

5 Nachweis von *Escherichia coli* in Wässern

Der Nachweis von *Escherichia coli* hat große praktische Bedeutung bei der Untersuchung von Trinkwasser. Denn bei einem Vorkommen über einer niedrig angesetzten Schwellenkonzentration („keine *E. coli*-Zelle in 100 ml Wasser“) wird eine Verunreinigung des Wassers mit Fäkalien angenommen, die dann auch die Gefahr einer Kontamination mit pathogenen Bakterien mit sich brächte. Trinkwässer werden deswegen regelmäßig auf die Anwesenheit von *E. coli* (und coliformen Bakterien) als Indikator untersucht.

Escherichia coli ist als Indikator-Organismus deswegen geeignet, weil im Darminhalt mit einem Anteil von 1-2% regelmäßig vorkommend, gegen widrige Milieubedingungen resistenter und langlebiger als Darm-Pathogene (z.B. Salmonellen). *E. coli* kann zudem relativ leicht erkannt werden.

In Oberflächenwässern, auch dann wenn sie vollkommen sauber erscheinen, sind stets *Escherichia coli* in größeren Konzentrationen als für Trinkwasser zulässig (kein *E. coli* in 100 ml) enthalten. *E.-coli*-frei sind allenfalls Quellwässer unmittelbar am Austritt.

In der Praxis muß sichergestellt sein, daß als Trinkwasser vorgesehenes oder verwendetes Wasser in 100 ml keine *Escherichia coli*-Zelle enthält. So geringe Zellkonzentrationen, wie 1 Zelle/100 ml, können nur durch Vorschaltung einer Anreicherungskultur mit möglichst selektiver Vermehrung der gesuchten Bakterien oder durch die Erfassung des Gesamt-Zellbestandes in der 100-ml-Probe nachgewiesen werden.

Im erstgenannten Fall wird eine Kultur von 100 ml Probenwasser mit 100 ml einer geeigneten doppelt-konzentrierten Nährlösung angelegt; aus dieser wird dann nach eintägiger Bebrütung eine Abimpfung (mit Öse) auf einen Nährboden vorgenommen, der die gesuchten Bakterien unter anderen erkennen läßt. Die Erfassung des Gesamtbestandes der Zielorganismen ist durch Filtration der Wasserprobe und Sammeln der Bakterien auf einem Membranfilter möglich, das auf den Nährboden gelegt wird. Bakterienkolonien erscheinen dann auf dem Filter.

Bei beiden Methoden wird die sog. Endo-Bouillon bzw. der Endo-Nährboden (s. Versuch 1.2) verwendet, der in gewissem Ausmaß selektiv ist und darüberhinaus Lactose-verwertende Bakterien, die nicht allzu häufig sind, zu denen aber auch *E. coli* gehört, erkennen läßt. Endo-Nährmedium enthält einen (wenig gefärbten) Fuchsin-Sulfit-Komplex, der Gram-positive Bakterien hemmt. Durch Aldehyde, die bei der Vergärung der Lactose entstehen, wird Fuchsin als intensiv roter Farbstoff freigesetzt. Kolonien Lactose-negativer Bakterien wachsen farblos, die sog. coliformer Lactose-positiver Bakterien (wie Enterobacter, Klebsiella) rötlich bis rot, *E. coli*-Kolonien wegen intensiver Lactose-Vergärung rot mit einem beständigen grünlichen Metallglanz von ausgeschiedenem Fuchsin. Grüner Metallglanz einer Kolonie begründet in der Praxis zunächst nur den Verdacht auf *E. coli*; die endgültige Identifizierung erfolgt durch Beimpfen einer „Bunten Reihe“ oder, heute, durch Verwendung eines kommerziell angebotenen, entsprechenden Identifizierungssystems.

Die Bunte Reihe ist eine Reihe von Flüssigkulturen zur Ermittlung physiologischer Eigenschaften, z.B. der Bildung von Säuren aus verschiedenen Zuckern. Positiver Ausfall bewirkt eine pH-Verschiebung und den Farbumschlag eines zugeetzten Indikators.

Hier wird die Membranfiltration zur Sammlung der Bakterien aus der Wasserprobe und Endo-Agar als eingeschränkt selektiv wirkender Indikator-Nährboden verwendet. *E. coli*-verdächtige Kolonien werden mit Hilfe des Enterotube II-Systems (Becton-Dickinson) identifiziert. Es handelt sich dabei um eine miniaturisierte „Bunte Reihe“.

