HESSENWASSER

Neue Referenzverfahren
in der Trinkwasseranalytik für *Escherichia coli*, coliforme Bakterien und *Clostridium perfringens*

Umsetzung in der Praxis und Erfahrungen

Dr. Steffen Schneider
Hessenwasser GmbH & Co. KG
Zentrallabor - Mikrobiologie
Gräfenhäuser Str. 118
64293 Darmstadt
steffen.schneider@hessenwasser.de

HESSENWASSER

Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Warum neue Referenzverfahren?

- Bisher kein **Normverfahren** (nur TrinkwV)
- Probleme mit mCP
  (Produktivität ↓, z. T. starker Einfluss der Membranfilter)
- Methoden im Vergleich: mCP vs. TSC; **Studien** mit unterschiedlichen Ergebnissen, aber TSC überwiegend besser: Produktivität↑, Selektivität↓
  (deckt sich mit bisherigen eigenen Ergebnissen)

Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Werdegang der Norm ISO 14189

- Bearbeitung der TSC - Norm seit dem vorigen Jahrhundert (ISO WD 6461-2: <2000)
- Mehrfacher Neubeginn der Normung (zuletzt durch Österreich)
- ISO 14189:2013-11 (E)
- z. Zt. FprEN ISO 14189:2015 (D) (CEN) (DIN in 2015 mit nationalem Vorwort)
- Mittg. des UBA (3.2.14): TSC und mCP zulässig (bis zur Entscheidung des Verordnungsgebers)

HESSENWASSER

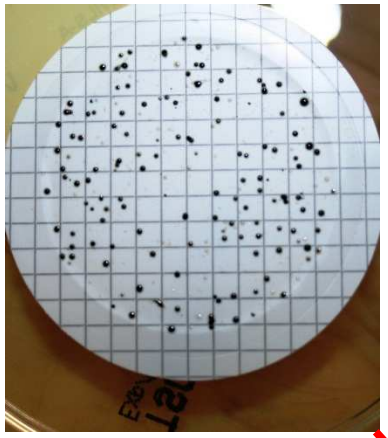
Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Methodenvergleich*

ISO 14189: 2013-11	TrinkwV 2001
Membranfiltration	Membranfiltration
TSC-Agar (Tryptose Sulfite Agar) schwarze, graue, gelb-braun auch schwach gefärbte	mCP-Agar gelbliche Kolonien
44 ± 1 °C	44 ± 1 °C
21 ± 3 Stunden	21 ± 3 Stunden
anaerob	anaerob
D-Cycloserin	D-Cycloserin, PolymyxinB-Sulfat
Bestätigung: Subkultur saure Phosphatase	Bestätigung: Bedampfen (saure Phosphatase)
Gesamtdauer: 2 Tag	Gesamtdauer 1 Tage

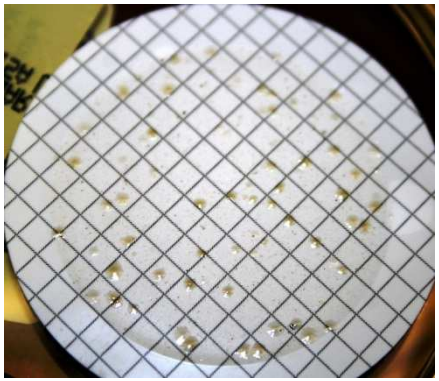
*K. Luden, NLGA Aurich

Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Probleme

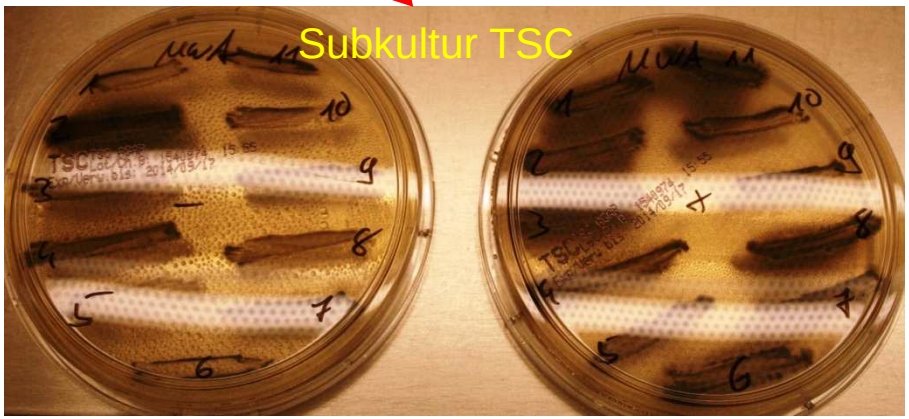
- Qualität der Sulfit-reduktase – Reaktion abhängig von Alter und Lagerung des Mediums
- Positive Primärkultur nicht immer eindeutig
  - „Zu altes“ Medium kaum gefärbte Kolonien
  - „Zu frisches“ Medium teilweise nicht auswertbar:
    - komplette Schwärzung der Membran, dadurch positive Reaktion keiner Kolonie zuzuordnen



