

Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001

Nachtrag zur Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001

Nachweisverfahren für *E. coli*/coliforme Bakterien (Colilert®-18/Quanti-Tray®; alternatives Verfahren)

Um sicherzustellen, dass das o.g. Verfahren [1] so eingesetzt wird, wie es als mindestens gleichwertig zum Referenzverfahren vom UBA anerkannt wurde [2,3], wird nachfolgende Verfahrensbeschreibung bekannt gegeben:

Verfahrensbeschreibung von Colilert®-18/Quanti-Tray®

Verwendungszweck

Colilert®-18/Quanti-Tray® wird zur Bestimmung und Bestätigung von coliformen Bakterien und *E. coli* aus Wasserproben eingesetzt. Colilert®-18 basiert auf der patentierten „Defined Substrate Technology (DST)“ der Firma IDEXX. Die Reaktionen beruhen auf der Aktivität der Enzyme β -Glucuronidase (*E. coli*) und β -Galactosidase (coliforme Bakterien). Bei Metabolisierung des in Colilert®-18 enthaltenen Nährstoffindikators ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) durch coliforme Bakterien färbt sich die Wasserprobe gelb. Bei Metabolisierung des zweiten in Colilert®-18 enthaltenen Nährstoffindikators MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid) tritt eine blaue Fluoreszenz auf. Colilert®-18 weist *E. coli* und coliforme Bakterien mit einer Empfindlichkeit von jeweils 1 KBE/100 ml (KBE = Koloniebildende Einheiten) nach.

Verfahrensdurchführung

Der Inhalt einer Einzelpackung von Colilert®-18 wird in ein steriles Gefäß mit einer 100 ml-Wasserprobe (Zimmertemperatur) gegeben. Hierzu wird die Packung mit der Sollbruchstelle nach unten über dem geöffneten Probengefäß aufgebrochen und der Inhalt kontaminationsfrei in die Wasserprobe überführt. Anschließend wird das Gefäß verschlossen und geschüttelt. Der Ansatz ist dann in ein Quanti-Tray® oder Quanti-Tray®/2000 zu überführen und mit dem IDEXX „Quanti-Tray® Sealer“ zu versiegeln. Das versiegelte Tray wird (19±1) Stunden bei 36±1°C in einem Brutschrank inkubiert. Bei der Auswertung sollten Vertiefungen, die gegenüber der Vergleichslösung eine grenzwertige Gelbfärbung aufweisen, weitere 2 Stunden inkubiert werden. Die Colilert®-18/Quanti-Tray®-Ergebnisse sind jedoch spätestens nach 22 Stunden abzulesen (■ Tabelle 1).

Berechnung/Angabe der Ergebnisse

Die Anzahl der positiven Reaktionen (gelb oder gelb und fluoreszierend) wird ermittelt und die wahrscheinlichste Bakterienzahl (most probable number, MPN) pro 100ml Wasserprobe aus der entsprechenden MPN-Tabelle abgelesen. Das Ergebnis wird als „n MPN/100ml“ angegeben, wobei „n“ die statistisch wahrscheinlichste Zahl von Zielorganismen in der Probe ist.

Weitere Hinweise zum Verfahren (informativ)

- Bei der Zugabe von Colilert®-18 zur Probe kann eine leichte Verfärbung beobachtet werden.
- Falls es bei Arbeiten mit Quanti-Tray® durch übermäßige Schaumbildung zu Problemen kommt, können IDEXX Antifoam-Lösung oder 120-ml-Gefäße mit Antifoam eingesetzt werden.
- Colilert®-18 kann in jedem Mehrrohrchen-Test eingesetzt werden. Zur

Tabelle 1

Interpretation der Ergebnisse

Aussehen	Ergebnis
Schwächer gelb als Vergleichslösung	Negativ für coliforme Bakterien und <i>E. coli</i>
Gelbfärbung wie Vergleichslösung oder intensiver	Positiv für coliforme Bakterien
Blaue Fluoreszenz und Gelbfärbung wie Vergleichslösung oder intensiver	Positiv für <i>E. coli</i>

Ermittlung der wahrscheinlichsten Bakterienzahl sind die MPN-Tabellen für Standardmethoden zur Untersuchung von Wasser und Abwasser zu verwenden.

