

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
Montag	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
Dienstag	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
Mittwoch	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
Donners- tag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
Freitag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

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
Montag	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
Dienstag	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
Mittwoch	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
Donners- tag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
Freitag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

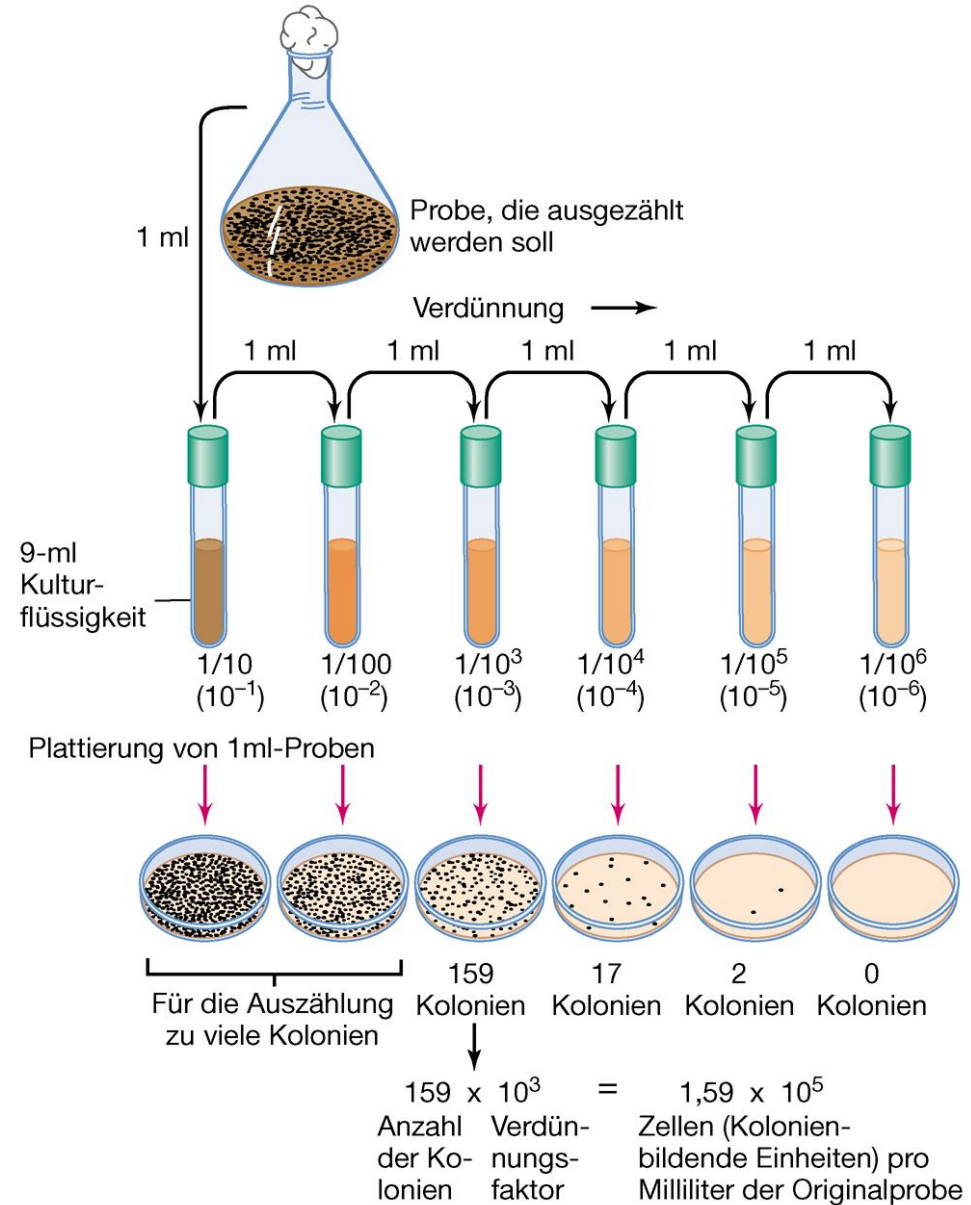
Versuch Nr. 13: Bestimmung der Koloniezahl

1. Tag (Montag)

- Proben: Trinkwasser, Ruhrwasser.
- Beschreibung der Wasserproben.
- Ansatz: - Trinkwasser unverdünnt
- Ruhrwasser 1:10, 1:100 und 1:1000.
- Anlegen von Gussplatten mit Hefeextraktagar.
- Bebrütung: 22 °C und 36 °C.