„frisches“ Medium



„älteres“ Medium



„negative“ Kolonien (!)

„positive“ Kolonien

HESSENWASSER

Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Probleme

- Dauer bis zu 2 Tage
- Komponente des Nachweisreagenz (Echtblausalz B) ist giftig und kann Krebs erzeugen
- Rezeptur für Reagenz in der Norm falsch (Acetatpuffer mit Wasser auf 100 ml statt 1.000 ml auffüllen!)

mutagen

Membranfiltration von 100 ml Probe auf TSC-Agar (evtl. Verdünnungen der Probe)

Anaerobe Inkubation bei (44 ± 1)°C für **(21 ± 3) Stunden**

Wachstum? — nein → Negativer Befund

ja

Auszählen der **verdächtigen Kolonien:** cremefarbene, gelblich-bräunliche bis schwarze Kolonien

Ausstreichen verdächtiger Kolonien auf **unspezifischem** Agar

Anaerobe Inkubation bei (44±1)°C für **(21±3) Stunden**

Ausstreichen auf mit Nachweisreagenz getränkten Filter

Rotfärbung der Kolonien nach 3-4min

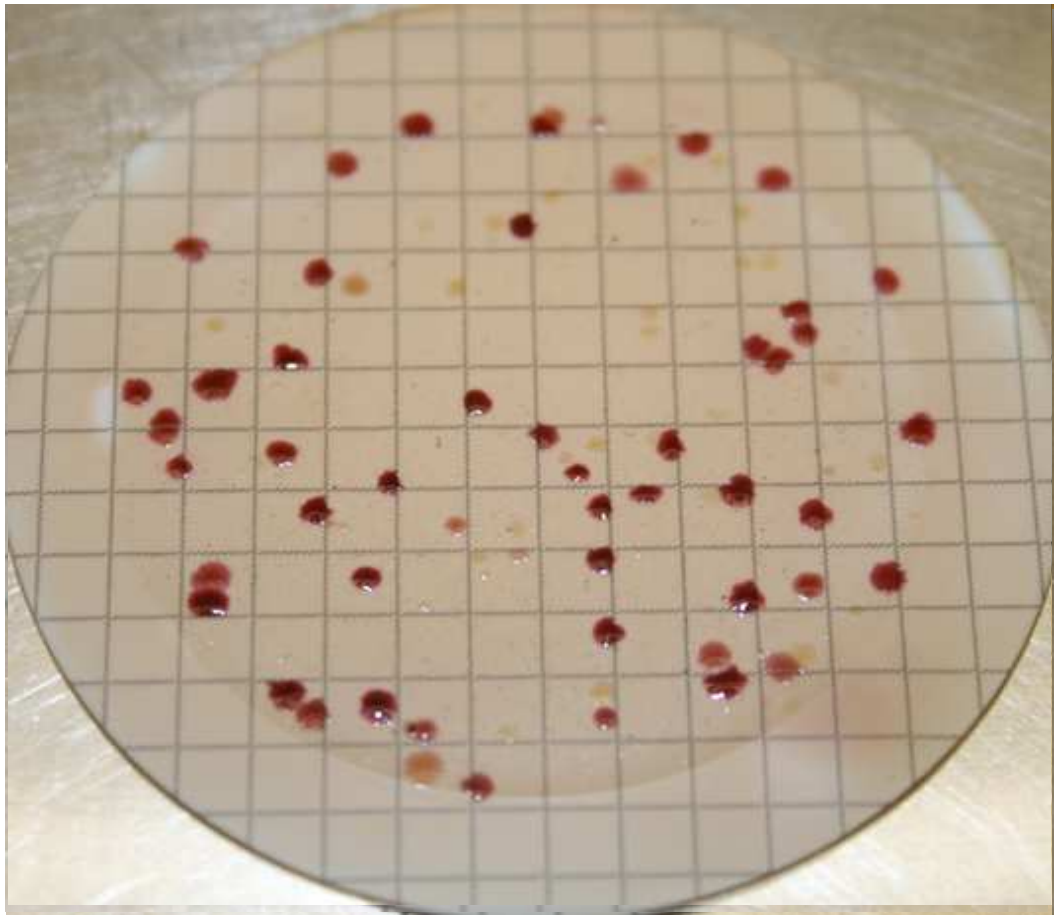
ja → Positiver Befund auf ***C. perfringens*** gemäß ISO 14189

