

Mikrobiologische Untersuchungsverfahren von Badegewässern nach Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG

Mitteilung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Bund-Länder-Arbeitsgruppe Badegewässer sowie der Badewasserkommission des UBA

Auf Veranlassung der Bund-Länder-Arbeitsgruppe Badegewässer wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit eine Ad-hoc-Unterarbeitsgruppe von Mikrobiologen berufen, mit dem Auftrag, als Vertreter der Länder einen abgestimmten Vorschlag für einheitliche Untersuchungsmethoden für Badegewässer zu erarbeiten. Die Badewasserkommission des UBA befaßte sich ebenfalls mit einer Vereinheitlichung von Verfahren für die Untersuchung von Gewässern.

Mit Beginn des Jahres 1994 wurde ein Entwurf zur Novellierung der Richtlinie publiziert, und damit wurden neue Vorgaben für die mikrobiologischen Parameter bekannt. Es entstand die schwierige Situation, daß sowohl über Parameter und Untersuchungsmethoden der zur Zeit noch gültigen EG-Richtlinie als auch über Parameter und Untersuchungsmethoden einer zukünftigen EU-Richtlinie zu entscheiden war (Tab. 1).

Der Zeitpunkt für das Inkrafttreten der neuen Richtlinie ist unsicher. Es ist nicht auszuschließen, daß die gegenwärtige Richtlinie u. U. noch längere Zeit gültig bleiben wird. Das bedeutet, daß Metho-

den, über die zu befinden war, noch eine unbestimmte Zeit angewendet werden. Hinsichtlich der Zukunftsprognose mußte man allerdings zwangsläufig von dem vorliegenden Entwurf ausgehen.

Um einen Vergleich bisheriger Untersuchungsergebnisse mit zukünftigen nicht von vornherein unmöglich zu machen, mußten darüber hinaus in Frage kommende Untersuchungsverfahren auch unter diesem Gesichtspunkt kritisch bewertet werden. Das bedeutete unter anderem, daß die bisher in den Ländern üblichen Untersuchungspraktiken in die Betrachtungen einbezogen werden mußten. Im Hinblick auf eine zu erwartende Novellierung der EG-Richtlinie sollten dabei auch die in den letzten Jahren in der Literatur beschriebenen neuen Untersuchungsverfahren berücksichtigt werden.

In den letzten Jahren sind in der mikrobiologischen Wasseranalytik in der EU und auch in einigen Ländern der Bundesrepublik zunehmend Verfahren auf fluoreszenzoptischer Grundlage eingeführt worden. Damit ergibt sich auch für die Bundesrepublik die Notwendigkeit zu überprüfen, inwieweit diese Verfah-

ren für Badegewässeruntersuchungen geeignet sind und ob eine Übereinkunft über einheitlich in den Laboratorien der Bundesländer anzuwendende Verfahren erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang ist entsprechend der angespannten Finanzlage zwangsläufig auch der Frage nach Vereinfachungsmöglichkeiten nachzugehen. Dabei sind häufigere Untersuchungen von Badegewässern mit einer weniger aufwendigen Methode gewichtiger einzustufen als entsprechend aufwendige, dafür aber zwangsläufig seltener durchzuführende Überprüfungen.

Tabelle 1: Mikrobiologische Parameter gemäß der EG-Richtlinie über die Qualität der Badegewässer

| Derzeit gültige Fassung | Neuentwurf |
|---------------------------|---------------------|
| Fäkalcoliforme Bakterien | Escherichia coli |
| Gesamtcoliforme Bakterien | -- |
| Streptococcus faec. | Streptococcus faec. |
| Salmonellen | -- |
| Darmviren | Darmviren |
| -- | Bakteriophagen |

Der Entwurf der Richtlinie sieht die Einführung von Coliphagen als Indikatoren für enterale Viren vor. In Vorgriff auf eine endgültige Verabschiedung wird im Anhang ein Verfahren für die Bestimmung von Coliphagen sowie der Vollständigkeit halber eine Methode für die Bestimmung von Viren angegeben.

Die im Anhang beschriebenen Untersuchungsverfahren wurden mehrheitlich von den Ländervertretern und von der Untergruppe Mikrobiologie der Badewasserkommission befürwortet.

Primäransatz und Anreicherungsverfahren

Mit Ausnahme der Salmonellen und der Darmviren erfordern die Untersuchungen im Hinblick auf die Beurteilung, ob Richtwerte erfüllt oder Grenzwerte überschritten werden, eine quantitative Bestimmung der betreffenden Bakterienkonzentrationen. Sowohl die z.Z. gültige als auch der Entwurf für die neue Richtlinie lassen als Verfahren zur zahlenmäßigen Erfassung der Bakterienkonzentrationen alternativ Membranfiltration mit direkter Erfassung der Bakterienzahlen als Koloniezahlen oder einen Mehrfachansatz mit Flüssigkeitsanreicherung und Bestimmung der MPN (most probable number = höchstwahrscheinliche Zahl) und Auswertung auf statistischer Basis zu. Die Ländervertreter entschieden sich wegen des geringeren Arbeitsaufwandes nahezu einstimmig für letzteres Verfahren.

Im Prinzip gilt, daß sich schon mit wenigen Röhrchen, wie bei der Bestimmung des Titors üblich, ein MPN-Wert errechnen läßt. Die Standard Methods (USA) sehen in den Ausgaben der letzten Jahre einen Ansatz mit wenigstens fünf Paral-

lelreihen vor, vom Pasteur-Institut in Lille (EU) werden Ansätze mit wenigstens 64 Röhrchen als untere Grenze angesehen. Unter Berücksichtigung der seuchenhygienischen Aspekte beim Badegewässer in Relation zum Trinkwasser wurde der Aufwand eines dreifachen Parallelansatzes, und zwar mit drei bzw. vier Verdünnungsstufen, d.h. Volumina von 1 ml bis 10^{-2} bzw. 10^{-3} , und einem Keimerfassungsbereich von < 30 bis $> 11\ 000$ bzw. $110\ 000$ in 100 ml hinsichtlich der zu erwartenden Genauigkeit als ausreichend angesehen.

Beim künftigen Wegfall der gesamtcoliformen Bakterien könnte die letzte Verdünnungsstufe entfallen, da der E. coli (Fäkalcoliformen)-Grenzwert mit dem Erfassungsbereich von < 30 bis $> 11\ 000$ voll abgedeckt ist.

Nachweismethoden für fäkalcoliforme (E. coli) und gesamtcoliforme Bakterien

Unter den genannten Prämissen (Reduzierung des Laboraufwandes) bietet sich der »Einröhrchentest« unter Verwendung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid und Bewertung des entstehenden fluoreszierenden Spaltproduktes Methylumbelliferon an, bei dem Anreicherung und Bestätigung in demselben Ansatzröhrchen stattfinden. Nach bisherigen Erfahrungen ergeben sich für den Nachweis von E. coli (fäkalcoliforme Bakterien) bei 36/37 °C und 44 °C Inkubation keine statistisch relevanten Unterschiede. Aus labortechnischen Gründen sollte auf die 44 °C-Anreicherung zugunsten einer Anreicherung bei 36/37 °C verzichtet werden.

Obwohl gelegentlich falsch-positive Reaktionen durch MUG-spaltende

Stämme von Salmonellen, Shigellen, Clostridien und einigen Keimen aus der Mikrokokken-/Staphylokokkengruppe vorkommen können, handelt es sich hierbei um vernachlässigbare Einzelfälle [6]. Somit werden beim Nachweis fäkalcoliformer Keime aufgrund der MUG-Spaltung überwiegend Stämme von Escherichia coli erfaßt.

Die gesamtcoliformen Bakterien sind nach übereinstimmender Meinung als laktosepositive Enterobacteriaceae zu definieren. Eine Erfassung von fäkalcoliformen Bakterien (gasbildend, MUG-positiv) und gesamtcoliformen Bakterien (gasbildend, MUG-negativ) ist im Einröhrchentest mittels Laktose- und MUG-enthaltenden Nährmedien nur mit der MUG-Laurylsulfatbouillon ohne anschließende Differenzierung (auch der Indolnachweis kann entfallen) nach vorliegenden Veröffentlichungen von Badegewässeruntersuchungen durchführbar [8, 12]. In der MUG-Laurylsulfatbouillon werden laktoseverwertende Aeromonaden unterdrückt und führen nicht zu falsch-positiven Ergebnissen. Dieses Verfahren ist nach dem heutigen Kenntnisstand als Methode der Wahl anzusehen.

Für den gemeinsamen Nachweis von fäkalcoliformen und gesamtcoliformen Bakterien im Einröhrchentest sind darüber hinaus auch andere Laktose- oder ONPG-haltige Nährmedien mit MUG-Zusatz geeignet [5, 11], wie z. B. Laktose-MUG-Bouillon nach DEV, BRILA-MUG-Bouillon und LMX-Bouillon. Bei diesen Medien ist allerdings ohne weitere Differenzierung nur ein Nachweis fäkalcoliformer Bakterien (MUG-positiv) möglich. Die gesamtcoliformen Bakterien werden in den unterschiedlichen Medien durch unterschiedliche Reaktionen (Laktosevergärung, ONPG-Spaltung) definiert, wodurch unterschiedliche Keimspektren erfaßt werden und ein Vergleich untereinander nicht mehr möglich ist [5, 8] (Tab. 2). Daher ist in diesen Fällen ein größerer Aufwand durch Überimpfen, Isolieren und Identifizieren von Einzelkeimen nicht zu umgehen.

