

**Mikrobiologie-Praktikum**  
**„Mikrobiologische**  
**Wasseruntersuchungen“**

**Versuche Nr. 13 – Nr. 18**

# Versuchsübersicht

## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

# Gesetzliche Regelungen

## Anforderungen an Trinkwasser und Badegewässer

- **Trinkwasser (Wasser für den menschlichen Gebrauch)**  
**(Praktikum: Versuche Nr. 13 – 16, Nr. 18)**

### **Auf europäischer Ebene:**

Europäische Richtlinie über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (EG-Trinkwasserrichtlinie) vom 03. November 1998

### **Umsetzung der EG-Trinkwasserrichtlinie in nationales Recht:**

Trinkwasserverordnung 2001, in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. November 2015 (Dritte Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung)

- **Badegewässer (Praktikum: Versuch Nr. 17)**

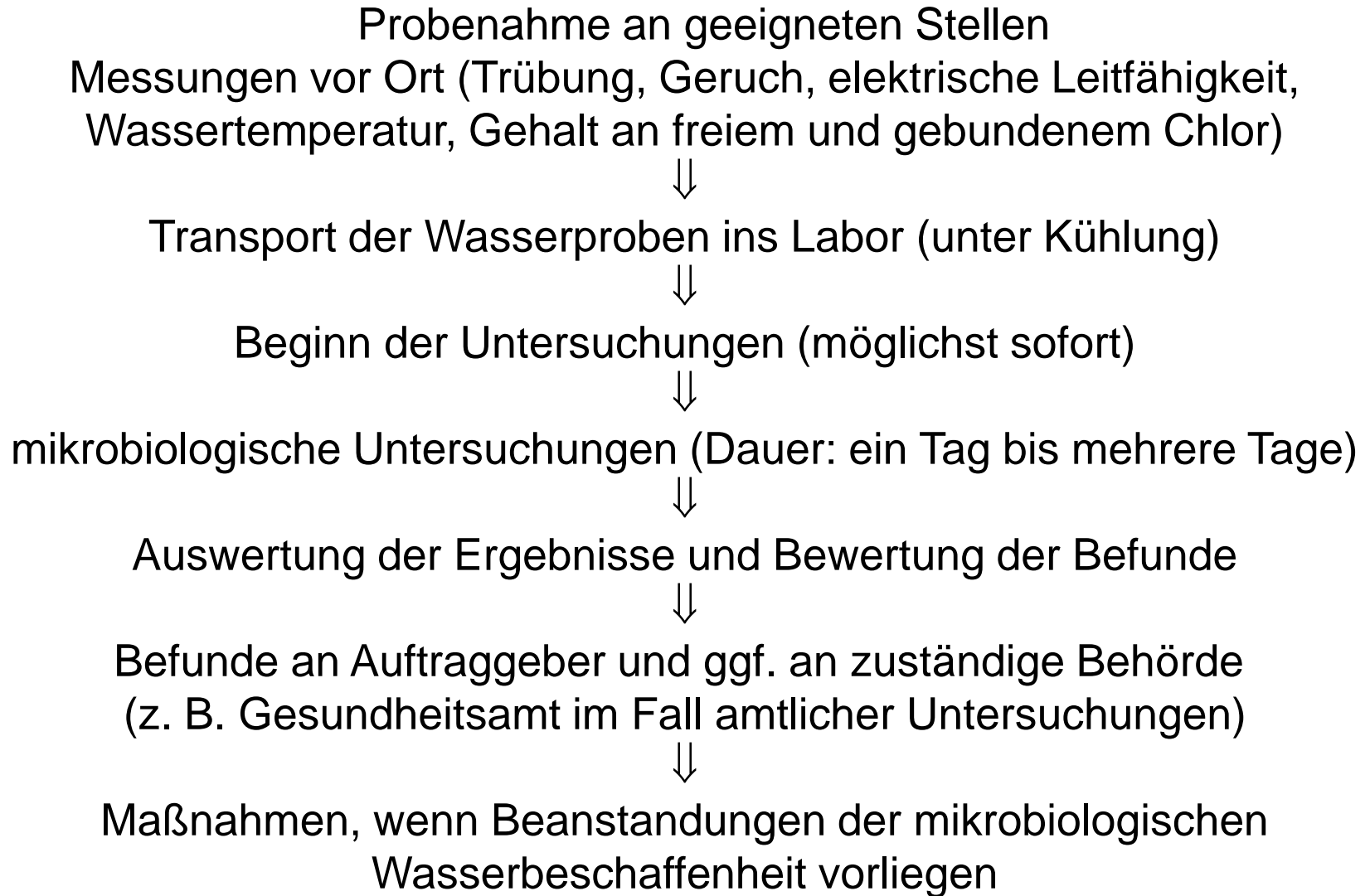
### **Auf europäischer Ebene:**

Richtlinie über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung (Badegewässerrichtlinie) vom 15. Februar 2006