nein → Negativer Befund

HESSENWASSER

Clostridium perfringens mit TSC-Agar
Lösungsmöglichkeiten

- Phosphatasereaktion bei schwach ausgeprägter Sulfitreduktase – Reaktion durch Transfer der Membran auf großen Tropfen Reagenz möglich (im Deckel der Petrischale)
- Dauer ca. 3 min.

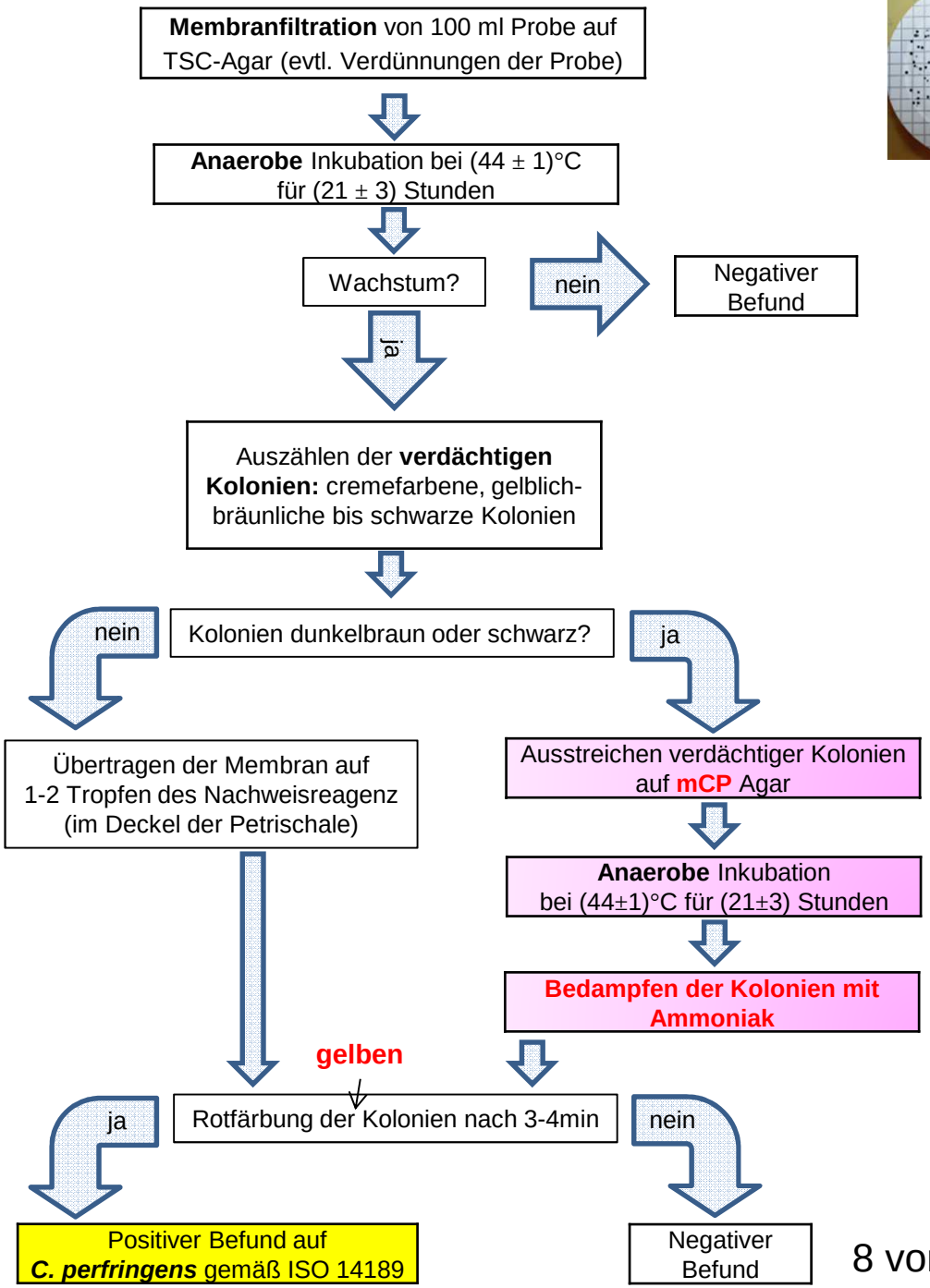


HESSENWASSER