Die gemeinsame Erfassung von laktosevergärenden Aeromonaden und coliformen Enterobakterien [5, 8] kann bei Binnengewässern sowohl unter hygienischen als auch unter ökologischen Aspekten durchaus einen Sinn ergeben, erfordert jedoch u. U. zur exakten Absicherung der Befunde zusätzliche Unter-

Tabelle 2: Nachweis verschiedener Bakterien als Escherichia coli oder als gesamtcoliforme Bakterien mit unterschiedlichen MUG-enthaltenden Nährmedien

| Organismengruppe | Nachweismedien | | |
|--|---------------------------|--------------------|--------------|
| | MUG-Laurylsulfat-Bouillon | MUG-BRILA-Bouillon | LMX-Bouillon |
| Escherichia coli (Fäkalcoliforme) | ++ | ++ | ++ |
| Coliforme Enterobakterien aus Fäkalien | ++ | ++ | ++ |
| Coliforme Enterobakterien aus der Umwelt | ++ | + | ++ |
| Nichtkoliforme Enterobakterien mit ONPG-Spaltung | - | - | ++ |
| Laktosevergärende Aeromonaden | - | ++ | - |

suchungen mit weiteren Aeromonaden-spezifischen Methoden [3, 13].

In den Anhang sind die Verfahrensvorschriften sowohl für die Laurylsulfat-MUG-Methode als auch für die Methode mit BRILA-MUG-Bouillon (mit Differenzierung) aufgenommen worden. Dies ist u. a. deswegen angebracht, weil letztgenanntes Verfahren inzwischen in den Küstenländern und einigen anderen Ländern der Bundesrepublik weitgehende Verbreitung gefunden hat.

Fäkalstreptokokken

Fäkalstreptokokken sind nach Flüssigkeitsanreicherung mit Azid-D-Glucose-Bouillon und Ausstreichen positiver Röhrchen auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar oder Slanetz-Bartley-Agar gemäß der im Anhang beschriebenen Methode zu ermitteln. Allgemein werden Fäkalstreptokokken als wesentlicher Hygieneparameter im Meerwasser angesehen. Im Süßwasser wird ihnen nicht die gleiche Indikatoreigenschaft zugesprochen, jedoch ist unter bestimmten Voraussetzungen (Algenblüte) eine höhere Persistenz der Fäkalstreptokokken verglichen mit *E. coli* beobachtet worden [7]. Daher ist es empfehlenswert, beide Parameter zu bestimmen. Die unten empfohlene Methode der Flüssigkeitsanreicherung ist zwar aufwendiger als der Nachweis über Membranfiltration, wird aber in Deutschland häufiger angewandt. Inwieweit die Ergebnisse der Membranfiltration und diejenigen der Flüssigkeitsanreicherung einander entsprechen, soll in einer künftigen Studie geklärt werden. Die jetzige (gültige) Fassung der Richtlinie schreibt keinen verbindlichen Bestimmungsrhythmus für die Fäkalstreptokokken vor. In dem Entwurf zur Novelle sollen die Fäkalstreptokokken jedoch vierzehntägig bestimmt werden.

Salmonellen

Diese werden künftig gemäß dem Neufassungsentwurf der EG-Richtlinie als Routineparameter entfallen. Untersuchungen im Rahmen epidemiologischer Erhebungen können nach wie vor vom Amtsarzt veranlaßt werden. Als Fäkalindikatorbakterien besitzen Salmonellen nur einen begrenzten Wert. Salmonellenuntersuchungen z. B. im Anschluß an aufgetretene Grenzwertüberschreitungen für fäkalcoliforme Bakterien sind nicht begründet, zumal sich aus zusätzlichen positiven Befunden kein höheres Gesundheitsrisiko ableiten läßt.

Darmviren

Viren werden sowohl in der noch gültigen Richtlinie als auch im Entwurf der zukünftigen Fassung als Parameter angegeben. Bekanntlich werden Viren in Zellkulturen nachgewiesen. Jedoch sind viele Virusarten, die mit dem Faeces ausgeschieden werden, nicht in der Lage, Zellkulturen zu infizieren, und sind mit diesem Verfahren daher nicht nachweisbar. Aber auch die Viren, die Zellkulturen infizieren, vermögen nicht jede beliebige Zelllinie zu infizieren. Je nach der Zelllinie, die als Indikator verwendet wird, weist man daher ein unterschiedliches Virusspektrum nach.

Die typischen Zellveränderungen, die die Anwesenheit von Viren in der Zellkultur signalisieren (Cytopathischer Effekt = CPE), erscheinen frühestens einige Tage, nachdem die Zellkultur mit der Wasserprobe angeimpft wurde. Jedoch brauchen manche Viren bis zu 50 Tage oder länger, bis sie einen CPE verursachen. Da in dieser Zeit das Nährmedium verbraucht wird und sich die Zellen vermehren, muß die Kultur mehrmals mit einer geringeren Zelldichte umgesetzt werden. Wird die Zeit, während der die Zellkulturen nach ihrer Animpfung beobachtet werden, verkürzt, z. B. auf zwei Wochen, ist die Ausbeute an Viren deutlich geringer.

Die Unwägbarkeiten, die mit der Wahl der Indikatorzellen einhergehen, sowie die relativ lange Zeitdauer des Nachweisverfahrens machen die Bestimmung von Viren in Gewässern wenig geeignet für den Routinebetrieb. Untersuchungen auf Viren können nur von wenigen Speziallaboratorien durchgeführt werden und sind nur bei epidemiologischen Verdachtsfällen oder im Rahmen von Forschungsaufgaben gerechtfertigt.

Wir geben ein Nachweisverfahren an, das sich an die Methode von Walter und Rüdiger anlehnt [14].

Bakteriophagen (Coliphagen)

Der Entwurf zur novellierten Fassung der Badegewässerrichtlinie sieht jedoch die Einführung von Coliphagen als virale Indikatoren vor. Coliphagen sind Bakterienviren, die sich in *E. coli* und gegebenenfalls anderen verwandten Bakterien vermehren können.

Zu der Eignung von Coliphagen als Indikatoren für humanpathogene Viren ist die Meinung von Fachleuten geteilt. Der

Haupteinwand gegen Bakteriophagen ist, daß sie sich, im Gegensatz zu humanpathogenen Viren, in der Umwelt vermehren können und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten. In der Tat findet man in frischem Stuhl weniger Coliphagen als im Rohabwasser, so daß angenommen werden muß, daß es zu einer extrakorporalen Vermehrung von Phagen kommt. Zu einer weiteren Vermehrung der Coliphagen im Klärwerk kommt es aber nicht. In einem typischen mitteleuropäischen Klärwerk werden die Coliphagen des Rohabwassers im gleichen Maße reduziert wie enterale Viren. Offensichtlich sind ältere *E. coli* (oder andere permissive Bakterien) im Klärwerk zu einer Vermehrung von Phagen nicht mehr in der Lage. Auch in freien Gewässern beobachtet man eine Reduktion von Coliphagen.

Es ist daher davon auszugehen, daß Coliphagen ein akzeptabler Indikator für enterale Viren sind. Schlimmstenfalls sind falsch-positive Ergebnisse zu befürchten. Diesem kann man jedoch mit der Bedingung entgegenwirken, auf enterale Viren zu untersuchen, wenn die Anzahl von Coliphagen einen bestimmten Wert überschreitet.

Grenzwerte

Es sollte für den *E. coli*-Grenzwert eine Angleichung an den Grenzwert der WHO-Empfehlungen (1000/100 ml) angestrebt werden. Die Glaubwürdigkeit eines Indikatorwertes wird durch die Übereinstimmung mit nicht zur EU gehörenden Nachbarländern nur verstärkt. Im übrigen sind bei der Ermittlung nach dem MPN-Verfahren nur wenige, eher unwahrscheinliche Werte zwischen 930 und 2400 zu erwarten, so daß die »Verschärfung« des Grenzwertes hinsichtlich vermehrter Beanstandungen sich nicht gravierend bemerkbar machen wird.

Eine Erhöhung des Grenzwertes für Fäkalstreptokokken auf 1000/100 ml wurde erwogen, fand aber keine Mehrheit. Stattdessen wurde dem Richtlinienentwurf (vor allem aufgrund des bei Binnengewässern offensichtlich schnelleren Absterbeverhaltens im Vergleich zu *E. coli*) mit dem vorgesehenen Grenzwert von 400/100 ml mit 8 : 4 Stimmen zugestimmt.

Der Entwurf für die novellierte Richtlinie enthält Coliphagen als Parameter, ein Grenzwert wird jedoch nicht angege-

ben. Die Angabe eines Grenzwertes, ohne gleichzeitig einen Indikatorstamm für den Nachweis der Phagen vorzuschreiben, hätte auch wenig Sinn, hängt die Anzahl der nachweisbaren Phagenpartikel doch sehr stark von dem verwendeten Indikatorstamm ab. Für den im Anhang angegebenen *E. coli*-Stamm wurde am Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene anhand zahlreicher Untersuchungen gefunden, daß im mechanisch-biologisch gereinigten Abwasser das Verhältnis von enteralen Viren zu Coliphagen in der Größenordnung von 1 zu 1000 bis 10 000 schwankt. Auch in anderen Untersuchungen wurden entsprechende Korrelationen gefunden [9]. Es wird daher vorgeschlagen, Gewässer mit mehr als 5 PFU Coliphagen in 10 ml als bedenklich zu betrachten. Tatsächlich wurde festgestellt, daß in Gewässern ohne oder mit geringen Abwassereinleitungen dieser Wert nicht erreicht wurde. Vom Standpunkt der Kosteneindämmung erscheint es sinnvoll, (kostenaufwendige) Untersuchungen von enteralen Viren erst zu veranlassen, wenn der Wert für die (kostengünstig zu untersuchenden) Coliphagen bedenklich hoch ausfällt.