2. – 4. Tag (Mittwoch bis Freitag)

- Auszählung der Kolonien nach 2, 3 und 4 Tagen (Mittwoch bis Freitag).
- Berechnen der Koloniezahlen pro mL.



- Aus den Ergebnissen der Zählungen wird jeweils die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) je mL Wasserprobe für jeden Tag und jede Inkubationstemperatur errechnet.
- **Ruhrwasserprobe:** es werden für die Berechnung der KBE pro mL nur die Agarplatten mit 10 bis 300 Kolonien berücksichtigt. Bei mehr als 300 Kolonien pro Platte werden die Zählergebnisse als "> 300 " oder nur als Näherungswerte angegeben.

		22 °C			
Tag	Verd.	1. Platte	2. Platte	Summe Kolonien	KBE/mL
2	10 ⁻¹	> 300	> 300		
	10 ⁻²	81	102	209	9500
	10 ⁻³	11	15		(9,5 x 10 ³)

BEISPIEL

Berechnung der KBE/ml

(gemäß ISO 8199: Wasserbeschaffenheit – Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren)

$$\text{KBE/ml} = Z/V_t$$

Z: Summe aller gezählten Kolonien = 209 KBE

V_t: untersuchtes Gesamtvolumen
(2 x 0,01 ml) + (2 x 0,001 ml) = 0,022 ml

Konzentration in unverdünnter Ruhrwasserprobe:

209 KBE/0,022 ml = 9500 KBE/ml
(9,5 x 10³ KBE/ml)

Anforderungen an Trinkwasser nach der TrinkwV

Koloniezahl
(KBE/mL)

TrinkwV 2001
Grenzwert/Anforderung

22 °C (2 d^a), 3 d^b)

100/mL^a) bzw. ohne anormale Veränderung^b)

36 °C (2 d)

100/mL^a) bzw. ohne anormale Veränderung^b)

a) Die Angaben gelten bei Anwendung des Verfahrens der Koloniezahlbestimmung nach der TrinkwV 2001 (Anlage 5, Teil I, d. Verfahren bb).

b) Die Angaben gelten bei Anwendung des Verfahrens der Koloniezahlbestimmung nach der DIN EN ISO 6222 (Anlage 5, Teil I, d. Verfahren aa) (**Praktikumsversuch**).

Beide Verfahren sind nach der aktuell gültigen Trinkwasserverordnung zulässig.

Versuch Nr. 13: Bestimmung der Koloniezahl

Definition der Koloniezahl

Zahl der mit dem Auge oder mit einer bestimmten Vergrößerung sichtbar werdenden Kolonien, die sich aus einer definierten Wassermenge bei festgelegtem Nährstoffangebot, festgelegter Bebrütungstemperatur und innerhalb einer bestimmten Zeit in oder auf einem Agarnährmedium entwickelt.

Methode

Es handelt sich um eine Bestimmung der Lebendzellzahl (“viable count“, “plate count“, “colony count“).

Versuch Nr. 13: Bestimmung der Koloniezahl

Empirische Feststellung

In Zeiten häufiger Epidemien wurde festgestellt, dass keine Seuchengefahr bestand, wenn der Ablauf eines Langsandsfilters weniger als 100 Kolonien pro mL aufwies.