Clostridium perfringens mit TSC-Agar

Lösungsmöglichkeiten

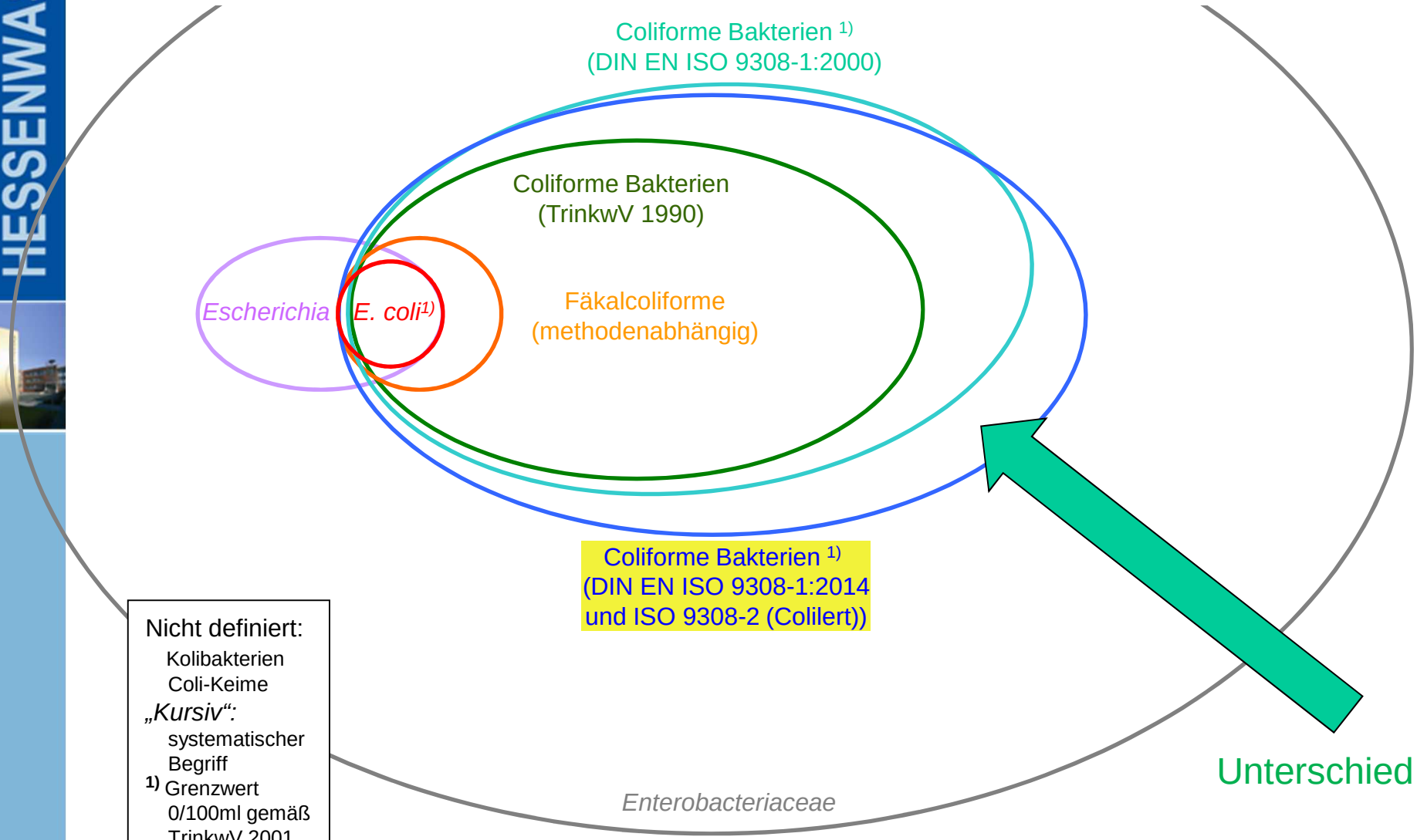
- Alternative Subkultur auf mCP-Agar, dann bedampfen mit Ammoniak
  - Membrantransfer auf mCP-Agar nicht möglich!
- Auf nationales Vorwort der Norm achten



E.coli / **Coliforme** mit CCA-Agar
Warum neue Referenzverfahren?