Gemäß Artikel 7.1 der Novellierung der EG-Richtlinie wird die Volksgesundheit dann als gefährdet angesehen, wenn von den Grenzwerten bedeutend abgewichen wird. In diesem Fall ist ein Badeverbot zu erlassen. Die Mehrheit der Ländervertreter war sich darüber einig, daß »eine bedeutende Abweichung vom Grenzwert« gemäß Artikel 7.1 nur dann gegeben ist, wenn Grenzwertüberschreitungen in einer unmittelbar zu erfolgenden Wiederholungsprobe und/oder bei Nachfolgeproben in der gleichen Saison erneut festgestellt werden. Bei aufzustellenden Badeverbotsschildern oder Warnschildern sollte der Beanstandungsgrund aufgeführt werden.

Literatur:

[1] EG-Richtlinie von 1976–76/160 EWG (Richtlinie des Rates über die Qualität der Badegewässer vom 8.12.1975). Amtsbl. EG. Nr. 31/1 vom 5.2.1976.
 [2] Empfehlungen des BGA zur Richtlinie der EG über die Qualität der Badegewässer (EG-Richtlinie 76/160 EWG vom 8.12.1975). Bundesgesundhbl. 32, 6 (1989) 259-260.
 [3] Aeromonadeninfektionen beim Angeln oder bei Unfällen im Wasser. BGA-Pressedienst 22/1990 vom 7.6.1990.
 [4] Badestellenüberwachung nach der EG-Richtlinie des Rates der EG vom 8.12.1975 über die Qualität der Badegewässer. Ad-hoc-Arbeitsgruppe Küstengewässer. Zbl.Hyg. 192 (1991) 57-75.

[5] Badestellenüberwachung nach der EG-Richtlinie des Rates der EG vom 8.12.1975 über die Qualität der Badegewässer (Änderungen). Ad-hoc-Arbeitsgruppe Küstengewässer. Zbl.Hyg. 195 (1993) 1–8.
 [6] Aleksic, S., Bockemühl, J., Schulze, G., Havemeister, G., Heinemeyer, E. A., Müller, H. E., und von Pritzbuier, E.: Reaktionen verschiedener Enterobacteriaceae- und Vibrionaceae-Spezies in BRILA-MUG (Fluorocult)-Bouillon. Zbl.Hyg. 190 (1990) 395-403.
 [7] Carmienke, I.: Algenmassenentwicklungen und hygienisch-bakteriologischer Status. Beobachtungen an Badegewässern Nordwestsachsens. Bundesgesundhbl. 36 (1993) 410–415.
 [8] Gundermann, K. O., Havemeister, G., Höller, C., Erichsen, H., und Horstmann, J.: Bewertung des Parameters »Gesamtcoliforme Bakterien« aus hygienischer und ökologischer Sicht. Schriftenreihe des MNUL-S.H., D 13 (1993).
 [9] Havelaar, A. H., van Olphen, M., and Drost, Y.: F-Specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993) 2956-2962.
 [10] Havemeister, G., Aleksic, S., Bockemühl, J., Heinemeyer, E. A., Müller, H. E., und von Pritzbuier, E.: Vergleichende Untersuchungen von Süß- und Seewasser zur Bestimmung der gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien nach der EG-Richtlinie 76/160 EWG (Badegewässer) unter Anwendung des MPN-Verfahrens mit BRILA-MUG-Bouillon und Differenzierung nach der TrinkwV. Zbl. Hyg. 191 (1991) 523-538.
 [11] Manafi, M., und Kneifel, W.: Ein kombiniertes Chromogen-Fluorogen-Medium zum simultanen Nachweis der Coliformengruppe und von *E.coli* in Wasser. Zbl.Hygiene und Umweltmedizin 189 (1989) 225-234.
 [12] Schindler, P. R. G.: MUG-Laurylsulfatbouillon – ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badegewässern gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG. Zbl.Hyg. 191 (1991) 438-444.
 [13] Schubert, R. H. W.: *Aeromonas* und *Plesiomonas*. In: Mikrobiologische Diagnostik (Hrsg. F. Burckhardt). Stuttgart/New York: Thieme Verlag 1992.
 [14] Walter, R., and Rüdiger, S.: A two stage method for concentrating viruses from solutions with low virus titers. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 25 (1981) 71–81.

und biochemisch differenziert werden. Es handelt sich um aerobe, fakultativ anaerobe, gramnegative, sporenlöse, laktosepositive (Gasbildung) Stäbchenbakterien. Dies trifft auch für den Nachweis von fäkalcoliformen Bakterien zu, wobei hier jedoch überwiegend Stämme von *E. coli* erfaßt werden.

1.2 Kurzbeschreibung des Nachweises und der Bestimmung von gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien

Nachweis und Bestimmung der gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien erfolgen in einem Ansatz nach dem MPN-Verfahren (»most probable number«) mit Laurylsulfat-Bouillon und Zusatz von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (LS-MUG).

Die gesamtcoliformen Bakterien werden in ihrer Fähigkeit zur Gasbildung aus Laktose bei 36 °C erkannt, die fäkalcoliformen Bakterien durch die Bildung des fluoreszierenden Spaltproduktes Methylumbelliferon ebenfalls bei 36 °C (dadurch kann ein Ansatz bei 44 °C entfallen).

Die quantitative Bestimmung beider Bakteriengruppen erfolgt anhand der MPN-Tabelle für dreifachen Ansatz (Abschnitt 1.6) durch Ablesen der entsprechenden positiven Reaktionen.

1.3 Nährmedium zum Nachweis von gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien

1.3.1 Laurylsulfat-Bouillon mit MUG (LS-MUG)

Bestandteile:

- 20,0 g Tryptose
- 5,0 g Lactose
- 5,0 g Natriumchlorid
- 0,1 g Natriumlaurylsulfat
- 2,75 g di-Kaliumhydrogenphosphat
- 2,75 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 0,1 g 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG)
- 1,0 g L-Tryptophan
- ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Tryptose, Laktose, Natriumchlorid, Natriumlaurylsulfat, di-Kaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat werden in einem Glaskolben in A.dest. unter Erhitzen gelöst und auf einen pH-Wert von 6,8 \pm 0,1 eingestellt. Anschließend wird MUG zugegeben. Die Lösung wird in Teilmengen von je

Anhang: Untersuchungsmethoden

1 Gesamtcoliforme Bakterien und fäkalcoliforme Bakterien (*E. coli*) (Laurylsulfat-MUG-Bouillon)

1.1 Begriffe

Unter gesamtcoliformen Bakterien versteht man im Sinne der vorliegenden Bestimmungsmethoden keine taxonomisch einheitliche Bakterienspezies, sondern Bakterien, die verschiedene Arten umfassen können und als Mischkulturen nach der in Abschnitt 1.2 und 1.4 beschriebenen Methode selektiv kultiviert

1.5.3 MPN-Tabelle (Anmerkungen siehe S. 390)

Tabelle zur Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen (MPN: Most Probable Number) in 100-ml-Proben bei Verwendung von jeweils drei Ansatzröhrchen je Verdünnungsstufe, beginnend mit 1-ml-Probe

| Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen | | | MPN in 100 ml | Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen | | | MPN in 100 ml |
|---|--------|---------|---------------|---|--------|---------|---------------|
| 1 ml | 0,1 ml | 0,01 ml | | 1 ml | 0,1 ml | 0,01 ml | |
| 0 | 0 | 0 | < 30 | 2 | 0 | 0 | 91 |
| 0 | 0 | 1 | 30 | 2 | 0 | 1 | 140 |
| 0 | 0 | 2* | 60 | 2 | 0 | 2* | 200 |
| 0 | 0 | 3* | 90 | 2 | 0 | 3* | 260 |
| 0 | 1 | 0 | 30 | 2 | 1 | 0 | 150 |
| 0 | 1 | 1* | 61 | 2 | 1 | 1 | 200 |
| 0 | 1 | 2* | 92 | 2 | 1 | 2* | 270 |
| 0 | 1 | 3* | 120 | 2 | 1 | 3* | 340 |
| 0 | 2 | 0* | 62 | 2 | 2 | 0 | 210 |
| 0 | 2 | 1* | 93 | 2 | 2 | 1 | 280 |
| 0 | 2 | 2* | 120 | 2 | 2 | 2* | 350 |
| 0 | 2 | 3* | 160 | 2 | 2 | 3* | 420 |
| 0 | 3 | 0* | 94 | 2 | 3 | 0* | 290 |
| 0 | 3 | 1* | 130 | 2 | 3 | 1* | 360 |
| 0 | 3 | 2* | 160 | 2 | 3 | 2* | 440 |
| 0 | 3 | 3* | 190 | 2 | 3 | 3* | 530 |
| 1 | 0 | 0 | 36 | 3 | 0 | 0 | 230 |
| 1 | 0 | 1 | 72 | 3 | 0 | 1 | 390 |
| 1 | 0 | 2* | 110 | 3 | 0 | 2 | 640 |
| 1 | 0 | 3* | 150 | 3 | 0 | 3* | 950 |
| 1 | 1 | 0 | 73 | 3 | 1 | 0 | 430 |
| 1 | 1 | 1 | 110 | 3 | 1 | 1 | 750 |
| 1 | 1 | 2* | 150 | 3 | 1 | 2 | 1200 |
| 1 | 1 | 3* | 190 | 3 | 1 | 3* | 1600 |
| 1 | 2 | 0 | 110 | 3 | 2 | 0 | 930 |
| 1 | 2 | 1* | 150 | 3 | 2 | 1 | 1500 |
| 1 | 2 | 2* | 200 | 3 | 2 | 2 | 2100 |
| 1 | 2 | 3* | 240 | 3 | 2 | 3* | 2900 |
| 1 | 3 | 0* | 160 | 3 | 3 | 0 | 2400 |
| 1 | 3 | 1* | 200 | 3 | 3 | 1 | 4600 |
| 1 | 3 | 2* | 240 | 3 | 3 | 2 | 11000 |
| 1 | 3 | 3* | 290 | 3 | 3 | 3 | 11000 |

Bei der Auswertung für die Verdünnungsstufen 0,1 ml–0,01 ml jeweils obige Werte × 10 nehmen (eine 0 anhängen). Ferner ergeben: 331 = – 4600; 332 = – 11000; 333 = > 11000.