5.1 Materialien (s.a. Versuch 1.2)

Probenmaterial: Wasser aus gefaßter Quelle, unmittelbar am Austritt; optisch klare, saubere Bach- oder Teichwässer; alle entnommen bzw. abgefüllt unter möglicher Vermeidung einer nachträglichen Verunreinigung in sterile Flaschen.

Arbeitsmaterialien:

Membranfilter-Endo-Bouillon (Merck), verfestigt mit Agar, in Petrischalen 5 cm ø.

Verdünnungsmedium: 100 ml 0,1% Pepton in Flasche

steriles Wasser, ca. 400 ml zum Spülen

Membranfiltrationsgerät aus Edelstahl, sterile Pipetten 10, 5, 2 ml

ferner:

sterile Membranfilter (0,2 µm Porenweite)

Ethanol 80%

Teststreifen Bactident Oxidase, Merck 113300

Enterotube II, Becton-Dickinson

5.2 Anlegen der Membranfilter-Kulturen

Aufbau des Filtrationsgerätes s. Abb. 5-1.

Membranfiltrationsgeräte müssen nach Vorschrift des Herstellers behandelt werden. Das nachstehend beschriebene Verfahren gilt nicht für alle Geräte!

→ Das Membranfiltrationsgerät ist vor Arbeitsbeginn im Autoklaven sterilisiert worden.

Nach bzw. vor jeder Filtration einer Wasserprobe wird der Trichter und die Siebplatte, auf den das Membranfilter zu liegen kommt, durch Befeuchten mit Ethanol und Abbrennen / Abflammen neu sterilisiert.

Abfolge der Handgriffe:

→ Unterteil 2 in Gummistopfen auf Saugflasche setzen, an Wasserstrahl- oder andere Pumpe hängen; Siebplatte und Ring (3 - 4; 5) auflegen;

→ Hahn öffnen, Hahn zur laufenden Pumpe öffnen;

→ Siebplatte mit Ethanol aus Spritzflasche befeuchten, mit fächernder Flamme abflammen; Hahn schließen;

→ Trichter-Aufsatz 1.3 an der Unterseite kurz abflammen, aufsetzen;

→ Aufsatz innen mit Ethanol befeuchten, abbrennen lassen;

→ ca. 50 ml steriles Wasser über Trichterwand laufen lassen, absaugen (Hahn zur Pumpe öffnen);

→ sterilen Membranfilter mit Ethanol-sterilisierter Pinzette auf die Siebplatte legen; dazu Aufsatz nur wenig anheben und schräg halten;

→ Hahn zur Pumpe schließen;

→ bei großem Probenvolumen - 100 und 10 ml - diese direkt in den Trichter-Aufsatz geben;

Hahn öffnen und absaugen;

(Trichter hat innen eine Markierung bei 100 ml; 10 ml mit Messpipette abmessen);

→ bei kleinem Probenvolumen zunächst etwa 10 ml Verdünnungsmedium in den Aufsatz geben, dann die Probe einpipettieren, absaugen;

→ nach dem Absaugen die Innenwände mit ca. 5 ml Verdünnungsmedium spülen, absaugen