- Probleme mit TTC
  - Eigentlich 24h Test
  - Eingeschränkter Scope (± saubere Wässer)
  - *E. coli* erst nach 2-3 Tagen
  - *Klebsiella oxytoca* täuscht ggf. *E. coli* vor
  - Widersprüchliche Befunde bei unterschiedlichen Normen → wiss. Definition
- CCA höhere Produktivität ↑

Coliforme Bakterien und *E. coli*



Nicht definiert:
Kolibakterien
Coli-Keime
„Kursiv“:
systematischer Begriff
1) Grenzwert 0/100ml gemäß TrinkwV 2001

Unterschied

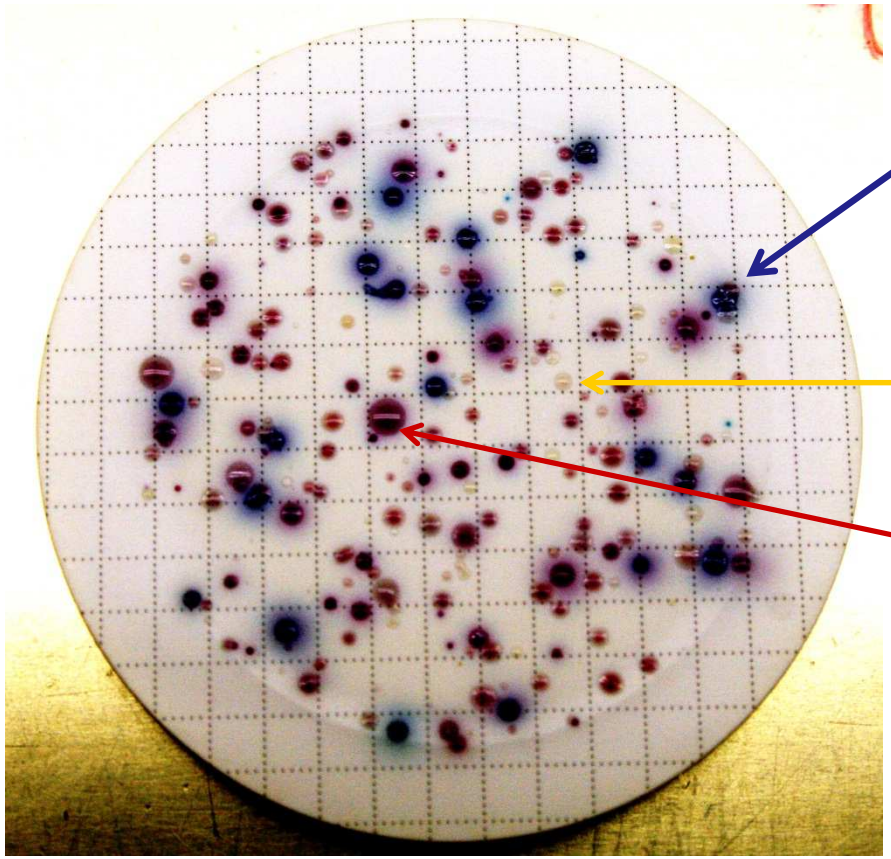
E.coli / **Coliforme** mit CCA-Agar Methodenvergleich*

ISO 9308-1: 2001	ISO ISO 9308-1: 2014-12
Membranfiltration	Membranfiltration
Lactose-TTC Agar Gelbfärbung des Agars	Chromogenic Coliform Agar (CCA) Kolonien pink, rot, blau, violett
Tergitol-7	Tergitol® 15-S-7
Säurebildung aus Laktose	ß-Galaktosidase (Colif.) ß-Glucuronidase (E. coli)
36 ± 2 °C	36 ± 2 °C
21 ± 3 Stunden	21 ± 3 Stunden
Oxidase negativ Indoltest ß-Glucuronidase	Oxidase
Gesamtdauer: 1-3 Tage	Gesamtdauer 1-2 Tag