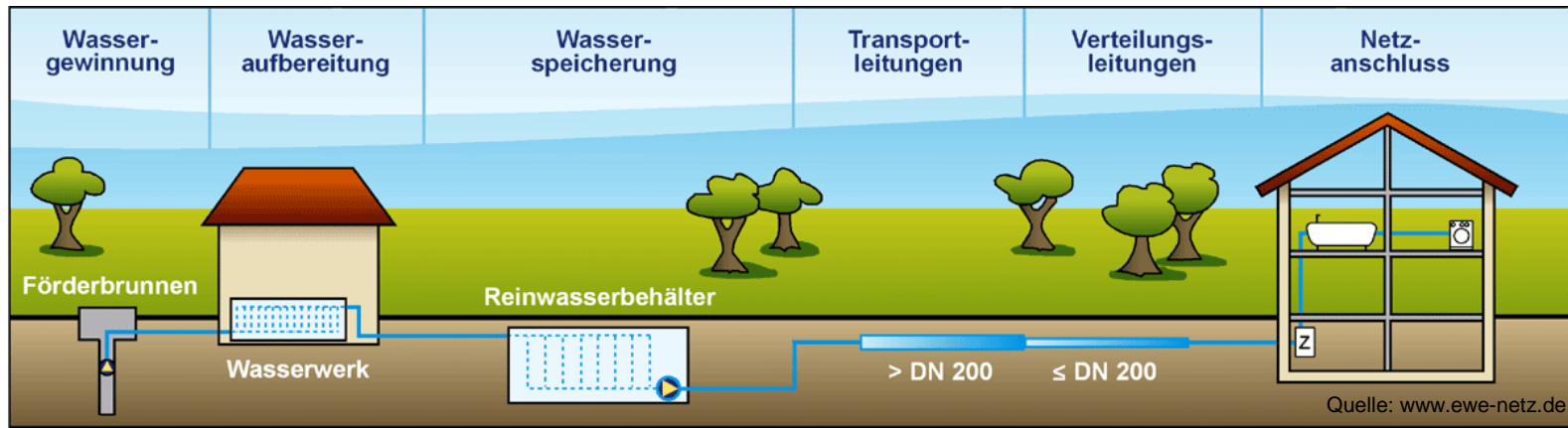
### **Auf Länderebene, z. B. NRW:**

Verordnung über die Qualität und die Bewirtschaftung der Badegewässer (Badegewässerverordnung) vom 11. Dezember 2007

# Mikrobiologische Wasseruntersuchungen in der Praxis



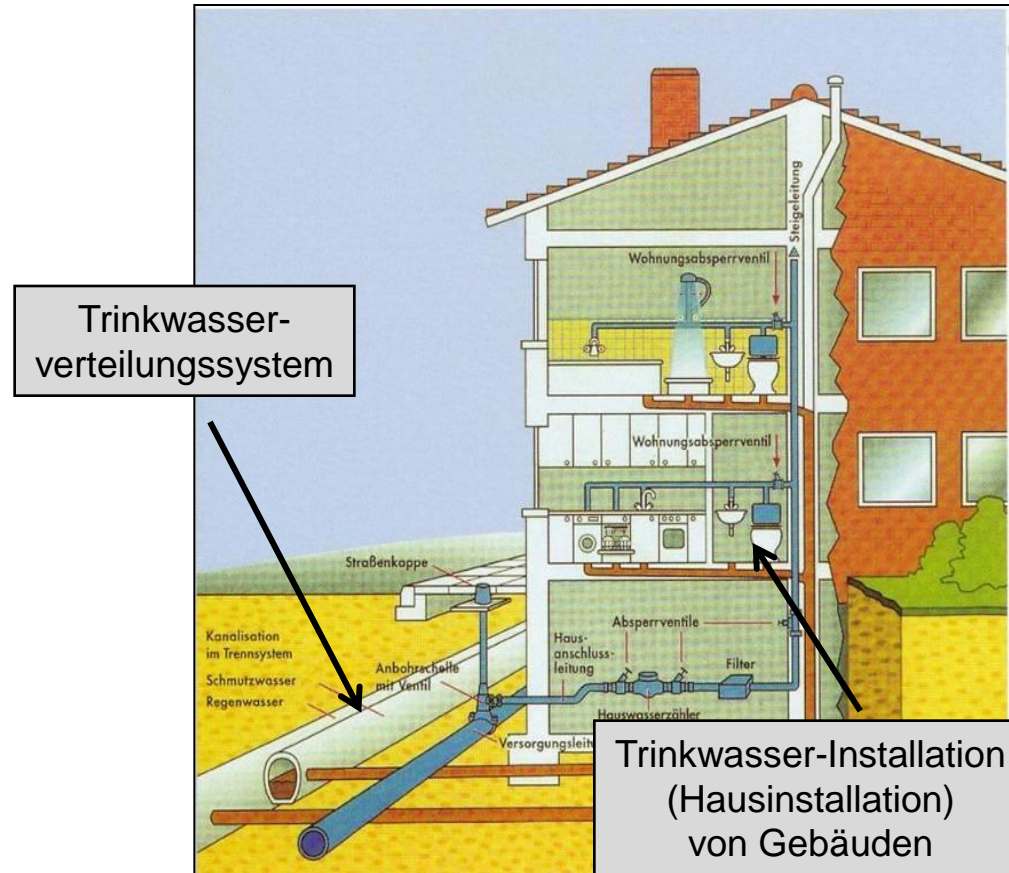
# Probenahmestellen in der Trinkwasserverteilung



Unterschiedlicher Zweck von Probenahmen:

Feststellung der

- Wasserbeschaffenheit im Verteilungsnetz,
- Wasserbeschaffenheit in der Trinkwasser-Installation.



# Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen

## Beispiel: Trinkwasser

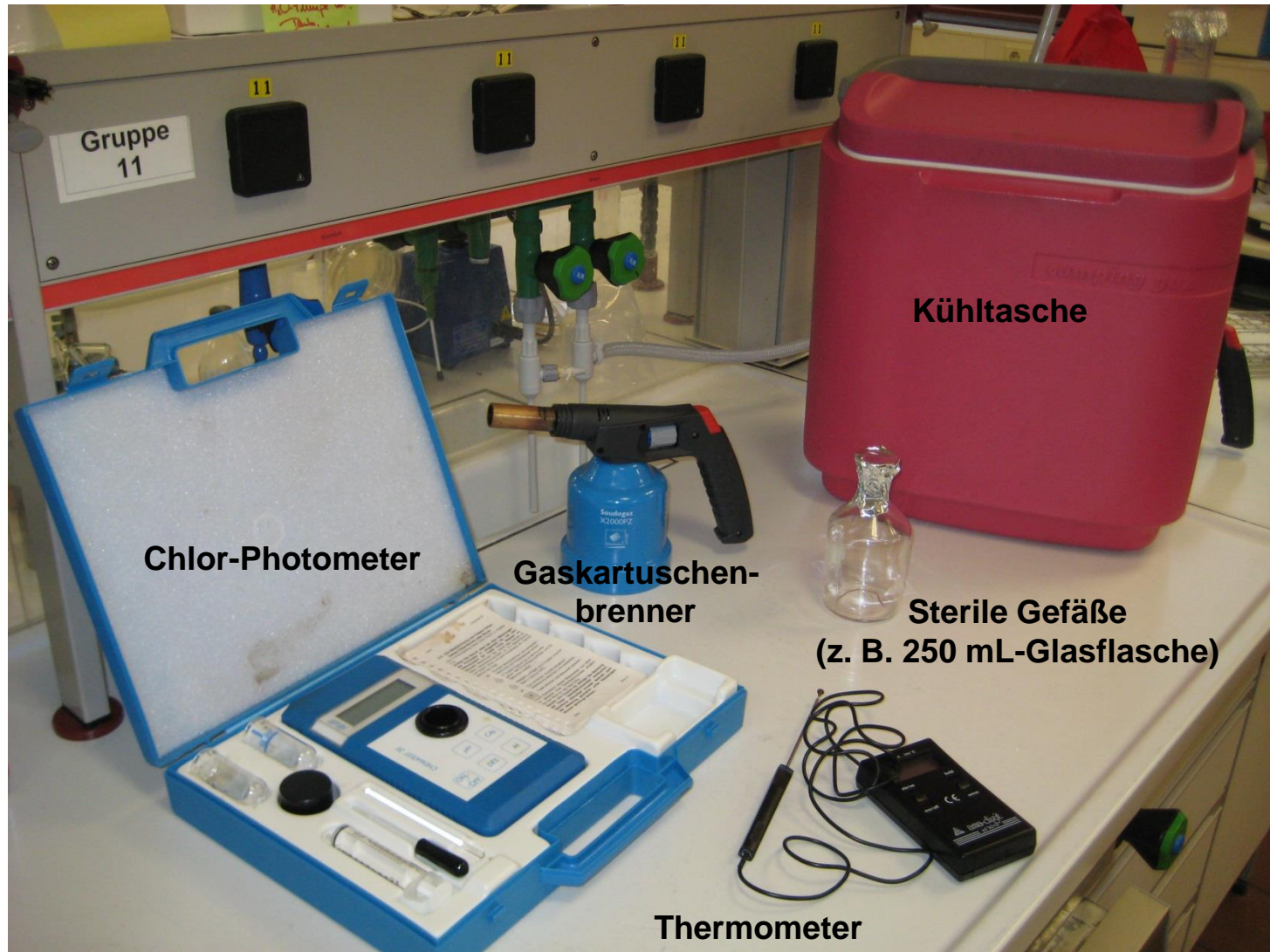
### Probenahme an einer Entnahmearmatur für unterschiedliche Zwecke (nach DIN EN ISO 19458, 2006)

<b>Feststellung der Wasserbeschaffenheit</b>	<b>Qualität des Wassers</b>	<b>Entfernen von angebrachten Vorrichtungen und Einsätzen</b>	<b>Desinfektion</b>	<b>Spülung</b>
Im Verteilungsnetz (Verantwortlichkeit des Wasserversorgers)	In der Hauptverteilung	Ja	Ja	Ja
An der Entnahmearmatur des Verbrauchers (Veränderungen durch die Trinkwasser-Installation)	An der Entnahmearmatur	Ja	Ja	Nein (minimal) <sup>a)</sup>
Während der Entnahme aus der (ggf. verschmutzten) Armatur	Wie es verbraucht wird	Nein	Nein	Nein

a) Nur kurz spülen, um den Einfluss der Desinfektion der Entnahmearmatur auszugleichen.

