

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Nachweis von Escherichia coli und coliformen Keimen (K 6)

DIN
38 411
Teil 6

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; microbiological methods (group K); determination of Escherichia coli and coliform organisms (K 6)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des boues; méthodes microbiologiques (groupe K); détermination des Escherichia coli et des organismes coliformes (K 6)

Diese Norm wurde gemeinsam mit der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker aufgestellt (siehe Erläuterungen).

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

1 Allgemeine Angaben

Bakterien der Art Escherichia coli (E. coli) werden in großer Zahl im Darminhalt von Menschen und warmblütigen Tieren angetroffen; ihr Nachweis im Wasser gilt als Zeichen einer fäkalen Verunreinigung. Die sogenannten coliformen Keime können fäkalen Ursprungs sein, sie vermehren sich jedoch auch im Abwasser und Oberflächenwasser; ihr Nachweis im Wasser gilt als Zeichen einer entsprechenden Verunreinigung.

E. coli und die sogenannten coliformen Keime gehören zu den Enterobacteriaceae; dieser Familie kommen u. a. folgende gemeinsame Eigenschaften bzw. Fähigkeiten zu:

Gramnegative, nicht sporenbildende, gerade, stäbchenförmige Bakterien, beweglich durch peritriche Begeißelung oder unbeweglich; aerober und anaerober Glucoseabbau, negative Cytochromoxidase-Reaktion, Reduktion von Nitrat- zu Nitrit-Ionen unter anaeroben Bedingungen.

E. coli ist durch folgende zusätzliche Merkmale charakterisiert:

Vergärung von Lactose, Glutaminsäuredecarboxylase-Aktivität, keine Pigmentbildung auf Nähragar bei achttägiger Bebrütung (bei 20 °C), negative Citrat- und Cyanid-Probe, keine Spaltung von Harnstoff, keine Spaltung von Gelatine, positive Methylrot-Reaktion und negative Voges-Proskauer-Reaktion; die meisten Stämme bilden Indol aus tryptophanhaltiger Bouillon sowie bei $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ Gas aus Glukose oder Mannit.

Fortsetzung Seite 2 bis 16

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Documents

Als „coliforme Keime“ werden diejenigen Bakterien aus der Familie Enterobacteriaceae bezeichnet, die bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ Lactose unter Gasbildung vergären können; sie gehören überwiegend den Gattungen Escherichia, Citrobacter, Enterobacter und Klebsiella an.

2 Anwendungsbereich

Die Verfahren sind anwendbar auf die Untersuchung von Rohwässern zur Trinkwassergewinnung und von aufbereitetem Trink- sowie Schwimm- und Badebeckenwasser.

Das Membranfilterverfahren ist für die Untersuchung von sehr trüben Wasserproben nicht geeignet, da die Filteroberfläche unter Umständen verstopft wird, bevor ein ausreichendes Volumen Wasser filtriert worden ist.

Für Probenahme, Transport und Aufbewahrung gelten DIN 38 402 Teil 14 und Teil 19 sowie DIN 38 411 Teil 1.

3 Grundlage des Verfahrens

Da es bei der Wasseruntersuchung nicht möglich ist, auf alle für die systematische Bestimmung differentialdiagnostisch wichtigen Merkmale zu prüfen, wurden Untersuchungsgänge entwickelt, die es gestatten, mit vereinfachten Verfahren zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Innerhalb eines Verfahrens sind die Untersuchungsabschnitte so aufeinander abgestimmt, daß ein Abweichen vom vorgeschriebenen Gang (z. B. durch Verwendung eines anderen Nährmediums) die Richtigkeit des Untersuchungsergebnisses in Frage stellen kann. Unter der Voraussetzung, daß eine Wasserprobe nach einem der in den folgenden Abschnitten angegebenen Verfahren untersucht wird, reicht für die Identifizierung als E. coli folgender Befund aus:

- Cytochromoxidase-Reaktion negativ
- Indolbildung aus Tryptophan
- Gas- und Säurebildung aus Glucose oder Mannit bei $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ innerhalb von (24 ± 4) h
- negatives Ergebnis der Citrat-Probe bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$

Der Nachweis von coliformen Keimen im Wasser gilt als erbracht, wenn darin Bakterien gefunden werden, die bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ Lactose innerhalb von (44 ± 4) h unter Säure- und Gasbildung vergären und bei denen die Cytochromoxidase-Reaktion negativ ausfällt (siehe auch Tabelle 1).

Die Gesamtuntersuchung gliedert sich in drei Teilschritte:

a) Anzüchten der Primärkultur

Zur Anzüchtung der Primärkulturen stehen zwei Verfahren zur Verfügung:

- Nachweis durch Flüssigkeitsanreicherung
- Nachweis durch Membranfilterverfahren (mit Einbringen des Filters in 50 ml Flüssigkeit)

- b) Anzüchtung der Subkultur, um Reinkulturen zu gewinnen
- c) Identifizierung der gewonnenen Reinkulturen durch Bestimmen gewisser biochemischer Leistungen.