Sinn der Koloniezahl-Bestimmung nach der Trinkwasserverordnung

- Arbeitstechnisch einfache Erfassung hygienisch-relevanter Mikroorganismen mit einem streng festgelegten Verfahren,
- Erfassung hygienisch risikoreicher Veränderungen der mikrobiellen Trinkwasserqualität bei der Gewinnung, Aufbereitung und Verteilung des Wassers.
- Koloniezahlen bei 22 °C und 36 °C gelten nach der TrinkwV als **allgemeine Indikatorparameter**.

Versuchsübersicht

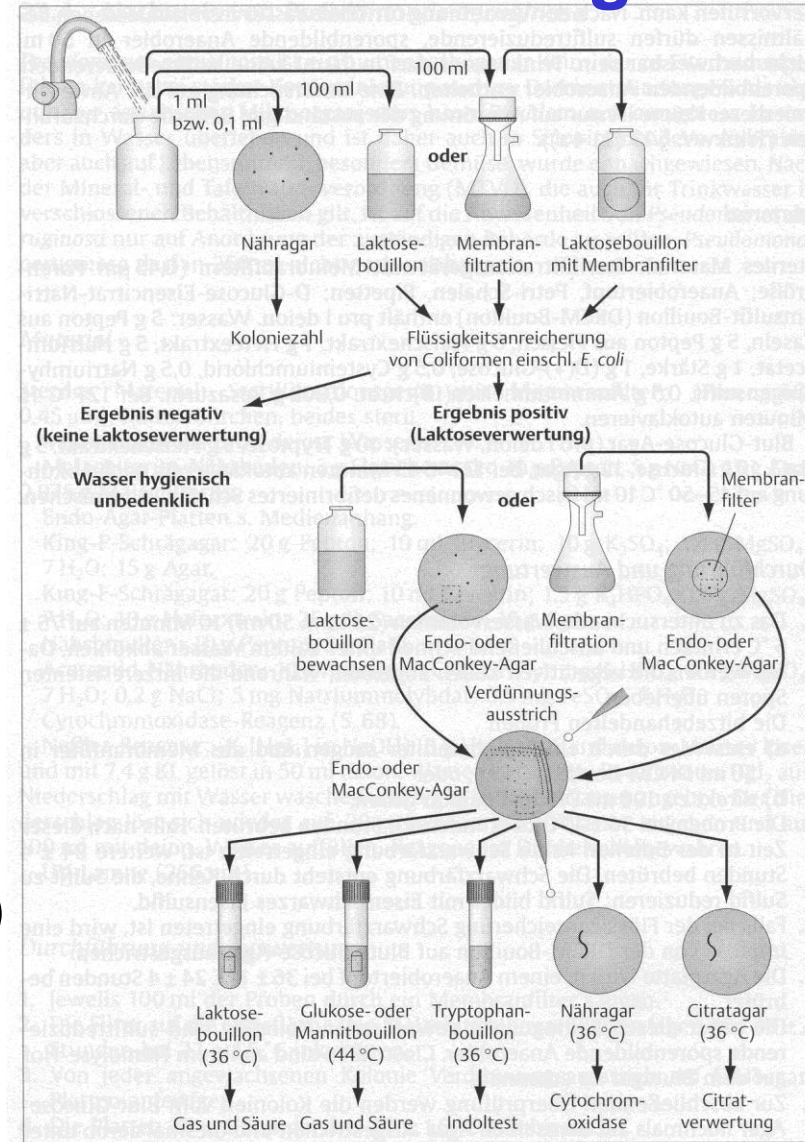
Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

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
Montag	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
Dienstag	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
Mittwoch	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
Donners- tag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
Freitag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

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

3. Tag (Mittwoch)

- Ablesen der Primärkulturen in Lactose-Pepton-Bouillon auf Trübung, Farbumschlag und Gasbildung nach 48 h.
- 4 Kolonien auf Endo-Agar auswählen und Aussehen beschreiben.
- Anlegen von Bunten Reihen der 4 Kolonien der Subkulturen auf Endo-Agar.
 - Lactose-Bouillon (36 °C, 24 h - 48 h)
 - Glucose-Bouillon (44 °C, 24 h)
 - Tryptophan-Bouillon (36 °C, 24 h)
 - Nähragar (36 °C, 24 h)
 - Citratagar (36 °C, 24 h - 48 h).