Desinfektion: z. B. Abflammen des Zapfhahns für zwei bis drei Minuten

# Probenahmegefäße und Zubehör



# Entnahme von Trinkwasser: Beispiel Zapfhahnproben

Anforderungen an Zapfhähne für übliche mikrobiologische Probenahmen:

- aus Metall,
- abflammbar,
- ohne Schläuche oder Strahlregler (z. B. Perlatores)



**Zapfhahn mit Strahlregler**



**Zapfhahn ohne Strahlregler**



# Entnahme einer Trinkwasserprobe



# Nachweis von Mikroorganismen in Wasser

## Quantitativer Nachweis

- Bestimmung der **Gesamtzellzahl** (alle vermehrungsfähigen und nicht vermehrungsfähigen Zellen; mikroskopische Methoden oder Durchflusszytometrie).
- Bestimmung der **Lebendzellzahl** (Koloniezahl, MPN [most probable number]; unter bestimmten Bebrütungsbedingungen kultivierbare Mikroorganismen; Kulturverfahren).

## Qualitativer Nachweis

- Nachweis von taxonomischen Gruppen.
- Identifizierung von einzelnen Arten von Mikroorganismen.

Kulturverfahren und kultivierungsunabhängige, oft molekularbiologische Verfahren.

# Im Praktikum verwendete Wasserproben zum Nachweis und zur Identifizierung von Bakterien

- Oberflächenwasser aus der Ruhr (Baldeneysee), Essen (Schöpfprobe)
- Trinkwasser (Stadtwerke Essen, Wasserwerk Überrauch, Universität Duisburg-Essen, Campus Essen, Gebäude S07)



# Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen nach der Trinkwasserverordnung

## Allgemeine Anforderungen (TrinkwV § 4):

Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist.

Trinkwasser wird zur Beurteilung der hygienisch-mikrobiologischen Beschaffenheit routinemäßig auf folgende Parameter untersucht:

- **Koloniezahl bei 22 °C** in 1 mL
  - **Koloniezahl bei 36 °C** in 1 mL
- } Zur Beurteilung der allgemeinen mikrobiellen Belastung von Wasser.
- ***Escherichia coli*** in 100 mL (Anwesenheit weist auf fäkale Verunreinigung des Wassers hin).
  - **Coliforme Bakterien** in 100 mL (Anwesenheit weist auf fäkale oder eine andere allgemeine Verunreinigung des Wassers hin).

# Versuchsübersicht

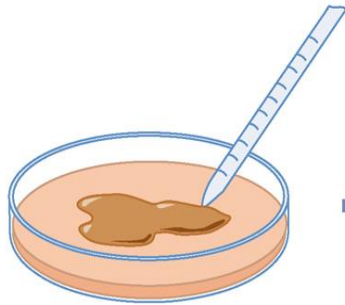
## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

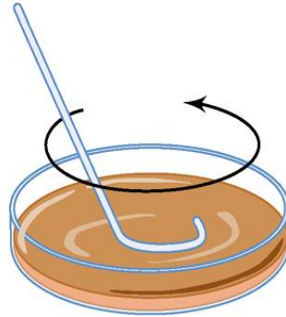
# Versuch Nr. 13: Bestimmung der Koloniezahl

## Methoden zur Bestimmung der Koloniezahlen (koloniebildende Einheiten)

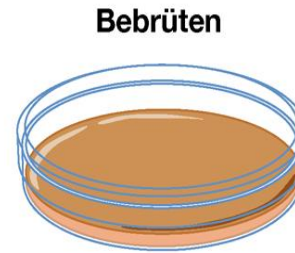
### Oberflächenplattierungsverfahren



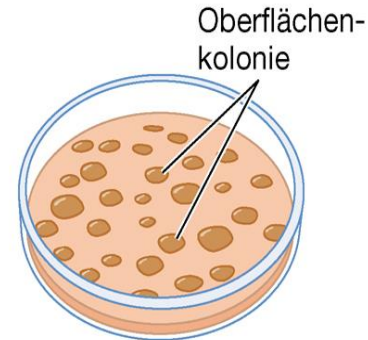
Probe wird mit einer Pipette auf die Oberfläche der Agarplatte gegeben (0,1ml oder weniger)



Probe wird mit einem sterilen Spatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt

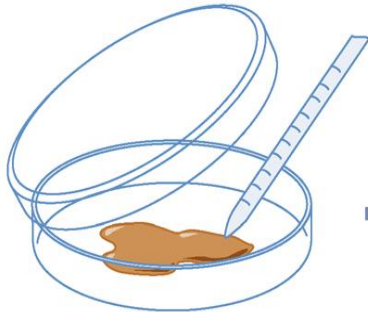


Bebrüten

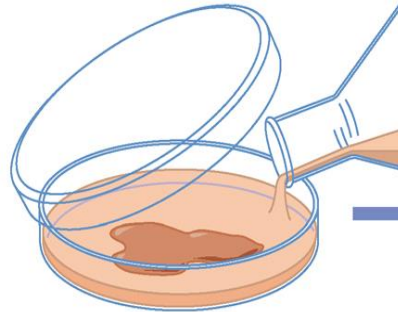


Normales Ergebnis bei Plattierung auf der Oberfläche

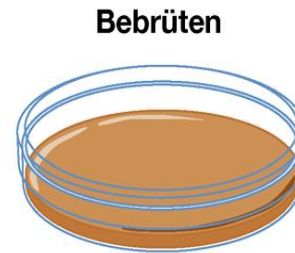
### Gussplattenverfahren



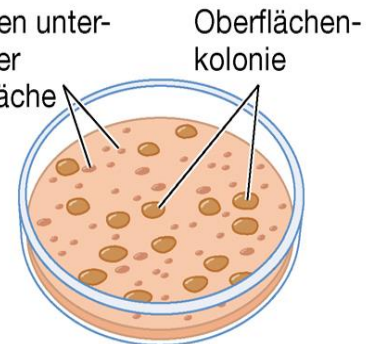
Probe wird mit der Pipette in eine sterile Platte eingefüllt