4 Geräte

- Wasserbad, einstellbar auf $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$
- Brutschrank, z. B. nach DIN 58 945 Teil 1
- Dampftopf
- Dampfsterilisator, z. B. nach DIN 58 946 Teil 2
- Vorrichtung zur Membranfiltration, z. B. nach DIN 38 411 Teil 5
- Membranfilter, Durchmesser z. B. 50 mm, mittlere Porenweite $0,45\ \mu\text{m}$
- Stehkolben oder Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 2000 ml, z. B. Kolben DIN 12 347 — SE 2000
- Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 250 ml, weithalsig, z. B. Kolben DIN 12 385 — WE 250
- Erlenmeyerkolben, Nennvolumen 50 ml, z. B. Kolben DIN 12 380 — EE 50, mit Gärröhrchen
- Babyflaschen (Weithals), Nennvolumen bis 250 ml, graduiert, mit Überfalldeckel aus Metall oder Glas, mit Gärröhrchen
- Kulturflaschen, Nennvolumen 200 ml, oberer Durchmesser 18 mm
- Kulturröhrchen, mit Rand, passend für Kapsenbergkappen, Durchmesser 16 mm oder 18 mm, Länge 160 mm oder 180 mm
- Überfallkappen, passend für Kulturröhrchen und -flaschen aus Glas, Kunststoff oder Metall, z. B. Kapsenbergkappen
- Gärröhrchen, passend für Kulturröhrchen
- Petrischalen, steril, aus Kunststoff oder Glas, Durchmesser etwa 9 cm, z. B. nach DIN 12 339
- Kollehalter
- Impföse, z. B. Platindraht, oberes Ende zu einer Öse von etwa 3 mm gebogen
- Kulturschalen, steril, aus Kunststoff, mit Deckel, Durchmesser des Deckels etwa 90 mm
- Meßpipetten, Nennvolumen 1 und 10 ml, z. B. Pipette DIN 12 697 — MPAS 1-001
- Enghals-Standflaschen mit Kegelschliff und Stopfen, aus braunem Glas, Nennvolumen 100 ml, z. B. Standflasche DIN 12 036 — G — E 100
- Glastrichter, Durchmesser 150 mm, z. B. Trichter DIN 12 445 — 150
- Vollpipetten, Nennvolumen 5, 10 und 100 ml, z. B. Pipette DIN 12 691 — VPAS 5
- TK-Tropfflasche mit Deckelstopfen, aus braunem Glas, Nennvolumen 50 ml
- pH-Meßgerät, z. B. nach DIN 19 265, mit Vorrichtung zur Temperaturkompensation und pH-Meßkette, z. B. nach DIN 19 261

5 Chemikalien

Als Reagenzien werden, wenn nicht anders angegeben, solche des Reinheitsgrades „zur Analyse“, als Wasser zum Ansetzen der wäßrigen Lösungen wird aus einer Glasapparatur doppelt destilliertes Wasser verwendet.

- 5.1 Agar, frei von Hemmstoffen, für die Mikrobiologie
- 5.2 Ammoniumdihydrogenphosphat, $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$
- 5.3 D-Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, für die Mikrobiologie
- 5.4 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $w = 96\%$
- 5.5 Fleischextrakt, für die Mikrobiologie
- 5.6 Gallesalzmischung
- 5.7 di-Kaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 , wasserfrei, reinst
- 5.8 Kristallviolett, $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$
- 5.9 Lactose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, für die Mikrobiologie
- 5.10 Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 5.11 Natriumchlorid, NaCl
- 5.12 tri-Natriumcitrat-Dihydrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 5.13 Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$
- 5.14 Natriumsulfit, Na_2SO_3
- 5.15 Neutralrot, $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClN}_4$
- 5.16 Pepton aus Casein, tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie
- 5.17 Pepton aus Fleisch, tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie
- 5.18 Pepton aus Sojamehl, papainisch verdaut, für die Mikrobiologie

5.19 Salzsäure I, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

5.20 Salzsäure II, $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/l}$

5.21 DL-Tryptophan, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, für biochemische Zwecke

5.22 Bromkresolpurpur-Lösung

— 1 g Bromkresolpurpur, $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$, für die Mikrobiologie, in 100 ml Wasser lösen.

5.23 Bromthymolblau-Lösung

— 1 g Bromthymolblau, $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{F}$, in 100 ml Natriumhydroxid-Lösung, $c(\text{NaOH}) = 0,05 \text{ mol/l}$, lösen.

5.24 N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid-Lösung

— 1 g N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid, $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$, in 100 ml Wasser lösen.

— Die Lösung in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahren.

Hat sich die Lösung braunviolett gefärbt, so ist sie unbrauchbar geworden.

5.25 Fuchsin-Lösung

— 10 g Fuchsin, für die Mikrobiologie, in 90 ml Ethanol (nach Abschnitt 5.4) lösen.

— Die Lösung durch ein Faltenfilter filtrieren.

Anmerkung: Da Fuchsin möglicherweise kanzerogene Eigenschaften besitzt, sollte beim Abwiegen und bei der Zubereitung des Endo-Agars eine Kontamination der Haut sowie das Einatmen von Staubpartikeln vermieden werden.

5.26 Naphthol-Lösung

— 1 g 1-Naphthol, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}$, in 100 ml Ethanol (nach Abschnitt 5.4) lösen.

— Die Lösung in einer dunklen Flasche im Kühlschrank aufbewahren.

Hat sich die Lösung rot gefärbt, so ist sie unbrauchbar geworden.

5.27 Natriumcarbonat-Lösung

— 10 g Natriumcarbonat, Na_2CO_3 , in 100 ml Wasser lösen.

5.28 Cytochromoxidase-Reagenz (Nadi-Reagenz)

— Gleiche Raumteile Naphthol-Lösung (nach Abschnitt 5.26) und N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumchlorid-Lösung (nach Abschnitt 5.24) unmittelbar vor dem Test und nur in den unmittelbar benötigten Volumina mischen.

Anmerkung: Auf Verfall der Ausgangslösungen achten.