Versuchsübersicht

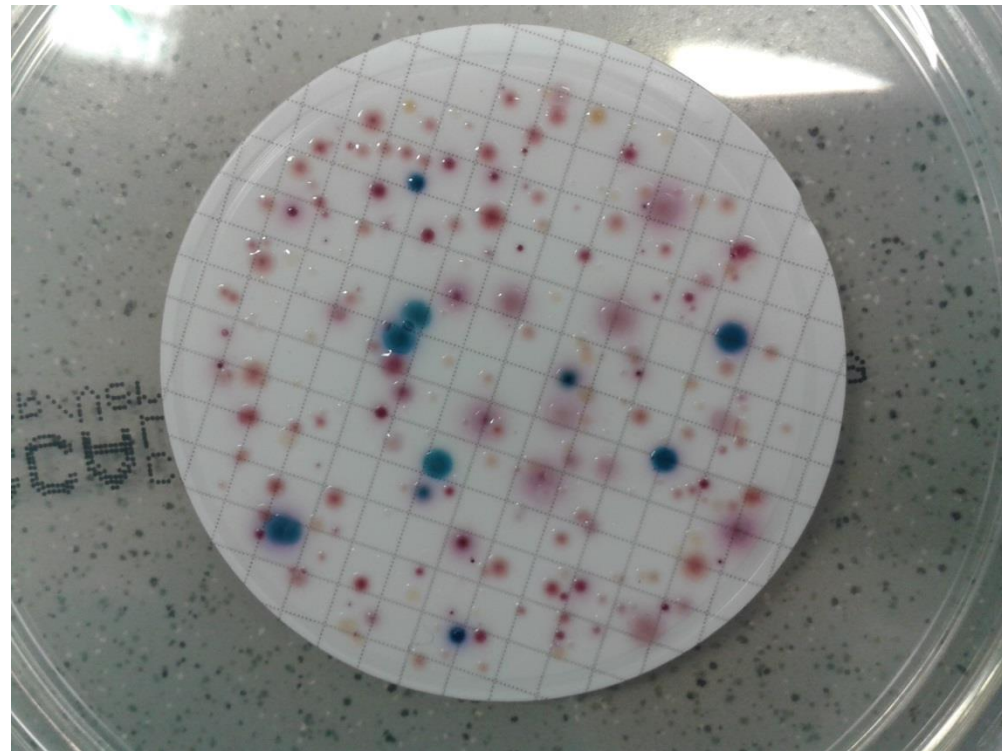
Mikrobiologische Wasseruntersuchungen

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
Montag	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
Dienstag	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
Mittwoch	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
Donners- tag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
Freitag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

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

2. Tag (Dienstag)

- Auswertung der Primärkulturen auf CCA:
 - Auszählung aller dunkelblauen bis violetten Kolonien (*E. coli*), Berechnung der Konzentration von *E. coli* (KBE/100 mL)
 - Auszählung aller rosa bis roten Kolonien (verdächtige coliforme Bakterien).
- Anlegen von Subkulturen von 4 verdächtigen rosa bis roten Kolonien aus der Ruhrwasserprobe auf Trypton-Soja-Agar (CASO-Agar) und Bebrütung der Subkulturen (36 °C, 24 h).



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

3. Tag (Mittwoch)

- Oxidase-Test von Einzelkolonien der 4 Subkulturen (verdächtige coliforme Bakterien); verreiben von Kolonien auf Oxidase-Teststreifen und Ablesen der Farbreaktion innerhalb von 1 bis 2 min.