Steriles Medium wird zugegeben und mit der Probe gemischt



Bebrüten

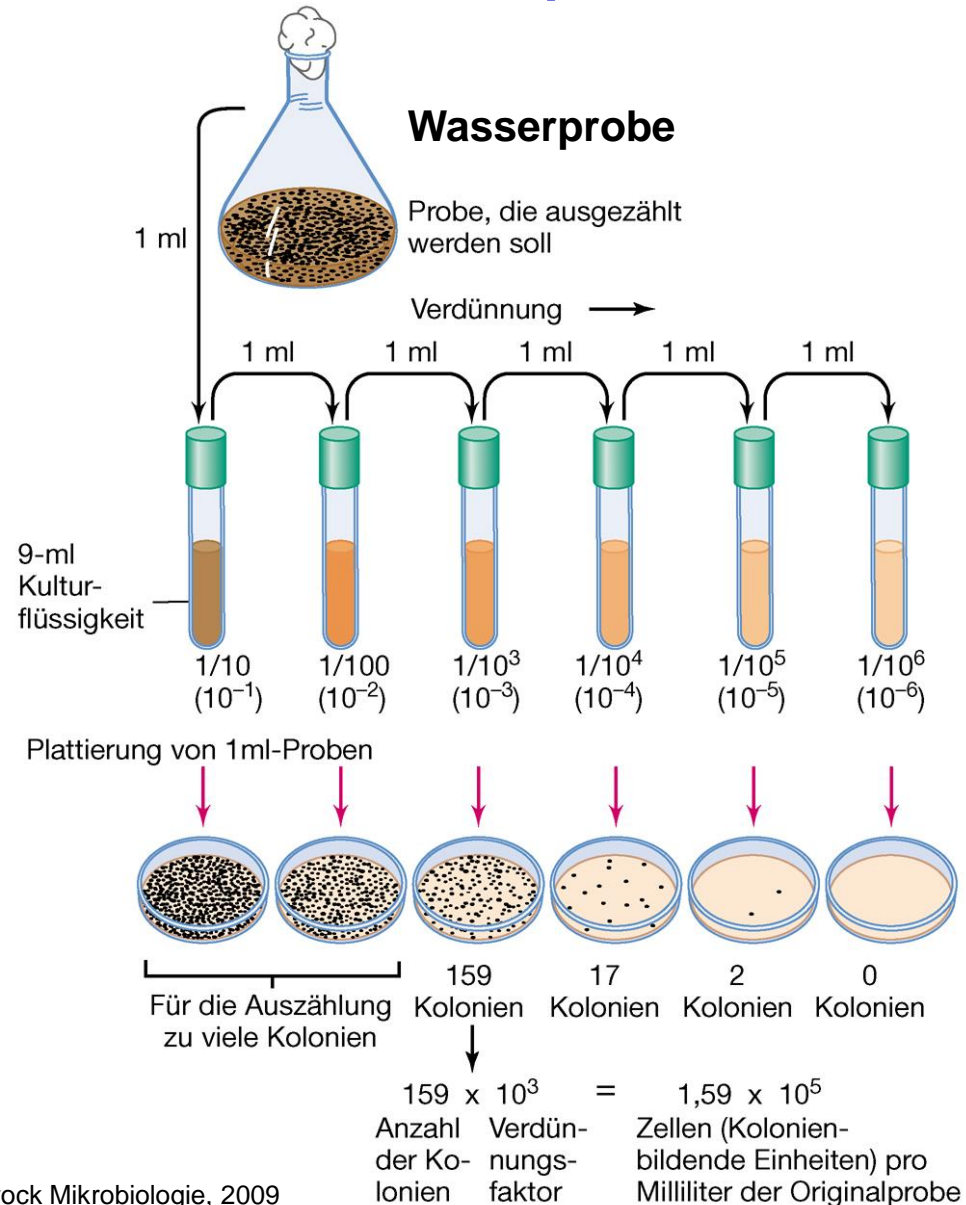


Normales Ergebnis bei Anwendung der Gussplattenmethoden

# Versuch Nr. 13: Bestimmung der Koloniezahl (genormtes Verfahren: ISO 6222)

## 1. Tag (Montag)

- Proben: Trinkwasser, Ruhrwasser.
- Beschreibung der Wasserproben.
- Ansatz: - Trinkwasser unverdünnt  
- Ruhrwasser 1:10, 1:100 und 1:1000 in Deionat verdünnt.
- Anlegen von Gussplatten mit Hefeextraktagar, 4 Platten pro Ansatz.
- Bebrütung: je 2 Platten bei 22 °C und bei 36 °C (Doppelbestimmung)



# Versuchsübersicht

## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung



# Versuche Nr. 14-18: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien

## Coliforme Bakterien

- Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, die bei 36 °C Lactose unter Gas- und Säurebildung vergären können; sie bilden  $\beta$ -Galactosidase (katalysiert Lactose-Spaltung).
- Vor allem Vertreter der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella*.
- Natürliches Habitat: Darmtrakt von Mensch und Tier (fäkale Herkunft), Vermehrung auch im Oberflächenwasser und Abwasser (Umwelt).
- Nachweis im Wasser  $\Rightarrow$  Hinweis auf entsprechende Verunreinigung.