*K. Luden, NLGA Aurich

HESSENWASSER

E. coli, Coliforme Bakterien und Begleitflora auf CC-Agar (CCA)



E. coli

Begleitflora

Coliforme Bakterien (Verdacht)

HESSENWASSER

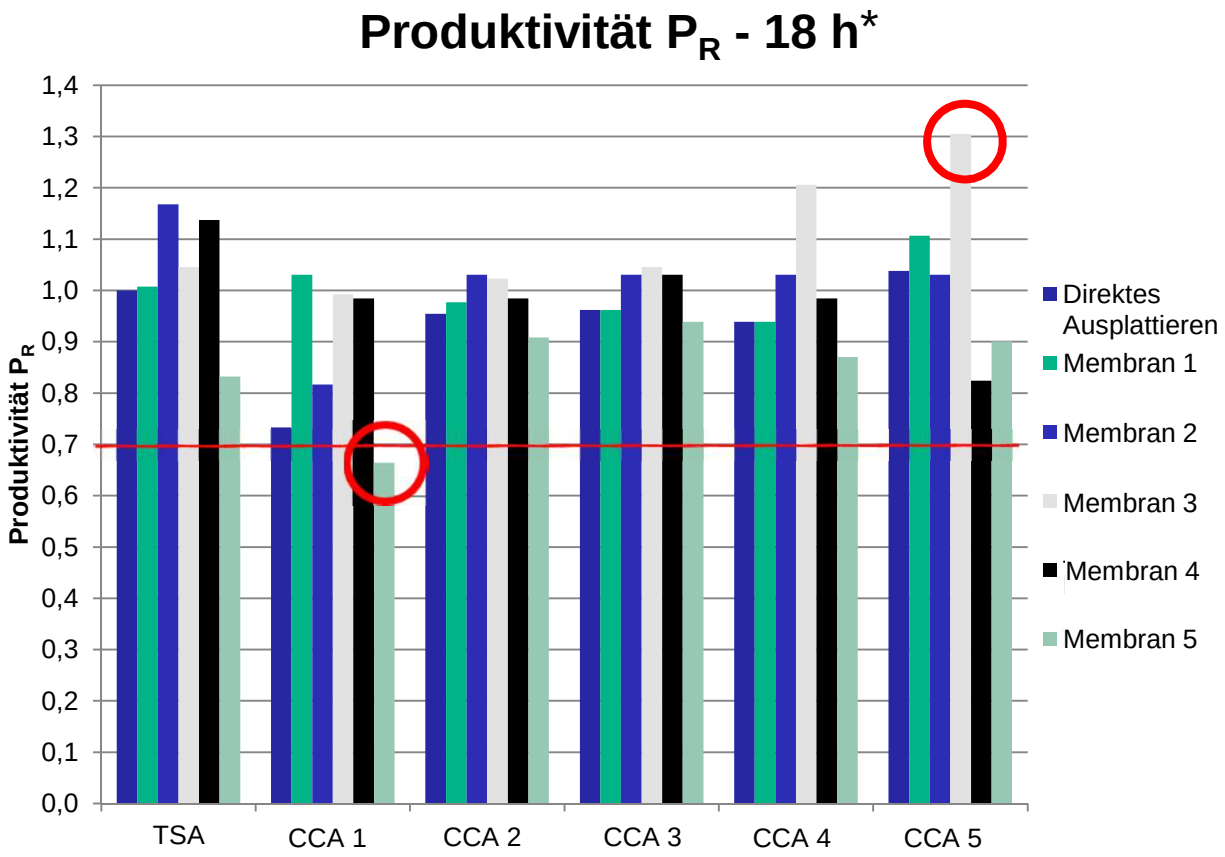
Normen zum Nachweis von *E.coli* und Coliformen in Wasser

Norm (DIN EN) ISO	Methode	seit / bis	Coliforme Bakterien	*E. coli* (zusätzlich)	Dauer
9308-1:2001 (korr. 2009)	Membran-Filtration **TTC** (Trinkw etc.)	**bis 12/2014**	Laktose → Säure, Oxidase (negativ)	Indol bei 44°C, (Glucuronidase)	1-3 d, ***E. coli* 2-3 d**
9308-1:2014	Membran-Filtration **CCA** (Trinkw etc.)	seit 12/2014	Galactosidase, Oxidase (negativ)	Glucuronidase	1-2 d, ***E. coli* 1 d**
9308-2:2012 DIN in Arbeit	MPN (**Colilert**™ 18) (alle Wässer)	ISO seit 07/2012	Galactosidase	Glucuronidase	1 d (18 – 22h)
9308-3	MPN (**Mikrotiter**) (Oberflw. etc.)	seit 07/1999	**-entfällt -**	Glucuronidase	36 – 72 h
9308-4 ISO **in Arbeit**	Membran-Filtration (Oberflw. etc.)	NP seit 01/2015	Galactosidase	Glucuronidase	1 d