Befunde:

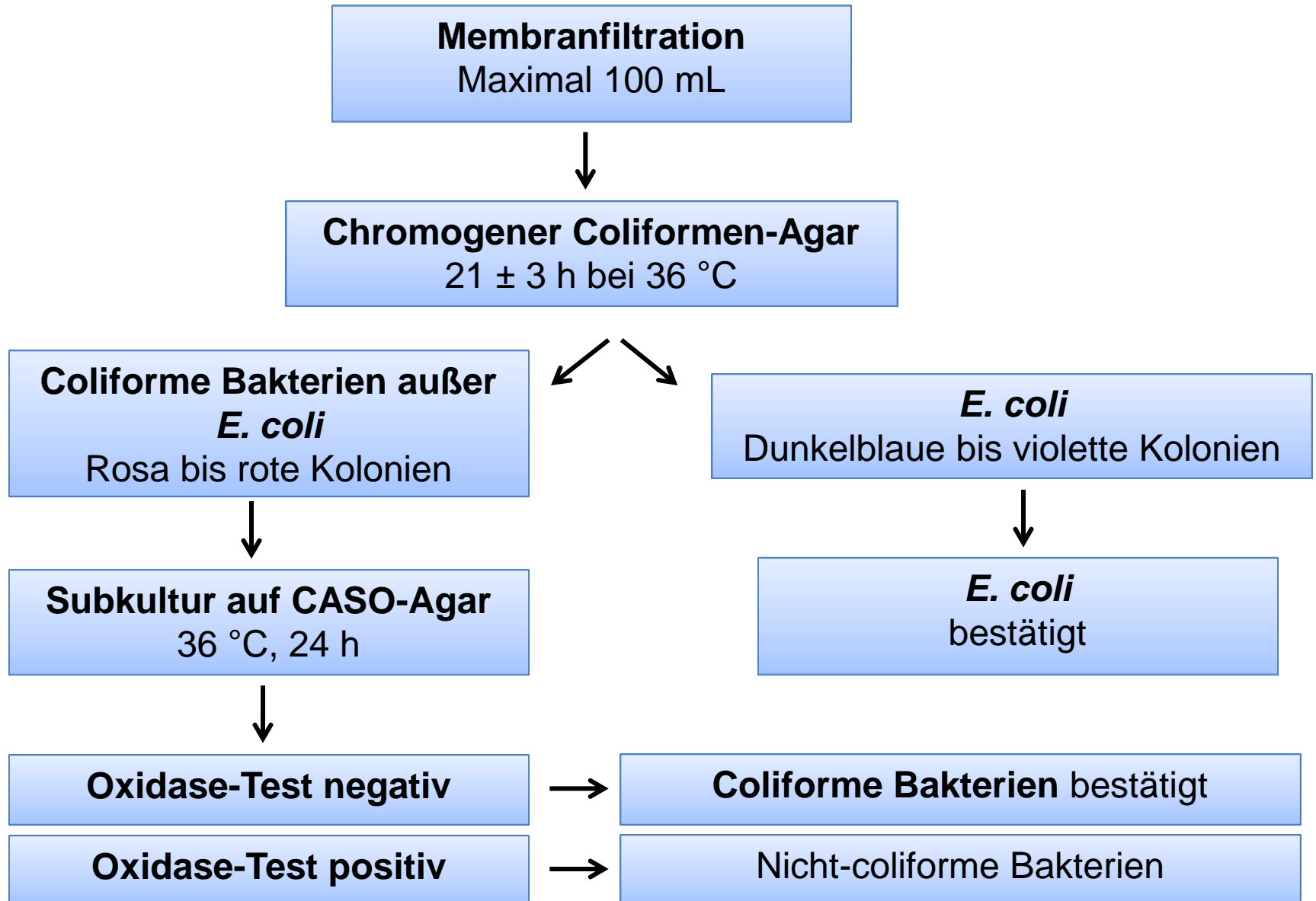
blauviolette Verfärbung \Rightarrow Cytochromoxidase-positiv

keine Verfärbung \Rightarrow Cytochromoxidase-negativ

- Berechnung (Hochrechnung) der Konzentration von coliformen Bakterien (KBE/100 mL).