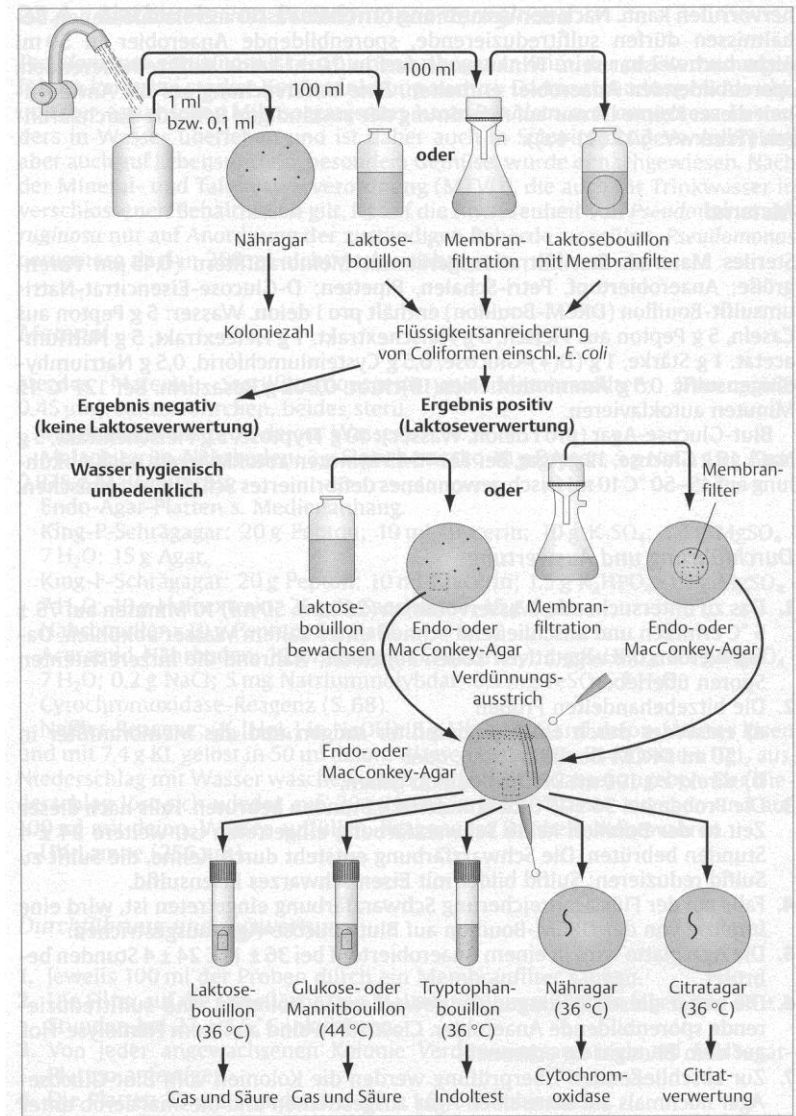
## *Escherichia coli*

- Typischerweise in hohen Konzentrationen im Darm von Menschen und warmblütigen Tieren.
- Nachweis im Wasser  $\Rightarrow$  Hinweis auf eine fäkale Verunreinigung.

# Versuch Nr. 14: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels Flüssigkeitsanreicherung

## 1. Tag (Montag)

- Proben: Trinkwasser, Ruhrwasser.
- Ansatz: je 100 mL Trinkwasser und Ruhrwasser.
- Anlegen von Primärkulturen in Lactose-Pepton-Bouillon (Flüssigkeitsanreicherung).
- Bebrütung: 36 °C, 24 h.