10 ml in Reagenzgläser mit DURHAM-Röhrchen abgefüllt und 15 Min. bei 121 °C autoklaviert. Danach dürfen die Gärröhrchen keine Luftblasen mehr enthalten.

Das Nährmedium kann auch als Trokennährboden über den Handel bezogen werden.

1.4 Nachweis von gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien

Vor Beginn der Untersuchung muß die Wasserprobe aufgeschüttelt werden.

1.4.1 Kultur in LS-MUG-Bouillon

In dreimal drei (vier) Kulturröhrchen mit je 10 ml LS-MUG-Bouillon (nach 1.3.1) werden aus der Probenahmegefäße unter sterilen Bedingungen je dreimal 1,0 ml, 0,1 ml, 0,01 ml (und

0,001 ml) des zu untersuchenden Wassers einpipettiert. Die letzten beiden Konzentrationen werden über eine Verdünnung 1 : 100 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Sodann werden die Röhrchen bei 36 °C ± 1 °C 24 h bzw. 44 h ± 4 h bebrütet.

1.4.2 Biochemische Untersuchung

Die Röhrchen werden nach 24 h ± 4 h und, falls sie negativ sind, nach 44 h ± 4 h auf Gasbildung geprüft. Die Gasbildung wird durch das DURHAM-Röhrchen erkannt. Sie wird als Zeichen des Laktoseabbaus angesehen. Nur die gaspositiven Röhrchen werden weitergehend auf Fluoreszenz überprüft.

Die Fluoreszenz wird unter einer UV-Lampe geprüft, die Licht mit der Wellenlänge von 366 nm aussendet. Das ge-

schieht zweckmäßigerweise in einer Dunkelkammer oder in einem für diese Zwecke entwickelten Dunkelkabinett. Eine hellblaue Fluoreszenz im ganzen Röhrchen spricht für β-Glucuronidase-Aktivität durch fakultativ anaerobe Bakterien (fluoreszierende Pseudomonaden zeigen ggf. nur im oberen Teil des Röhrchens eine grüne Eigenfluoreszenz!). Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute sollten zur besseren Beurteilung den nach 44stündiger Bebrütung noch fluoreszenznegativen Röhrchen 0,5 ml einer 1 N NaOH-Lösung zugegeben werden.

1.4.3 Identifizierung

a) Die fäkalcoliformen Bakterien (FC) sind bei Bebrütung über 44 h ± 4 h und 36 °C ± 1 °C in der LS-MUG-Kultur durch die folgenden Merkmale definiert:

- Gasbildung durch Laktoseabbau
- β-D-Glucuronidase-Nachweis durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (MUG) mit Auftreten von Fluoreszenz. Kulturröhrchen, in denen die genannten Reaktionen positiv sind, werden daher als positiv für fäkalcoliforme Bakterien angesehen.

b) Die gesamtcoliformen Bakterien (= gasbildende Enterobacteriaceae = GCE) sind bei Bebrütung über 44 h ± 4 h und 36 °C in LS-MUG-Bouillon ausschließlich durch das folgende Merkmal definiert:

- Gasbildung durch Laktoseabbau

1.5 Auswertung

1.5.1 Ermittlung der Konzentration fäkalcoliformer Bakterien (FC)

Aus den positiven Röhrchen nach Abschnitt 1.4.3 a) wird die Kennziffer gebildet. Aus der MPN-Tabelle für den dreifachen Ansatz (nach 1.5.3) wird die zur Kennziffer gehörige höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) entnommen.

Anmerkung: Bei Auswertung der Verdünnungskombination 0,1 ml – 0,01 ml – 0,001 ml wird diese zunächst der Verdünnungskombination 1,0 ml – 0,1 ml – 0,01 ml gleichgesetzt und die höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) zum Schluß mit dem Faktor 10 multipliziert.

1.5.2 Ermittlung der Konzentration gesamtcoliformer Bakterien (= gasbildende Enterobacteriaceae = GCE)

Als positiv werden ausschließlich die gaspositiven Verdünnungsröhrchen

nach Abschnitt 1.4.3 b) gerechnet. Nach diesen positiven Röhrchen wird die dreistellige Kennziffer gebildet und wie unter 1.5.1 beschrieben aus der MPN-Tabelle nach 1.5.3 die höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) abgelesen.

Anmerkung zur MPN-Tabelle (1.5.3):

Vertrauensgrenzen für wahrscheinliche Röhrchenkombinationen sind in der Literatur angegeben [4] und berücksichtigen ausschließlich die zufällige Streuung der Ergebnisse. Unwahrscheinliche Röhrchenkombinationen ($p < 10^3$) sind in obiger Tabelle mit einem Sternchen versehen. Aufgrund von natürlichen Variationsquellen (Zellverbände, gegenseitige Keimbefruchtungen) kommen sie gelegentlich vor, sollten jedoch auch Anlaß sein, die Methodik auf eventuelle Fehler hin zu überprüfen.

1.6 Angabe der Ergebnisse

Fäkalcoliforme Bakterien (FC):

n/100 ml (MPN)

Gesamtcoliforme Bakterien (GCE):

n/100 ml (MPN)

Anmerkung: Definitionsgemäß gilt für die Angabe der Ergebnisse folgende Beziehung:

$$n(\text{FC}) \leq n(\text{GCE}),$$

das heißt, die Werte für den Parameter GCE müssen gleich oder größer als die für den Parameter FC sein. Dies entspricht im übrigen auch der hygienischen Gewichtung.

2 Fäkalcoliforme Bakterien und gesamtcoliforme Bakterien (Anreicherung mit BRILA-MUG)

2.1 Begriffe

Siehe Abschnitt 1.1

2.2 Kurzbeschreibung des Nachweises und der Bestimmung von gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien

Nachweis und Bestimmung der gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien erfolgen in einem Ansatz nach dem MPN-Verfahren («most probable number») mit Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon unter Zusatz von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (BRILA-MUG) nach Zwischenkultur auf ENDO-Agar und Prüfung der Oxidase-Reaktion.

Die fäkalcoliformen Bakterien (= FC) werden an ihrer Fähigkeit zur Gasbildung aus Lactose und des fluoreszierenden Spaltproduktes Methylumbelliferon

bei 36 °C erkannt (dadurch kann der Ansatz bei 44 °C entfallen).

Gesamtcoliforme Bakterien (= gasbildende Enterobacteriaceae = GCE) erkennt man durch Gasbildung aus Lactose bei 36 °C und oxidasenegativer Reaktion der Isolate vom ENDO-Agar.

Die quantitative Bestimmung der genannten Bakteriengruppen erfolgt nach Auswertung des dreifachen MPN-Ansatzes anhand der McCrady-Tabelle (siehe Abschnitt 1.5.3).

2.3 Nährmedien und Reagenzien zum Nachweis von fäkalcoliformen und gesamtcoliformen Bakterien

2.3.1 Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon mit MUG (BRILA-MUG)

Bestandteile:

10,0 g Pepton aus Casein

10,0 g Lactose

20,0 g Ochsen-galle, getrocknet

0,1 g 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG)

0,01 g Brillantgrün

ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Pepton, Lactose und Ochsen-galle werden in einem Glaskolben in A. dest. unter Erhitzen gelöst und mit 1 N Natron-lauge auf einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,1$ eingestellt. Anschließend werden MUG und Brillantgrün zugegeben. Die Lösung wird in Teilmengen von je 10 ml in geeignete Röhrchen, die mit Gärröhrchen beschickt sind, abgefüllt und strömendem Dampf ausgesetzt. Danach dürfen die Gärröhrchen keine Luftblasen mehr enthalten.

Die Herstellung der BRILA-MUG-Bouillon bedarf besonderer Umsicht und Erfahrung, denn sowohl Erhitzung des in Wasser gelösten, käuflichen Fertignährmediums über 100 °C (Autoklavieren) als auch längerdauernde Erhitzung (> 30 Min.) bewirken eine Zersetzung. Das ist durch eine charakteristische Farbänderung von smaragd- nach flaschengrün zu erkennen. Die Zersetzungsprodukte führen zu einer unerwünschten hohen Hemmwirkung gegenüber gesamtcoliformen und fäkalcoliformen Bakterien. Die Abtötung der vegetativen Keime sollte durch 30 Min. Erhitzen im strömenden Wasserdampf bei 100 °C vorgenommen werden. Das Autoklavieren der Bouillon muß unterbleiben, denn die BRILA-MUG-Bouillon ist

hitzeempfindlich, und thermoresistente Sporen werden durch die im Nährmedium enthaltenen Hemmstoffe inhibiert. Ggf. vorhandene Enterobacteriaceae oder andere vegetative, Galle- und Brillantgrün tolerierende Bakterien werden bereits bei 100 °C sicher abgetötet. Bei jedem Ansatz sollte durch Farbvergleich zweier BRILA-MUG-Röhrchen vor und nach der Dampfbehandlung überprüft werden, ob sich die ursprüngliche smaragdgrüne Farbe verändert hat.