Coliforme Bakterien: Summe aller dunkelblauen bis violetten und aller rosa bis roten Kolonien mit negativer Oxidase-Reaktion.

Untersuchung von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels Membranfiltration



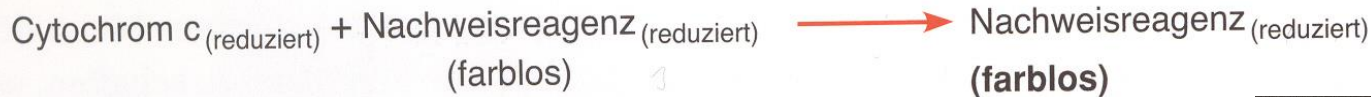
Prinzip des Oxidase-Tests

Positives Ergebnis:



Beispiel: ***Pseudomonas aeruginosa*** (Oxidase-positive Reaktion, rechts)

Negatives Ergebnis:



Beispiel: ***Escherichia coli*** (Oxidase-negative Reaktion, links)

Oxidase-Nachweisreagenzien:

- Tetramethyl- oder Dimethyl-p-phenylendiamin
- Einsatz als Lösung oder auf Teststreifen



Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen nach der Trinkwasserverordnung

Allgemeine Anforderung: Wasser für den menschlichen Gebrauch muss frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein.

- *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; Hinweis auf Defizite in der Aufbereitung, Speicherung und Verteilung von Trinkwasser)

Zugelassene Untersuchungsverfahren:

- Membranfiltrationsverfahren (Referenzverfahren, DIN EN ISO 9308-1)
- Colilert-18/Quanti-Tray (alternatives Verfahren, DIN EN ISO 9308-2)

Anforderungen nach TrinkwV

Anlage 1

(zu § 5 Absatz 2 und 3)

Mikrobiologische Parameter

Teil I

Allgemeine Anforderungen an Trinkwasser

Laufende Nummer	Parameter	Grenzwert
1	Escherichia coli (E. coli)	0/100 ml
2	Enterokokken	0/100 ml

Anlage 3

(zu § 7)

Indikatorparameter

Teil I

Allgemeine Indikatorparameter

Laufende Nummer	Parameter	Einheit, als	Grenzwert/Anforderung
5	Coliforme Bakterien	Anzahl/100 ml	0

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
Montag	Anlegen von Gussplatten	Ansatz von Flüssigkulturen	Membran- filtration	Animpfen von Quanti-Trays	Animpfen von Mikro- titerplatten	-
Dienstag	-	Subkulturen Endo-Agar	Subkulturen CASO-Agar	Auswertung	-	-
Mittwoch	Auszählung	Ansatz: kleine Bunte Reihe	Oxidase-Test, Auswertung	-	Auswertung	-
Donners- tag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Ansetzen von Teststreifen
Freitag	Auszählung	Auswertung Bunte Reihe	-	-	-	Auswertung

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

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.

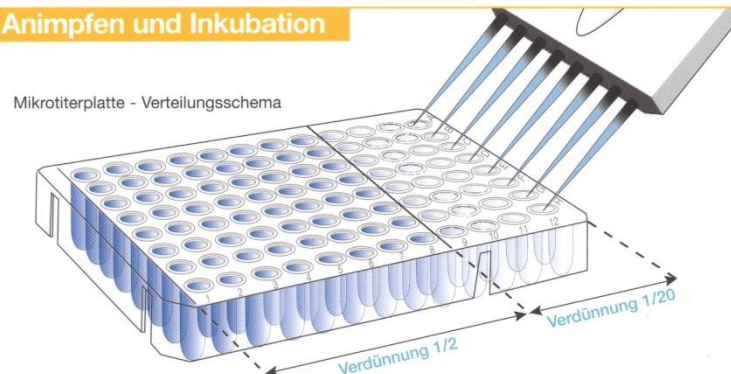
*entsprechend der Menge des Salzgehaltes

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.)