E. coli / Coliforme mit CCA-Agar

E. coli ATCC 8739 CCA verschiedener Hersteller

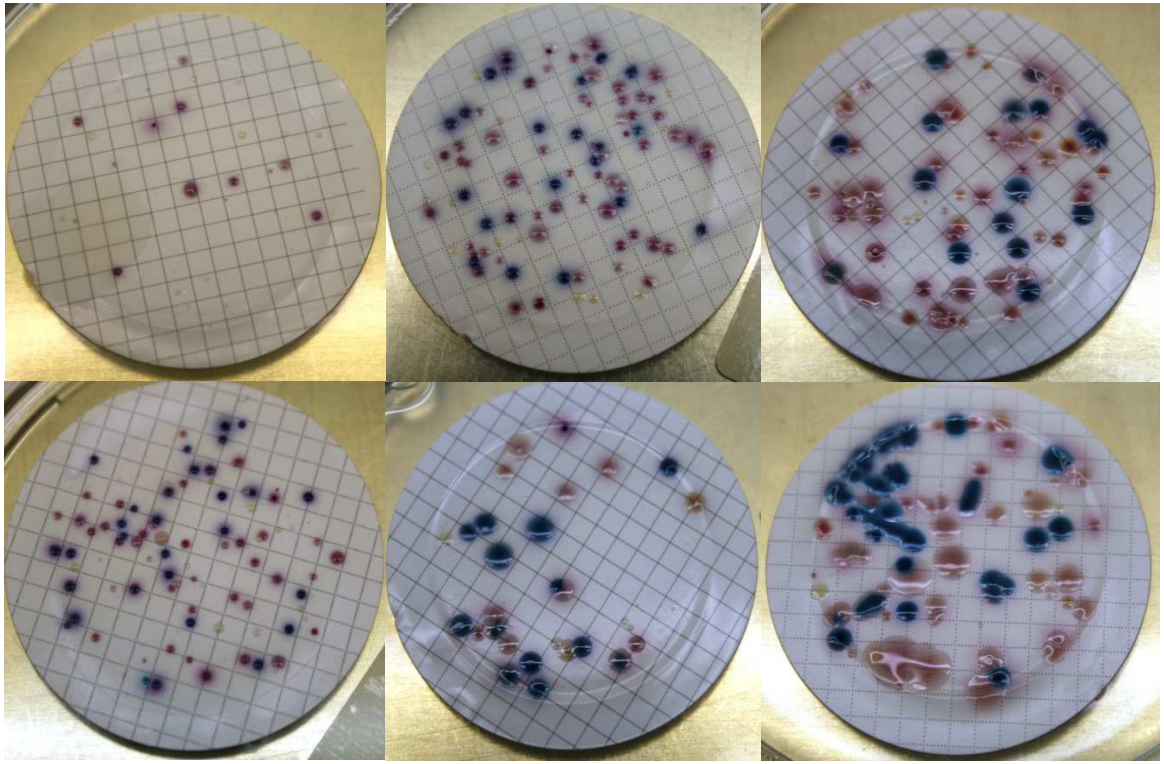
Produktivitätsprüfung nach DIN EN ISO 11133:2015 (Jan, D)



*C. Schuster, FH Rhein-Main

E. coli / Coliforme mit CCA-Agar
Probleme

- Unterschiede in der **Produktivität** bei unterschiedlichen Herstellern von Medien und Membranen
  - Bei Verwendung von **Stammkulturen** ist der Unterschied mäßig (Tabelle)
  - Bei **nativen Proben** kann der Unterschied **erheblich** sein (Bilder)!