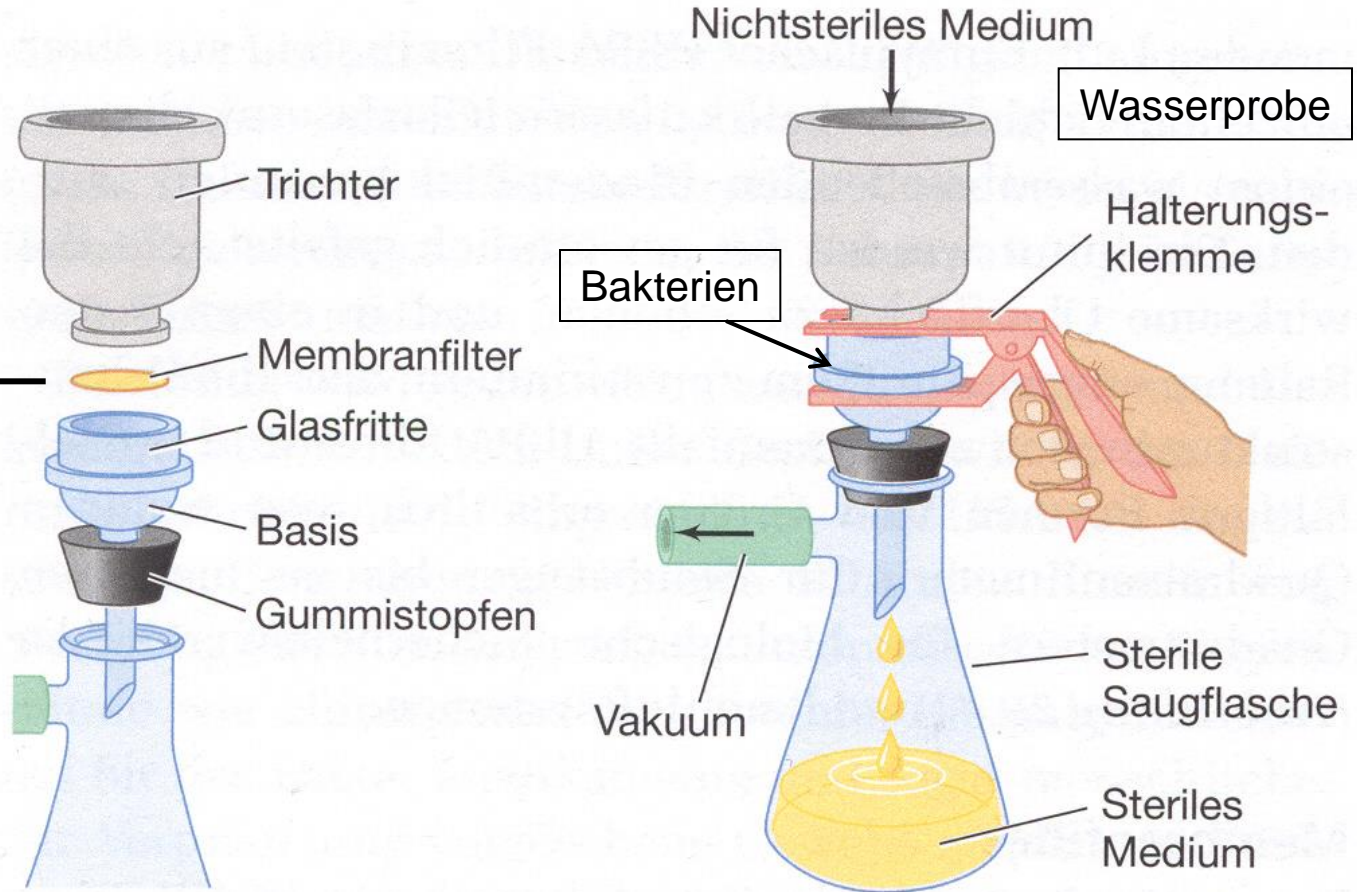
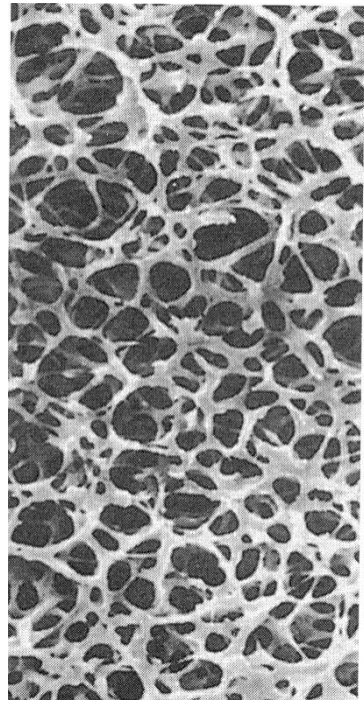


# Versuchsübersicht

## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

# Versuch Nr. 15: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels Membranfiltration



**Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von einem konventionellen Membranfilter (Porengröße der Membranfilter im Praktikum: 0,45  $\mu\text{m}$ ).**

Quelle: Madigan und Martinko, Brock Mikrobiologie, 2009

# Versuch Nr. 15: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels der Membranfiltration

**Ziel der Anwendung der Membranfiltration im Rahmen von Trinkwasseruntersuchungen:**

Konzentrierung von Bakterien aus großen Wasservolumina (oft 100 mL) auf der Membranoberfläche  $\Rightarrow$  ermöglicht Quantifizierung von Bakterien anhand ihrer Koloniebildung auf den Membranfiltern nach Bebrütung der Filter auf der Oberfläche von Agarnährmedien.