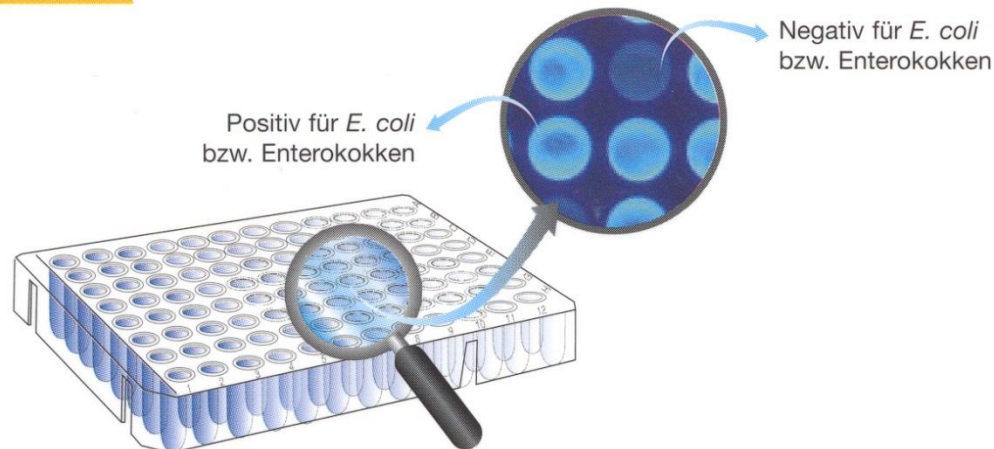
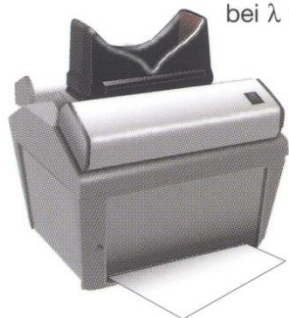
44°C ± 0.5°C

Versuch Nr. 17: Nachweis von *Escherichia coli* mit einem Mikrotiterplattenverfahren

2. Tag (Mittwoch)

- Ablesung aller Vertiefungen auf hellblaue Fluoreszenz mit einer UV-Handlampe.
- Bestimmung der charakteristischen Zahl: z. B. 32/5 (32 von 64 Vertiefungen der 1:2 Verdünnung positiv und 5 der 32 Vertiefungen der 1:20 Verdünnung positiv) \Rightarrow 756 MPN/100 mL.
- Ermittlung der wahrscheinlichsten Zahl mit Hilfe von ausliegender MPN-Tabelle; Ergebnisangabe: MPN/100 mL.

4 - Ablesung



Jede Mikrotiterplatte, mit dem Haftstreifen verschlossen, in die UV-Beobachtungskammer stellen. Alle Vertiefungen mit blauer Fluoreszenz als positiv betrachten.

Mikrobiologische Anforderungen an Badegewässer gemäß der EU-Badegewässerrichtlinie (2006)

Parameter	Ausgezeichnete Qualität	Gute Qualität	Ausreichende Qualität
Binnengewässer			
Intestinale Enterokokken (KBE/100 mL)	200 ^a	400 ^a	330 ^b
<i>Escherichia coli</i> (KBE/100 mL)	500 ^a	1000 ^a	900 ^b
Küstengewässer und Übergangsgewässer			
Intestinale Enterokokken (KBE/100 mL)	100 ^a	200 ^a	185 ^c
<i>Escherichia coli</i> (KBE/100 mL)	250 ^a	500 ^a	500 ^c

^a auf Grundlage einer 95-Perzentilbewertung; ^b auf Grundlage einer 90-Perzentilbewertung; würde bei einer 95-Perzentilbewertung in etwa den Werten 660 und 1800 entsprechen; ^c auf Grundlage einer 90-Perzentilbewertung; würde bei einer 95-Perzentilbewertung in etwa den Werten 370 und 1000 entsprechen.

Die Bewertung der Qualität eines Badegewässers erfolgt auf Basis von Daten über vier Jahre (vier abgelaufene Badesaisons).