2.3.2 ENDO-Agar (Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar)

Bestandteile:

10,0 g Fleischextrakt

10,0 g Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)

5,0 g Natriumchlorid

10,0 g Lactose

5,0 ml Fuchsinlösung (10 g Fuchsin in 90 ml Ethanol)

2,5 g Natriumsulfit

20,0 g Agar-Agar

ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Wegen der bekannten kanzerogenen Eigenschaften des Fuchsin sollte grundsätzlich nur fertiger Trockennährboden verwendet werden. Trockennährmedien, die Fuchsin enthalten, sind unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen (Handschuhe, Mundschutz!) und nach Anweisung des Herstellers anzusetzen. Im noch flüssigen Nährboden den pH-Wert mit Natriumcarbonat-Lösung auf $7,3 \pm 0,1$ einstellen. Im Autoklav sterilisieren und 15 ml in Petrischalen abfüllen.

2.3.3 Nähragar

Bestandteile:

10,0 g Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)

10,0 g Fleischextrakt

5,0 g Natriumchlorid

15,0 g Agar-Agar

ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Das Gemisch von Pepton, Fleischextrakt, Natriumchlorid in 1000 ml A. dest. quellen lassen (etwa 15 Min.) und danach bis zur vollständigen Lösung im Dampftopf kochen. Anschließend den pH-Wert mit 1 N NaOH-Lösung auf $7,3 \pm 0,1$ einstellen und im Autoklav 15 Min. bei 121 °C sterilisieren, 15 ml in Petrischalen abfüllen.

2.3.4.1 Oxidase-Reagenz (NADI)

Bestandteile:

Lösung 1 1,0 g N,N-Dimethyl-1,4-phenylen-diammoniumchlorid, $C_8H_{14}C_{12}N_2$ ad 100 ml Wasser

Lösung 2 1,0 g α -Naphthol, $C_{10}H_8O$ ad 100 ml Ethanol

Lösungen im Kühlschrank aufbewahren.

Herstellung:

Gleiche Volumina von Lösung 1 und 2 werden unmittelbar vor Gebrauch vermischt.

Anmerkung: Verfärbte Ausgangslösungen sind unbrauchbar!

alternativ:

2.3.4.2 Oxidase-Reagenz (TMPD)

Bestandteile:

1,0 g N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylen-diamin (TMPD) ad 100 ml Wasser

Lösung im Kühlschrank aufbewahren.

Herstellung:

1,0 g TMPD werden in 100 ml Wasser unter leichtem Schütteln gelöst.

Anmerkung: Die Haltbarkeit der Lösung beträgt nur wenige Tage!

2.4 Nachweis von fäkalcoliformen und gesamtcoliformen Bakterien

Vor Beginn der Untersuchung muß die Probe aufgeschüttelt werden.

2.4.1 Kultur in BRILA-MUG-Bouillon

In dreimal drei (vier) Kulturröhrchen mit je 10 ml BRILA-MUG-Bouillon (nach 2.3.1) werden aus der Probenahmeflasche unter sterilen Bedingungen je dreimal 1,0 ml, 0,1 ml, 0,01 ml (und 0,001 ml) des zu untersuchenden Wassers einpipettiert. Die letzten beiden Konzentrationen werden über eine Verdünnung 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Sodann werden die Röhrchen bei $36\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 24 h bzw. 44 h \pm 4 h bebrütet.

2.4.2 Biochemische Untersuchung

Die Röhrchen werden nach 24 h \pm 4 h und falls sie negativ sind, nach 44 h \pm 4 h auf Gasbildung geprüft. Die Gasbildung wird durch das DURHAM-Röhrchen erkannt. Sie wird als Zeichen des Laktoseabbaus angesehen. Nur die gaspositiven Röhrchen werden weiter auf Fluoreszenz überprüft.

Die Fluoreszenz wird unter einer UV-Lampe geprüft, die Licht mit der Wellenlänge von 366 nm aussendet. Das geschieht zweckmäßigerweise in einer Dunkelkammer oder in einem für diese Zwecke entwickelten Dunkelkabinett. Eine hellblaue Fluoreszenz im ganzen Röhrchen spricht für β -Glucuronidase-Aktivität durch fakultativ anaerobe Bakterien. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute können zur besseren Beurteilung den nach 44stündiger Bebrütung noch fluoreszenznegativen Röhrchen 0,5 ml einer 1 N NaOH-Lösung zugegeben werden.

Gaspositive, aber fluoreszenznegative Röhrchen werden mit einer sterilen Impföse auf ENDO- oder gleichwertigem Agar fraktioniert ausgestrichen (die Subkultur hat den Zweck, die Keime selektiv in Einzelkolonien anzuzüchten). Anschließend wird 24 h \pm 4 h bei $36\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank bebrütet. Petrischalen mit ENDO-Agar sollten nicht unnötig lange dem Tageslicht ausgesetzt werden, da der Nährboden sich rot verfärbt und damit die Bewertung erschwert. Von morphologisch unterscheidbaren verdächtigen Kolonien (als typische Kolonien gelten fuchsinglänzende sowie rote bis rosarote Kolonien) werden mindestens drei einzeln gewachsene Kolonien abgeimpft und auf Nähragar (2.3.3) ausgestrichen. Der beimpfte Nähragar wird 24 h \pm 4 h bei $36\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ bebrütet. Die gewachsenen Kolonien werden mit jeweils einem Tropfen Oxidase-Reagenz (2.3.4.1 bzw. 2.3.4.2) überschichtet.

Positive Oxidase-Reaktion:

Blaufärbung der Kolonien bzw. der Ränder innerhalb von max. 2 Min. (NADI) bzw. rosa bis purpurne Verfärbung innerhalb 15 Sek. (TMPD).

Negative Oxidase-Reaktion:

Keine Farbveränderung der Kolonien nach 1 bis 2 Min. bzw. nach 10 bis 15 Sek.

2.4.3 Identifizierung

Die fäkalcoliformen Bakterien (FC) sind bei Bebrütung über 44 h \pm 4 h und $36\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ in der BRILA-MUG-Kultur durch die folgenden zwei gemeinsam auftretenden Merkmale definiert:

- Gasbildung durch Laktoseabbau
- β -D-Glucuronidase-Nachweis durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) mit Auftreten von Fluoreszenz.

Kulturröhrchen, in denen die genannten Reaktionen positiv sind, werden daher als positiv für fäkalcoliforme Bakterien angesehen.

Die gesamtcoliformen Bakterien (= gasbildende Enterobacteriaceae = GCE) sind bei Bebrütung über 44 h \pm 4 h und $36\text{ }^\circ\text{C}$ in der BRILA-MUG-Bouillon durch die folgenden beiden gemeinsamen Merkmale definiert:

- Gasbildung durch Laktoseabbau,
- negative Oxidase-Reaktion.

Kulturröhrchen, die nach a positiv sind und von denen ebenfalls die Isolate nach b eine negative Oxidase-Reaktion ergaben, werden als positiv für gesamtcoliforme Bakterien (GCE) angesehen.

Anmerkung: Bei Mischkulturen mit unterschiedlichen Ergebnissen für den Oxidase-Test wird das entsprechende Verdünnungsröhrchen als oxidasenegativ = positiv für gesamtcoliformen Bakterien (GCE) gewertet.

2.5 Auswertung

2.5.1 Ermittlung der Konzentration fäkalcoliformer Bakterien(FC)

Als positiv werden diejenigen BRILA-MUG-Röhrchen gerechnet, in denen Gas gebildet wurde und die im Fluoreszenztest positive Reaktionen zeigten. Aus diesen positiven Röhrchen wird die Kennziffer gebildet. Für einen Ansatz mit vier Verdünnungsstufen gilt: Wenn alle Röhrchen der ersten drei Verdünnungen (1,0 ml – 0,1 ml – 0,01 ml) ausnahmslos positiv sind, werden die Röhrchen der letzten drei Verdünnungsstufen (0,1 ml – 0,01 ml – 0,001 ml) zur Auswertung herangezogen. Aus der MPN-Tabelle für den dreifachen Ansatz (nach 1.5.3) wird die zur Kennziffer gehörige höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) entnommen.

Anmerkung: Bei Auswertung der Verdünnungskombination 0,1 ml – 0,01 ml – 0,001 ml wird diese zunächst der Verdünnungskombination 1,0 ml – 0,1 ml – 0,01 ml gleichgesetzt und die höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) zum Schluß mit dem Faktor 10 multipliziert.

2.5.2 Ermittlung der Konzentration gesamtcoliformer Bakterien (= gasbildende Enterobacteriaceae = GCE)

Als positiv werden alle gas- und fluoreszenzpositiven Verdünnungsröhrchen gerechnet sowie diejenigen Verdünnungsröhrchen, in denen nur Gas gebil-

det wurde und die nach Ausstrich eine negative Oxidasereaktion zeigten. Nach diesen positiven Röhrchen wird die dreistellige Kennziffer gebildet und wie unter 2.5.1 weiter beschrieben aus der MPN-Tabelle nach 1.5.3 die höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) abgelesen.