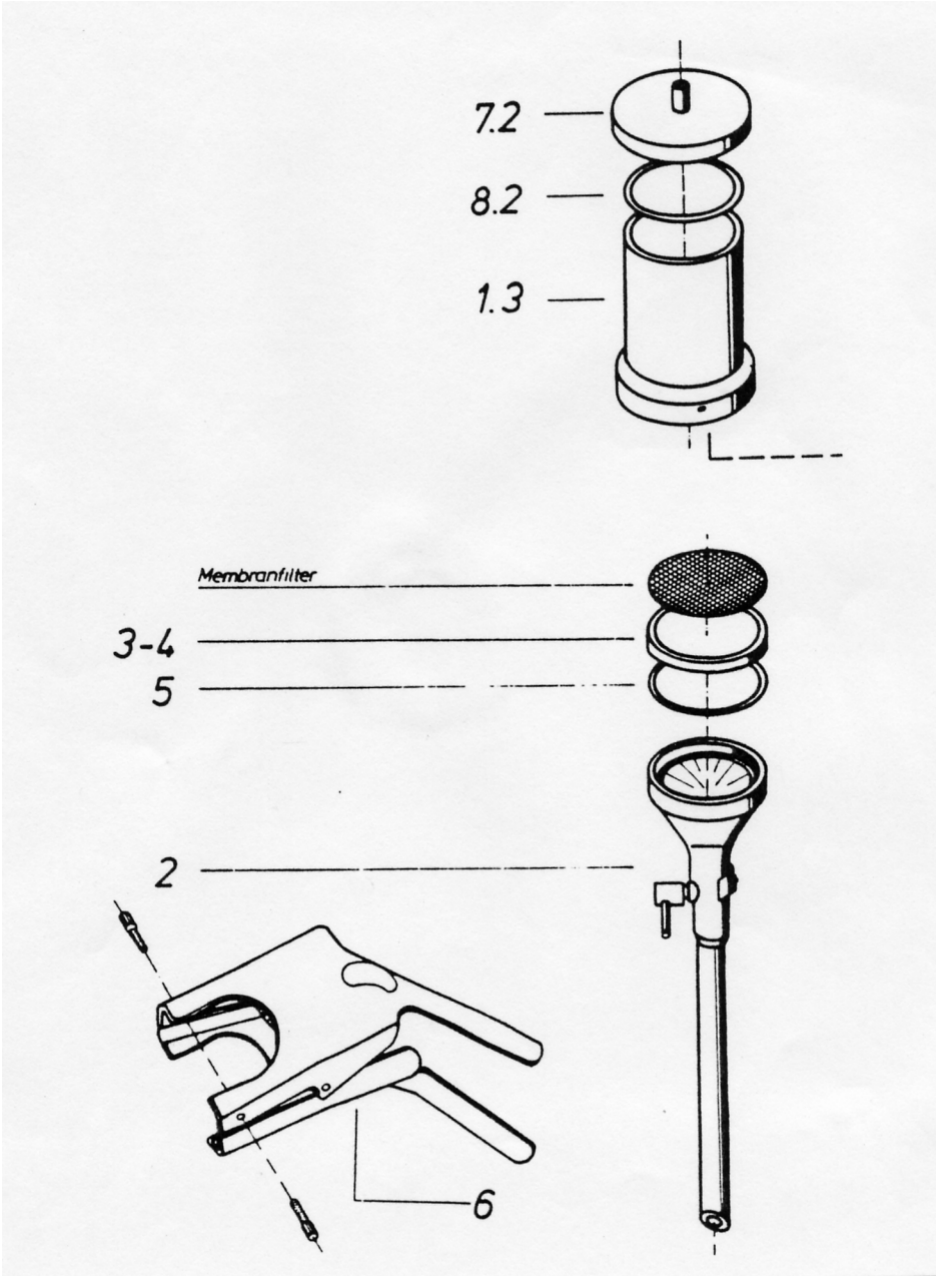
→ Hahn schließen, Saugflasche belüften,

→ Membranfilter mit Ethanol-sterilisierter Pinzette abnehmen, blasenfrei auf Endo-Nährboden legen.

⇒ Von den verfügbaren Wasserproben werden Kulturen von 100 ml (Quellwasser, Leitungswasser), 10 ml und 1 ml (Oberflächenwässer) angelegt.

→ Kulturen mit aufgelegten Membranfiltern bei 37°C, 24 - 44 Std aufrecht (Deckel nach oben) bebrüten.

Abb. 5-1 Filtrationsgerät Schleicher & Schuell aus Edelstahl



→ Nach 24 stündiger Bebrütung bei 37 °C dunkelrote Kolonien mit grünlichem Metallglanz zählen; Koloniezahlen unter Berücksichtigung des filtrierten Volumens auf 100 ml Probenwassers beziehen.

→ Zur Identifizierung wird eine typische, möglichst etwas größere Kolonie ausgewählt.

Von dieser Kolonie müssen parallel

- der Ausfall der Gram-Färbung (Gram-negativ),
- der Ausfall eines Oxidase-Tests (Cytochrom c-, Oxidase-negativ) und
- die Merkmale der Bunten Reihe (Enterotube II-System) festgestellt werden.

