a conventional membrane filtration technique and the «Microplate MUG/EC» assay, a miniaturized most probable number method (MPN). With the majority of the analysed samples, higher *E. coli* counts were obtained with the miniaturized MPN method. Statistical analysis (*t*-test) however showed, that the results from both methods did not significantly differ from each other. Precondition for that was an incubation of the microplates for 24 h instead of 36 as recommended by the supplier. Therefore, the rapid and simple «Microplate MUG/EC» assay can be used as an alternative to the recommended official method for the determination of *E. coli* in recreational water of lakes and rivers.

Literatur

1. Empfehlungen für die hygienische Beurteilung von See- und Flussbädern. Bundesamt für Gesundheitswesen, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Verband der Kantonschemiker der Schweiz, Verband der Kantonsärzte der Schweiz, 1991.
2. «Microplate MUG/EC» – miniaturized method for enumeration of *Escherichia coli* in water, Biokar Diagnostics, Zone Industrielle Nr. 2, allée Monge, 60000 Beauvais, France.
3. Persin, C., Plantat, J.-L. et Hugues, B.: Performances de la méthode miniaturisée NPP lorsque le nombre de puits inoculés est important. *Technique Science Méthode* Nr. 5, 341–343 (1996).
4. Essais des eaux – Dénombrement des *Escherichia coli* – Méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide (NPP), norme AFNOR T 90–433, association française de normalisation, 1992.
5. Hernandez, J. F., Guibert, J. M., Delattre, J. M., Oger, C., Charrière, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinègre, F.: Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E. coli* and Enterococci in marine water. *Wat. Sci. Tech.* 24, (2), 137–141 (1991).
6. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56 «Mikrobiologie». Eidgenössische Druck- sachen- und Materialzentrale, Bern 1985.
7. Eidgenössisches Departement des Innern: Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchsgegenstände, Räume, Einrichtungen und Personal vom 26. Juni 1995.

Dr. Sylvia Gautsch
Kantonales Laboratorium
Basel-Stadt
Postfach
CH-4012 Basel