2.6 Angabe der Ergebnisse

Fäkalcoliforme Bakterien (FC):

n/100 ml (MPN)

Gesamtcoliforme Bakterien (GCE):

n/100 ml (MPN)

Anmerkung: Definitionsgemäß gilt für die Angabe der Ergebnisse folgende Beziehung:

$n(FC) \leq (GCE)$,

das heißt, die Werte für den Parameter GCE müssen jeweils gleich oder größer als der Parameter für FC sein. Dies entspricht im übrigen auch der hygienischen Gewichtung.

3 Fäkalstreptokokken

3.1 Begriffe

Unter »*Streptococcus faec.*« oder Fäkalstreptokokken (Enterokokken) versteht man ebenfalls keine taxonomisch einheitliche Bakterienspezies, sondern eine Bakteriengruppe, die nach der in 3.2 und 3.4 beschriebenen Methode selektiv angezüchtet und biochemisch differenziert wird. Es handelt sich um aerobe, fakultativ anaerobe, grampositive, sporenlose Kokken.

3.2 Kurzbeschreibung des Nachweises und der Bestimmung von Fäkalstreptokokken

Nachweis und Bestimmung der Fäkalstreptokokken werden nach folgendem Verfahren durchgeführt:

Kultur in Azid-D-Glucose-Bouillon nach dem MPN-Verfahren und Ausstreichen positiver Röhrchen auf selektiven Nährböden, die nach Bebrütung auf charakteristische Kolonien beurteilt werden. Die quantitative Auswertung erfolgt anhand der MPN-Tabelle für dreifachen Ansatz (Abschnitt 1.5.3) durch Ablesen der Röhrchen, aus denen auf den selektiven Nährböden charakteristische Kolonien gewachsen waren.

3.3 Nährmedien und Reagenzien zum Nachweis von Fäkalstreptokokken

3.3.1 Azid-Glucose-Bouillon

Bestandteile:

15,0 g Pepton aus Casein

4,8 g Fleischextrakt

7,5 g D(+)-Glucose

7,5 g Natriumchlorid

0,2 g Natriumazid

ad 1000 ml A.dest.

Herstellung:

Alle Medienbestandteile werden in einem Glaskolben in A. dest. unter Erhitzen im Dampftopf gelöst. Die Lösung wird mit 1 N Natronlauge auf einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,1$ eingestellt. Die Azid-Glucose-Bouillon wird in Mengen von je 10 ml in Reagenzröhrchen abgefüllt und 15 Min. bei 121°C sterilisiert.

3.3.2 Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar

Bestandteile:

20,0 g Pepton aus Casein

5,0 g Hefeextrakt

5,0 g Natriumchlorid

1,0 g Natriumcitrat

0,15 g Natriumazid

0,02 g Kanamycinsulfat

1,0 g Äsculin

0,5 g Ammoniumeisen(III)-citrat

15,0 g Agar-Agar

ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Die Nährbodenbestandteile werden in A. dest. evtl. unter Erhitzen im Dampftopf gelöst. Der pH-Wert wird mit 1N Natronlauge auf pH $7,1 \pm 0,1$ eingestellt. Anschließend wird der Nährboden für 15 Min. bei 121°C autoklaviert und in Petrischalen von etwa 4 mm Schichtdicke gegossen.

3.3.3 Enterokokken-Selektivagar nach Slanetz und Bartley

Bestandteile:

15 g Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)

5 g Pepton aus Sojamehl (papainisch verdaut)

5 g Hefeextrakt

2 g Glukose

4 g di-Kaliumhydrogenphosphat

0,4 g Natriumazid

10 g Agar-Agar

ad 1000 ml A. dest.

Herstellung:

Die Nährbodenbestandteile werden in A. dest. gelöst. Nach 15 Min. Quellen wird das Gemisch im Dampftopf für 20 Min. auf 100°C erhitzt (Der Nährboden darf nicht autoklaviert werden!). Nach Abkühlen auf etwa 50°C werden

dem noch flüssigen Nährboden 10 ml 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung zugegeben. Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH oder 1 N HCl-Lösung auf $7,2 \pm 0,1$ eingestellt. Der Nährboden wird à 15 ml in Petrischalen abgefüllt.

3.4 Nachweis von Fäkalstreptokokken

Vor Beginn der Untersuchung muß die Probe aufgeschüttelt werden.

3.4.1 Kultur in Azid-D-Glucose-Bouillon

In dreimal drei Kulturröhrchen mit je 10 ml Azid-D-Glucose-Bouillon (nach 3.3.1) werden aus der Probenahmegefäße unter sterilen Bedingungen je dreimal 1,0 ml, 0,1 ml und 0,01 ml des zu untersuchenden Wassers einpipettiert. Sodann werden die Röhrchen bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ bis zu $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ bebrütet.

3.4.1.1 Biochemische Untersuchung

Aus den bewachsenen Azid-D-Glucose-Bouillon-Röhrchen wird mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Kanamycin-Äsculin-Agar (nach 3.3.2) oder auf Slanetz-Bartley-Agar (nach 3.3.3) fraktioniert ausgestrichen. Die beimpften Platten werden $24\text{ h} \pm 4\text{ h}$ bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet.

3.4.1.2 Identifizierung

Fäkalstreptokokken wachsen auf Kanamycin-Äsculin-Agar typischerweise als kleine, braune Kolonien mit braunem Hof, auf Slanetz-Bartley-Agar als kleine, rosarote bis braune Kolonien.

3.5 Auswertung

3.5.1 Ermittlung der Fäkalstreptokokken-Konzentration

Als positiv werden alle Azid-Glucose-Röhrchen gewertet, aus denen nach Ausstreichen auf Kanamycin-Äsculin-Agar oder Slanetz-Bartley-Agar typische Kolonien von Fäkalstreptokokken gewachsen sind. Nach den positiven Azid-Glucose-Röhrchen wird analog zu Abschnitt 1.5.2 die Indexziffer gebildet und aus der MPN-Tabelle nach Abschnitt 1.5.3 die wahrscheinlichste Konzentration als MPN abgelesen.

3.6 Angabe der Ergebnisse

Fäkalstreptokokken: n/100 ml (MPN)

4 Salmonellen

4.1 Nachweis von Salmonellen

Vor Beginn der Untersuchung muß die Probe aufgeschüttelt werden.

4.1.1 Filtration

Eine 1000-ml-Probe wird durch ein oder mehrere Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) und, sofern sie grobe Flocken enthält, gegebenenfalls durch aufgelegte sterile Glaswolle filtriert.

4.1.2 Anreicherung

Zur Anreicherung werden die Membranfilter und die Glaswolle mit steriler Pinzette unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml Tetrathionat-Kristallviolett-Bouillon (nach 6.3.1) eingebracht. Dabei müssen Membranfilter und Glaswolle gänzlich durch die Bouillon bedeckt sein. Der Kolben wird mit einer sterilen Kappe bedeckt und 24 h ± 4 h bei 36 °C ± 1 °C bebrütet.

4.1.3 Kultur auf Selektivnährböden

Danach wird aus der Anreicherungsbouillon je eine Öse auf zwei verschiedene Salmonella-Selektivplatten fraktioniert ausgestrichen. Die beimpften Platten werden mindestens 24 h ± 4 h, bei zunächst negativem Befund bis zu 44 h ± 4 h bei 36 °C ± 1 °C bebrütet und auf Salmonella-verdächtige Kolonien untersucht.

Typische Salmonella-Kolonien sind auf Brillantgrün-Phenolrot-Agar (nach 6.3.2) rosa bis rötlich. Auf Salmonella-Shigella-Agar (nach 6.3.3) wachsen Salmonellen als farblos-helle Kolonien mit schwarzem Zentrum, auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (nach 6.3.4) als rote Kolonien ebenfalls mit schwarzem Zentrum und auf Bismut-Sulfit-Agar (nach 6.3.5) als schwarze Kolonien mit Schwärzung des Nährbodens unter der Kolonie und u. U. Spiegelglanz um die Kolonien.

4.1.4 Biochemische Identifizierung

Mindestens fünf verdächtige Kolonien werden biochemisch auf Dreizucker-Eisen-Agar (TSI-Agar, nach 6.3.6) und Lysin-Indol-Motilitäts-Medium (LIM-Medium, nach 6.3.7) untersucht. Der TSI-Agar wird auf der Schrägoberfläche ausgestrichen und in den Bodensatz durchgestochen. Anschließend wird das LIM-Medium mit derselben Impfnadel bis unten durchgestochen. Das LIM-Medium kann mit einer etwa 5 mm dicken Schicht sterilen Paraffinöls beschichtet werden, falls die Reaktion mehr als 24 h beobachtet wird. Die Bebrütung von TSI-Agar und LIM-Medium erfolgt bei 36 °C ± 1 °C in der Regel über 24 h.