**Im Praktikum verwendete  
Filtrationseinrichtung**

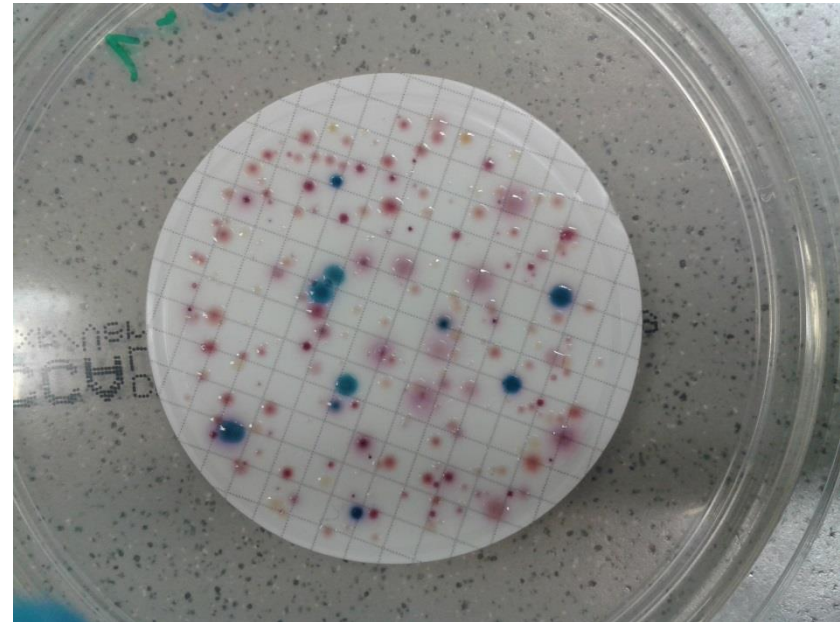


**Bakterienkolonien auf  
einem Membranfilter**

# Versuch Nr. 15: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels Membranfiltration (genormtes Verfahren: ISO 9308-1)

## 1. Tag (Montag)

- Proben: Trinkwasser, Ruhrwasser.
- Ansätze:
  - Trinkwasser 100 mL
  - Ruhrwasser 10 mL und 1 mL (1 mL zu 10 mL Deionat).
- Membranfiltration (0,45 µm Filter)
- Anlegen von Primärkulturen:
  - Transfer der Filter auf Chromogenen Coliformen-Agar (CCA) und Bebrütung (36 °C, 24 h).



# Versuchsübersicht

## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

# Versuch Nr. 16: Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mit dem Colilert-18/Quanti-Tray-System

## 1. Tag (Montag)

- Proben: Trinkwasser, Ruhrwasser.
- Ansätze: 100 mL Trinkwasser und 100 mL Ruhrwasser.
- Zugabe des Colilert-18-Reagenzes.
- Den gesamten Ansatz in Quanti-Tray füllen.
- Quanti-Tray versiegeln.
- Bebrütung: 36 °C, 18 h - 22 h.





# Versuchsübersicht

## Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

Tag	Versuch 13 Bestimmung der Kolonie- zahl	Versuch 14 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Flüssigkeitsan- reicherung	Versuch 15 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Membran- filtrations- verfahren	Versuch 16 Nachweis <i>E. coli</i> und Coliforme: Colilert- Verfahren	Versuch 17 Nachweis <i>E. coli</i> : Mikrotiter- platten- verfahren	Versuch 18 Identifizierung mit API 20 E- System
<b>Montag</b>	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
<b>Dienstag</b>	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
<b>Mittwoch</b>	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
<b>Donners- tag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
<b>Freitag</b>	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

# Versuch Nr. 17: Nachweis von *Escherichia coli* mit einem Mikrotiterplattenverfahren (genormtes Verfahren: ISO 9308-3)

Relevantes Verfahren für die Untersuchung von Badegewässern.

## 1. Tag (Montag)

- Probe: Ruhrwasser
- Verdünnung von Ruhrwasser 1:2 und 1:20.
- Animpfen einer Mikrotiterplatte.
- Bebrütung der versiegelten Platte: 44 °C, 2 d.

### 1 - Ansatz der Verdünnungsstufen



**Vorsicht:** Jedes Röhrchen vor jedem Pipettieren vortexen.

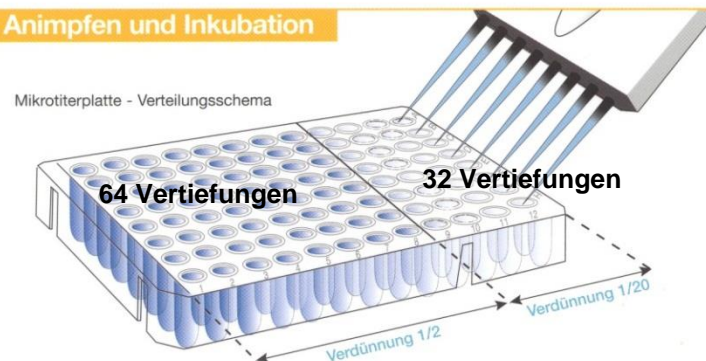
\*entsprechend der Menge des Salzgehaltes

### 2 - Vorbereitung zum Animpfen



Diesen Arbeitsschritt für jede Verdünnung, die in Schritt 1 hergestellt wurde, wiederholen.

### 3 - Animpfen und Inkubation



Inkubation

36 Std. (max. 72 Std.)

44°C ± 0.5°C

## Woche 2, Tag 1 (Montag)

### Stationen: Membranfiltration und Mikrotiterplatten

Gruppe 1, 2, 3, 4	⇒ Membranfiltration (Versuch 15)
Gruppe 9+10, 11+12	⇒ Mikrotiterplatten (Versuch 17)
Gruppe 5, 6, 7, 8	⇒ Membranfiltration
Gruppe 13+14, 15+16	⇒ Mikrotiterplatten
Gruppe 9, 10, 11, 12	⇒ Membranfiltration
Gruppe 17+18, 19+20	⇒ Mikrotiterplatten
Gruppe 13, 14, 15, 16	⇒ Membranfiltration
Gruppe 1+2, 3+4	⇒ Mikrotiterplatten
Gruppe 17, 18, 19, 20	⇒ Membranfiltration
Gruppe 5+ 6, 7+8	⇒ Mikrotiterplatten