5.3 Identifizierung mit Enterotube II-System

Enterotube II ist ein Testsystem zur Identifizierung von Enterobakterien (Gram-negative, Oxidase-negative Stämme). Die in den Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien erlauben den Nachweis von 15 biochemischen Eigenschaften des Probanden-Stammes entsprechend der klassischen „Bunten Reihe“. Die Auswertung erfolgt nach 24stündiger Bebrütung bei 35 - 37°C.

Der Test auf Oxidase (Cytochrom c) wird mit Teststäbchen (z.B. Bactident Oxidase, Merck 113300 o. a.) vorgenommen.

Beimpfen von Enterotube II:

→ Schraubkappen entfernen. Unter der weißen Kappe befindet sich die Spitze der Impfnadel. Ohne auszuglühen Material einer Einzelkolonie aufnehmen.

→ Impfnadel wird unter leichtem Drehen durch alle Kammern des Teströhrchens gezogen. Sie wird dann wieder so weit eingeschoben, daß die Einkerbung bei der Eingangsöffnung liegt; die Spitze befindet sich dann in der Citrat-Kammer.

→ Impfnadel an der Einkerbung abbrechen.

→ Mit dem abgebrochenen Ende der Impfnadel Plastikfolie der letzten 8 Kammern (Adonit bis Citrat) durchstoßen.

→ Beide Schraubkappen aufschrauben. Stehend (Glucose-Kammer nach oben) oder liegend (Plastikfolie nach unten) bebrüten.

→ Nach der Bebrütung werden durch Vergleich mit Standardbild oder unbeimpftem Enterotube II die positiven Reaktionen auf dem Auswertungsschema notiert.

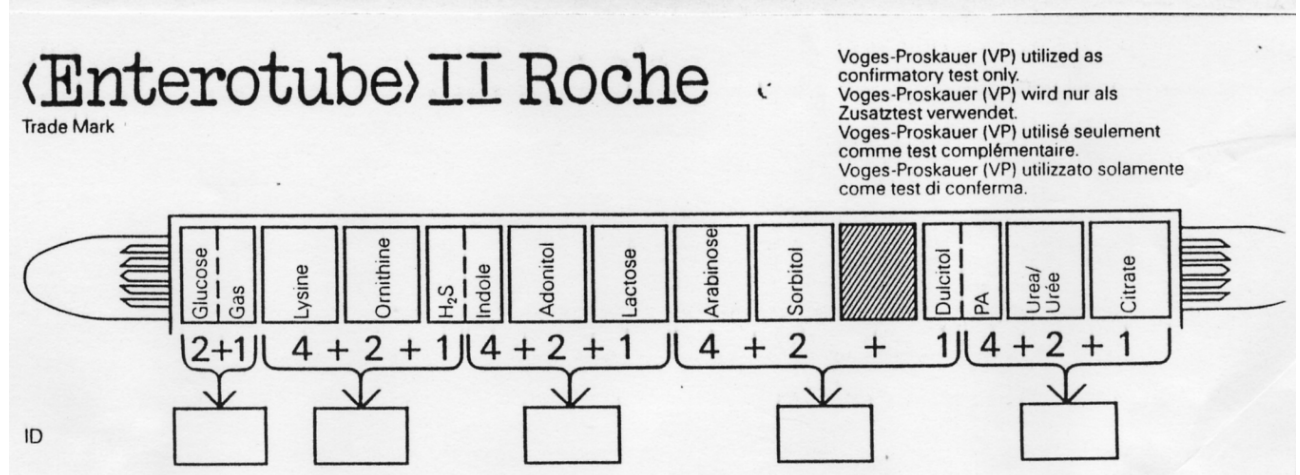
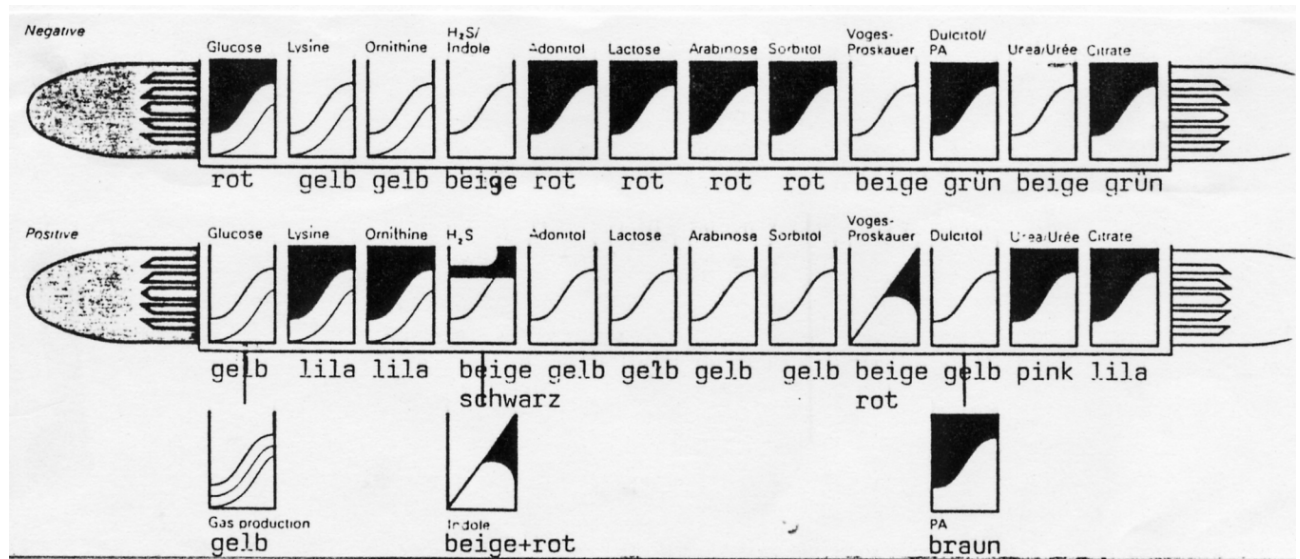
Es ergibt sich eine Code-Zahl, zu der sich die Bakterienart (ggf. mit Nennung atypischer Merkmale des Probanden-Stammes) im Identifizierungsheft findet.