Veränderungen der Nährböden lassen sich folgendermaßen erklären:

- TSI-Agar

Bodensatz:

- gelb
- Glucose-Vergärung
- rot oder unverändert
- keine Glucose-Vergärung
- schwarz
- Schwefelwasserstoffbildung
- Blasen oder Risse
- Gasbildung aus Glucose

Schrägoberfläche:

- gelb
- Lactose- und/oder Saccharose-Vergärung
- rot oder unverändert
- weder Lactose- noch Saccharose-Vergärung

- LIM-Medium

- Violett
- Lysin-Decarboxylase positiv
- gelb
- Lysin-Decarboxylase negativ
- homogene Trübung
- Beweglichkeit positiv
- Wachstum nur im Stich
- Unbewegliche Keime
- Bildung eines roten Ringes nach Zugabe von Kovacs-Reagenz
- Indolbindung positiv
- Bildung eines gelben Ringes nach Zugabe von Kovacs-Reagenz
- Indolbindung negativ

Die Salmonellen zeigen folgende Reaktionen (in Klammer die prozentuale Reaktionswahrscheinlichkeit):

- TSI-Agar
- Säurebildung aus Glucose + (100 %)
- Säurebildung aus Lactose - (99 %)
- Säurebildung aus Saccharose - (99 %)
- Schwefelwasserstoffbildung + (95 %)
- Gasbildung + (95 %)
- LIM-Medium
- Lysin-Decarboxylase + (97 %)
- Beweglichkeit + (97 %)
- Indolbildung - (99 %)

5 Viren

5.1 Begriffe

Ein Teil derjenigen Virusarten, die sich in den Verdauungsorganen vermehren (enterale Viren), werden mit den Faeces ausgeschieden und gelangen damit, u. U.

in ihrer Anzahl durch die Abwasserklärung vermindert, in die Gewässer. Zu den enteralen Viren gehören Rotaviren, Reoviren, Enteroviren, enterale Adenoviren, Norwalk-Viren, Hepatitis-A- und -E-Viren und eine Reihe weiterer Viren, die weniger gut charakterisiert sind. Nur eine geringe Anzahl dieser Virusarten können mit Zellkulturen nachgewiesen werden, so daß die Anzahl von Viren in einer Wasserprobe immer höher ist als die Anzahl der mit diesem Verfahren nachgewiesenen Viren.

5.2 Kurzbeschreibung des Nachweises von enteralen Viren in Wasser

Zellkulturen verändern ihr Aussehen in typischer Weise, wenn sie mit bestimmten Viren infiziert werden (Cytopathischer Effekt = CPE). Darauf beruht der Nachweis von Viren. Direkte Animpfung einer Zellkultur mit einer Gewässerprobe führt selten zu einem CPE, da die virale Konzentration dazu nicht ausreicht. Es ist daher erforderlich, die Viren in einer Gewässerprobe aus einem größeren Volumen aufzukonzentrieren, um dann die Zellkulturen mit dem Konzentrat anzupflanzen. Für die Aufkonzentrierung stehen eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung. In dieser Vorschrift wird ein Verfahren in Anlehnung an Walter und Rüdiger angegeben.

5.3 Zellkulturen für den Nachweis von Viren

Der Nachweis sollte mit mindestens zwei verschiedenen Linien von Zellkulturen erfolgen, von denen bekannt ist, daß sie gegen enterale Viren empfindlich sind. Die Zelllinien BGM (Buffalo Green Monkey), aus Nierenzellen, und FL (humane Amnion-Zellen) werden in vielen virologischen Laboratorien für den Nachweis von enteralen Viren mit Erfolg verwendet.

5.4 Zellkulturmedium (z. B. Minimal Essential Medium (MEM) mit 2 % fötalem Kälberserum (FCS)

5.5 Antibiotika-Mix

- 1 ml Antibiotika-Mix enthält:
- 100 000 I.E. Penicillin
- 100 mg Streptomycin
- 12 500 I.E. Moronal
- 25 mg Kanamycinsulfat
- Dosierung in den Proben:
- 20 Microliter Antibiotika-Mix für 10 ml MEM

5.6 Lösungen für die Aufkonzentrierung der Viren aus 10 Liter Wasser

- 10 % $Al_2(SO_4)_3 \times 18 H_2O$ ($Al_2(SO_4)_3 \times 18 H_2O$ verwenden wegen der besseren Löslichkeit)

- 1 M HCL- und 1 M NaOH-Lösungen

- 1 M Lysatpuffer pH 4.7 (Zitratpuffer)
1 Teil 1 M Zitronensäurelösung + 3 Teile 1 M tri-Natriumcitrat-2-hydrat-Lösung mischen.

Mit 1 M Zitronensäurelösung oder 1 M tri-Natriumcitrat-Lösung auf pH 4.7 einstellen.

1 M Zitronensäurelösung:
19,21 g Zitronensäure auf 100ml mit Aqua dest. auffüllen.

1 M Natriumcitrat-Lösung:
88,23 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat auf 300 ml mit Aqua dest. auffüllen.

- Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 7.5
Lösung A: 0,5 M KH_2PO_4
6,8 g auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren.

Lösung B: 0,5 M Na_2HPO_4
35,6 g auf 400 ml mit Aqua dest. auffüllen, autoklavieren.

Für pH 7,5 ca. 16 ml Lösung A und ca. 84 ml Lösung B mischen. Für die Einstellung des genauen pH-Wertes entweder Lösung A (saurer) oder Lösung B (alkalischer) zusetzen.

- 5,6%ige $NaHCO_3$ -Lösung
5,6 g Natriumhydrogencarbonat auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen, steril filtrieren.

- Chloroform

5.7 Laborgeräte und Glas- oder Plastikware für die Aufkonzentrierung

10-Liter-Glasflaschen

Thermometer

Magnetrührer

Magnetstäbe

1-Liter-Meßzylinder

abgeschnittene Pipetten zum Absaugen
große Zentrifugenbecher (z. B. Sorvall, 500 ml)

Zentrifuge und Rotor für große Becher (z. B. Sorvall-GS 3)

Schüttler

Falconröhrchen 50 ml

Rotor für Falconröhrchen (z. B. Sorvall-HS 4)

Erlenmeyer-Kolben (200 ml)

Ultrazentrifuge (z. B. Beckman L8-55-M)

Rotor und Röhrchen (z. B. Beckman, Ti 45, Polycarbonatröhrchen mit Schraubverschluß Nr. 355622, 70 ml)

steriler Zellstoff

Glasstäbe und Pipetten

5.8 Aufbereitung von Oberflächenwasser für die Konzentrierung von Viren aus einer 10-Liter-Probe (nach Rüdiger und Walter)

1. Tag:

Die Proben werden (evtl. in warmem Wasser) auf eine Temperatur von 18 bis 20 °C gebracht (gewünschte Temperatur zur Aufarbeitung).

Unter Rühren Zugabe von 20 ml einer frisch zubereiteten 10%igen $Al_2(SO_4)_3$ -Lösung.

pH-Kontrolle, Korrektur mit HCL oder NaOH unter Rühren auf einen pH-Bereich von 5,4 bis 5,8. Für die pH-Kontrolle ein Aliquot (5–10 ml) aus der 10-Liter-Flasche in Reagenzglas oder Falconröhrchen umfüllen und dort pH messen. Dieses Volumen wird verworfen. Sedimentation: In der 10-Liter-Glasflasche bei + 4 °Celsius über Nacht die $Al(OH)_3$ -Flocken sedimentieren lassen.

2. Tag:

Die Flaschen aus dem Kühlschrank stellen und noch einmal eine Stunde absetzen lassen auf ca. 1 Liter.

Überstand mit der Wasserstrahlpumpe absaugen.

Umfüllen in 1-Liter-Meßzylinder und weitere 4–5 Stunden sedimentieren lassen auf ca. 250 ml $Al(OH)_3$ -Sediment. Überstand absaugen.

In Zentrifugenbecher umfüllen und 30 Min. bei einer Beschleunigung von ca. 1000 x g zentrifugieren (3000 Upm mit dem GS-3-Rotor der Sorvall-Zentrifuge), Überstand abgießen.

Pellet abspülen mit 10 ml Zitratpuffer (ergibt ca. 25–30 ml Volumen).

In dem Zentrifugenbecher belassen und waagrecht auf einem Schüttler 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C schütteln. Dabei sollen sich die $Al(OH)_3$ -Flocken lösen.

3. Tag:

Die Proben werden aus den Probengefäßen gespült und bei ca. 1000 x g 30 Min. zentrifugiert (z. B. in der Sorvall-Zentrifuge, HS-4-Rotor, 3000 Upm). Der wäßrige Überstand wird mit einer Pipette ab-

gezogen = Überstand 1. Das Sediment wird mit 3 ml Phosphatpuffer nach Sørensen resuspendiert, 1 Stunde geschüttelt und erneut zentrifugiert (30 Min. bei 100 x g).

Überstand wie oben abnehmen = Überstand 2. Überstand 1 und Überstand 2 zusammenfügen.

Gesamtüberstand mit 10 Volumen-Prozent Chloroform versetzen und 1 Stunde im Falconröhrchen auf dem Schüttler schütteln; 30 Min. zentrifugieren bei 1000 x g; Überstand abpipettieren in einen 200-ml-Erlenmeyer-Kolben und 1 Stunde schütteln zum restlosen Entfernen des verbliebenen Chloroforms. Im Falconröhrchen einfrieren oder, falls die Ultrazentrifugation gleich angeschlossen wird, in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen füllen.

4. Tag:

Zentrifugieren des Gesamtüberstandes bei Bedingungen, die die vollständige Sedimentation von Enteroviren garantieren (z. B. im Beckman-Rotor Ti 45, bei 34 000 Upm 2 Stunden (halbe Becher) oder 4 Stunden (volle Becher)).

Überstand abgießen und Abtropfen der Becher auf sterilem Zellstoff.

Pellet aufnehmen mit 2 Tropfen 5,6%iger $NaHCO_3$ -Lösung und einigen Tropfen MEM + Antibiotica-Mix (erst wenig und mit dem Glasstab verrühren, dann erst mit der Pipette homogenisieren).