- Falls eine Verdünnung erforderlich ist, darf hierzu nur steriles Leitungswasser verwendet werden. Keine Zusätze verwenden!

Nachweis von *C. perfringens* (nach TrinkwV 2001)

In der im Bundesgesundheitsblatt Nr. 12/2002 veröffentlichten UBA-Liste nach § 15 Abs. 1 TrinkwV ist angegeben (Fußnote c zum Parameter *C. perfringens*), dass nach Vorliegen der Norm ISO CD 6461-2 [4], voraussichtlich 2003, nach diesem Verfahren gearbeitet werden kann.

Aufgrund von Problemen bei der Normung ist derzeit nicht absehbar, wann diese Norm fertig gestellt wird. Bis zur Klärung dieser Sachlage ist das entsprechende Verfahren zum Nachweis von *C. perfringens* nach TrinkwV 2001, Anlage 5 (Verfahrenstext, m-CP-Agar) einzusetzen.

Weitere Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren

Risikoeinschätzung nach § 9 Abs. 5 TrinkwV 2001 beim Nachweis von coliformen Bakterien nach Colilert®-18/Quanti-Tray®

Es wird darauf hingewiesen, dass nach diesem Verfahren glucuronidase-negative *E. coli* nicht als *E. coli*, sondern als coliforme Bakterien nachgewiesen werden können. Zu glucuronidase-negativen *E. coli* zählen u. a. auch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) unterschiedlicher Serotypen. Allerdings ist bekannt, dass EHEC in weitaus geringeren Konzentrationen als „normale“ *E. coli* in der Umwelt vorkommen (meist weniger als 1:100 im Abwasser). Aufgrund dieser Tatsache ist es bei der Routineüberwachung wenig wahrscheinlich, dass bei alleinigem Nachweis von coliformen Bakterien ein glucuronidase-negativer *E. coli* unter den Coliformen ist. Zur Risikoeinschätzung im Sinne des § 9 Abs. 5 TrinkwV 2001 („30-Tageregel“) ist trotz-

dem zu beachten, dass u. U. auch EHEC unter den nachgewiesenen coliformen Bakterien sein können. Im Sinne der Risikobewertung sollte deshalb der Amtsarzt bei alleinigem Nachweis von coliformen Bakterien und Vorkommnissen im Versorgungsgebiet (z.B. gehäufte Durchfallerkrankungen) diesen coliformen Befund auf *E. coli*, ggf. auch EHEC, überprüfen lassen.

Nachweis von *E. coli*/coliformen Bakterien nach DIN EN ISO 9308-1

Nach DIN EN ISO 9308-1 [5] ist eine Bebrütungszeit von (21 ± 3) Stunden festgelegt (Norm S.7,Pkt.8.3). Aufgrund des sehr sensitiven Nährmediums ist es möglich, dass nach längerem Bebrüten (nach Anmerkung 1 der Norm bis zu 48 Stunden) falsch-positive Befunde auftreten (z.B. grampositive Kokken, aerobe Sporenbildner). Die Anmerkung 1 ist jedoch nicht Bestandteil des normativen Verfahrens, sondern gibt nur eine zusätzliche Information. Das bedeutet, dass nur die positiven Befunde, die nach einer Bebrütungszeit von max. 24 Stunden auftreten, als Grenzwertüberschreitung zu werten sind.

In DIN EN ISO 9308-1 ist auf Seite 13 unter Anhang B, Punkt 5.3 als Oxidase-Reagens fälschlicherweise Tetramethyl-p-phenylendiamin angegeben. Es sollte Tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid verwendet werden. Der Einsatz kommerzieller Oxidase-Testsysteme ist alternativ möglich. Die Wirksamkeit ist durch Vergleichsuntersuchungen mit Referenzstämmen nachzuweisen und zu dokumentieren.

Literatur

1. Colilert®-18/Quanti-Tray®, IDEXX Laboratories, Inc., USA
2. Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001. BGBl Teil 1, Nr. 24, S. 959-980
3. Mikrobiologische Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001, Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001, Mitteilung des Umweltbundesamtes, Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 12 (2002), S. 1018
4. ISO CD 6461-2 (2002) Water quality-Detection and enumeration of *Clostridium perfringens*-Part 2: Method by membrane filtration.
5. DIN EN ISO 9308-1 (2001) Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 1: Membranfiltrationsverfahren. Beuth-Verlag, Berlin