→ Indol-Test: Enterotube II wird mit flacher Seite nach oben gelegt; 3 - 4 Tropfen Kovacs Reagenz werden mit Spritze und Kanüle in die H₂S/Indol-Kammer unter die Folie gespritzt.

Positiv: Rotfärbung des Reagenz' innerhalb von Sekunden.

→ Voges-Proskauer-Test (falls mit einbezogen): in die VP-Kammer werden durch das seitliche Luftloch 3 Tropfen α-Naphthol und 2 Tropfen KOH gespritzt. Positiv: Rotfärbung des Reagenz' innerhalb von Sekunden.

Auswertung der Enterotube II-Resultate



Die der Zahl zuzuordnende Bakterienart ist einem Codebuch des Herstellers zu entnehmen.

- **Glucose**: Wachstum mit Glucose, dabei Säurebildung (Umschlag der Indikatorfarbe rot → gelb) und Gasbildung (CO₂, Abheben der Paraffinschicht vom Agar)
- **Lysin**: Decarboxylierung von Lysin, pH-Anstieg, Indikatorumschlag gelb → violett
- **Ornithin**: Decarboxylierung von Ornithin, pH-Anstieg, Indikatorumschlag gelb → violett
- **H₂S**: Bildung aus Na-thiosulfat, wahrscheinlich Bildung von schwarzem Eisensulfid
- **Indol**: Bildung aus Tryptophan, Nachweis mit Kovacs-Reagenz, Rotfärbung, s.o.
- **Adonitol, Lactose, Arabinose; Sorbitol**: Wachstum und Säurebildung, Indikatorumschlag rot → gelb
- **Voges-Proskauer**: Bildung von Acetoin (CH₃-CH(OH)-CO-CH₃) aus 2 Pyruvat, Nachweis mit α-Naphthol und KOH, s.o.
- **Dulcitol**: Wachstum und Säurebildung, Indikatorumschlag grün → gelb
- **PA**: Desaminierung von Phenylalanin
- **Urea**: Harnstoffspaltung unter Alkalisierung, Indikatorumschlag gelbbraun → pink
- **Citrat**: Verwertung, Indikatorumschlag grün → violett

Die IMViC-Reaktionen zur Unterscheidung von *Escherichia coli* von dem sonst ähnlichen *Enterobacter aerogenes*

	Indol-Bildung	Methylrot-Probe	Voges-Proskauer	Citrat
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+