Einstellung des pH nach Sicht (MEM enthält Neutralrot!) mit $NaHCO_3$ -Lösung. Endvolumen auf genau 2 ml auffüllen. Lagerung bei -20 °C möglich.

5.9 Animpfung von Zellkulturen

Das Endvolumen (2 ml entsprechen 10 Liter Oberflächenwasser) oder ein Aliquot mit MEM + Antibiotica-Mix auf 23 ml auffüllen, je 1 ml davon auf 23 Gewebekulturschalen (6 cm Durchmesser) pipettieren, 2 Stunden bei 37 °C inkubieren und dabei wiederholt die Platten schwenken. Schalen mit je 4 ml Erhaltungsmilieu auffüllen (MEM + 2 % FCS + Antibiotica-Mix).

Zellkulturen ab ca. dem 3. Tag nach Animpfung unter dem Mikroskop auf Zeichen einer viralen Infektion kontrollieren. Die Mehrheit solcher Infektionen erscheint in der Regel sehr spät, bis etwa nach 50 Tagen. Die Kulturen müssen daher umgesetzt werden. Die Anzahl der viralen Einheiten ist gleich oder größer als die Anzahl infizierter Schalen.

6 Coliphagen

6.1 Begriffe

Coliphagen sind Bakterienviren, die *E. coli* als Wirtsorganismus befallen. Sie sind im kommunalen Abwasser stets nachweisbar und haben vergleichbare physikalische Eigenschaften wie die humanpathogenen Enteroviren. Im Gegensatz zu den enteralen Viren können Coliphagen in den Wasserproben mit sehr geringem Zeit- und Materialaufwand untersucht werden. Sie scheinen für das Monitoring von Oberflächengewässern hinsichtlich der Kontamination mit enteralen Viren gut geeignet zu sein.

6.2 Kurzbeschreibung des Nachweises von Coliphagen in Wasser

Coliphagen werden auf dem Zellrasen eines *E. coli*-Stammes in einer Nähragarkulturplatte nachgewiesen. Im Gegensatz zum Nachweis von enteralen Viren führt die direkte Animpfung einer spezifischen *E. coli*-Kultur mit der Wasserprobe bereits nach 24stündiger Bebrütung bei 37 °C zu einem sichtbaren Effekt. Aufgrund der infizierten und lytierten Bakterien auf dem *E. coli*-Rasen kommt es zur Bildung der makroskopisch erkennbaren, runden, relativ scharf begrenzten Aufhellungen (Plaques) mit Durchmesser von 0,5–5 mm.

6.3 Nährmedien zum Nachweis von Coliphagen

Verschiedene Stämme von *E. coli* können als Wirtsbakterium für Coliphagen herangezogen werden (Havelaar, 1986). In dieser Methode dient *E. coli* K13 (ATCC 15766) als Wirtsbakterium.

6.3.1 Trypton Hefe Extrakt (THE)-Nährlösung

THE-Nährlösung wird für die Anzucht der frischen *E. coli*-K13-Kultur eingesetzt.

Bestandteile:

10 g Trypton
8 g NaCl
1 g Hefeextrakt
1 g Glucose
0,22 g CaCl₂
ad 1000 ml entionisiertes Wasser

Herstellung:

Trypton, Hefeextrakt, Glucose, NaCl und CaCl₂ werden in einem Glaskolben in entionisiertem Wasser unter Erhitzen

gelöst und auf einen pH-Wert von $6,8 \pm 0,1$ eingestellt. Die Lösung wird 15 Min. bei 121 °C autoklaviert.

6.3.2 Trypton-Hefe-Extrakt (THE)-Weichagar

THE-Weichagar wird für die Kultivierung eines Zellrasens von mit der Wasserprobe inokulierten *E. coli* K13 auf den Nähragarkulturplatten eingesetzt.

Bestandteile:

10 g Trypton
8 g NaCl
1 g Hefeextrakt
1 g Glucose
0,22 g CaCl₂
8 g Agar-Agar
ad 1000 ml entionisiertes Wasser

Herstellung: wie bei 6.3.1.

6.3.3 Doppeltkonzentrierter Trypton-Hefe-Extrakt (THE)-Weichagar

Doppeltkonzentrierter THE-Weichagar wird bei der Kultivierung der *E. coli* K13-Rasen zum Ansatz der großen Probevolumina von 10–100 ml verwendet.

Bestandteile:

20 g Trypton
16 g NaCl
2 g Hefeextrakt
2 g Glucose
0,44 g CaCl₂
32 g Agar-Agar

(Die vierfache Menge Agar (32 g) ist notwendig, damit das Gemisch aus konzentriertem Agar und Wasserprobe die erforderliche Festigkeit erreicht)
ad 1000 ml entionisiertes Wasser

Herstellung: wie bei 3.1.

6.4 Anzucht von *E. coli* K 13

6.4.1 *E. coli*-K-13-Starterkultur

Die Stammkultur von *E. coli* K13 wird auf THE-Weichagarplatten ausgestrichen und bei 36 ± 1 °C über Nacht bebrütet. Die Starterkulturplatten können zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

6.4.2 *E. coli*-K13-Kultursuspension

Zur Inokulation mit der Wasserprobe wird *E. coli* K 13 zuerst in THE-Nährlösung frisch kultiviert. Aus einer Starterkulturplatte werden *E. coli* K13 in 3 ml THE-Nährlösung mit Hilfe einer Pipette abgeschwemmt. Diese Suspension

wird mit 50 ml THE-Nährlösung (ausreichend für 100 Tests) vermischt und in einem Schüttelwasserbad bei 120 Upm und einer Temperatur von 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (1 cm Schichtdicke, Wellenlänge: 578 nm) von 0,6–0,8 4–6 h inkubiert.

6.5 Nachweis und Quantifizierung von Coliphagen

6.5.1 Nachweis in Probevolumen bis 1 ml

- Die Proben werden in die sterilen Reagenzröhrchen pipetiert.
- 0,5 ml der frisch hergestellten *E. coli*-K13-Suspension wird der Probe zugegeben.
- Diese wird anschließend mit 10 ml THE-Weichagar (auf 55 °C erwärmt) versetzt und in die Nähragarkulturplatten (Durchmesser 9 cm) gegossen.
- Nach 24stündiger Inkubation der Kulturen bei 36 ± 1 °C werden die Plaques (helle Löcher im trüben *E. coli*-K13-Rasen) gezählt und daraus die Konzentration des Coliphagen als pfu (plaque forming unit) pro ml Probe berechnet.

6.5.2 Nachweis in Probevolumen von 10 bis 100 ml

Diese Methode wird bei Untersuchungen der großen Probevolumina von 10 bis 100 ml eingesetzt, wenn in 1 ml der zu untersuchenden Probe kein Nachweis von Bakteriophagen zu erwarten ist:

- 100 (10) ml Probe werden in einem 300 (100) ml sterilen Erlenmeyerkolben im Wasserbad ca. 10 Min. bei 37 °C temperiert.
- 10 (1) ml frisch kultivierte *E. coli*-K13-Suspension werden der Probe zugegeben.
- Die Probe (insgesamt 110 (11) ml) wird mit 110 (11) ml doppeltkonzentriertem THE-Nähragar, welcher zuvor bei 55 °C temperiert war, vermischt, so daß die Endkonzentration des Gesamtvolumens (220 bzw. 22 ml) der Konzentration des THE-Einfach-Nährmediums entspricht.
- Das Gesamtvolumen von 220 (22) ml wird dann auf die leere(n) Kulturplatte(n) (Durchmesser 9 cm) in Volumina von 20 bis 25 ml verteilt.
- Nach 24stündiger Inkubation von Kulturen bei 36 ± 1 °C werden die Aufhellungen auf dem *E. coli*-Rasen der Platten gezählt, addiert und als pfu/100 (10) ml wiedergegeben.

Berichte

Chemikalien

Trypticase Peptone (BBL Nr. 11921)

Hefeextrakt (Merck Nr. 3753)

D(+)-Glucose (Merck Nr. 8337)

Natriumchlorid (Merck Nr. 6404)

Calciumchlorid (Merck Nr. 2388)

Agar-Agar (Merck Nr. 1615)

Chloroform (Merck Nr. 2442)

Ad-hoc-Arbeitsgruppe »Mikrobiologie« der Badewasserkommission des Umweltbundesamtes:

Prof. Dr. M. Exner, Bonn; Prof. Dr. K.-O. Gundermann (Dr. G. Havemeister), Kiel; Dr. J. M. López-Pila, Berlin; Prof. Dr. R. Schubert, Frankfurt/M.; Dr. C. Sacré, Stuttgart; Prof. Dr. D. Schoenen, Bonn; Dr. E. Schulze, Bad Elster.

Unterarbeitsgruppe »Mikrobiologische Untersuchungsmethoden für Badegewässer« der Bund-Länder-Arbeitsgruppe Badegewässer:

Dr. Christa Ecker; Dr. K. Gunkel, Berlin; Dr. G. Havemeister, Kiel; Dr. B. Lustig, Stuttgart; Dr. R. Motz, Berlin; Dr. W. Mühlenberg, Hannover, G. Pansch, Schwerin; Dr. K. Roch, Hamburg; Dr. P. Schindler, Oberschleißheim; Dr. H. D. Schoop, Kassel; Prof. Dr. R. Schubert, Frankfurt/M.; Dr. E. Schulze, Bad Elster; Dr. L. Täumer, Zwickau; Dr. H. G. Tuschewitzki, Gelsenkirchen.