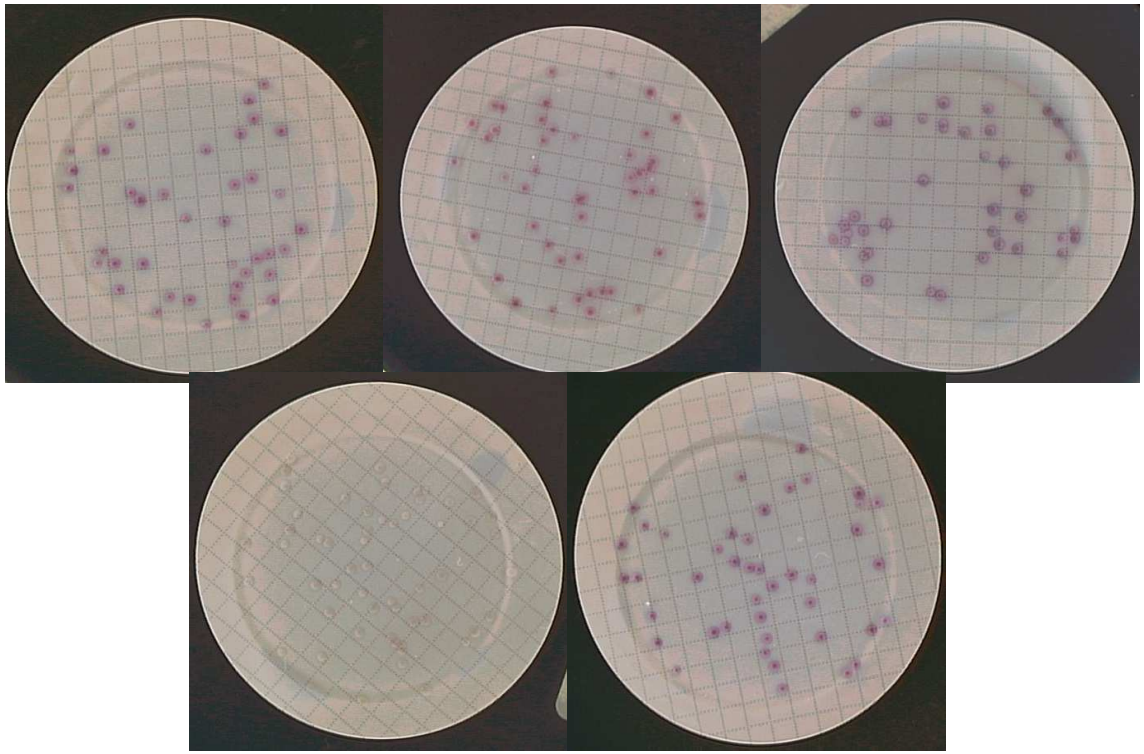


Vergleich Kläranlagenauslauf mit verschiedenen Membran/Nährmedien-Kombinationen

Bilder: C. Schuster, FH Rhein-Main

E. coli / Coliforme mit CCA-Agar
Probleme

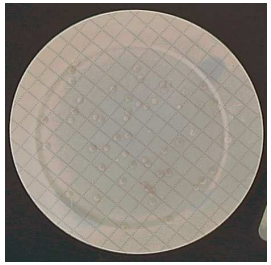
- Unterschiede in der **Ausprägung der Reaktion** bei unterschiedlichen Herstellern von Medien
  - Selbst bei Verwendung von **Stammkulturen** ist der Unterschied deutlich
  - Reaktion tritt je nach Medium **zeitlich versetzt** auf



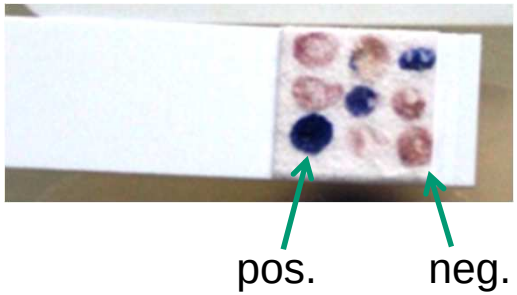
C. freundii ATCC 8090 auf CCA 1 bis CCA 5 mit Membran-Filter Nr. 1 nach 18 h bei 36°C

Bilder: C. Schuster, FH Rhein-Main

E. coli / Coliforme mit CCA-Agar
Probleme



- Galactosidase gelegentlich schwach oder spät
- Falsch-positive Coliforme
  - meist Aeromonaden
  - Oxidase – Testung : ggf. Subkultur notwendig
    (bei kleinen Kolonien)



HESSENWASSER

Neue Referenzverfahren in der Trinkwasseranalytik

Allgemeine Probleme

- **Wann** sind die Verfahren einzuführen?
  - **UBA** (03.02.2014): Parallel bis zu Entscheidung des Verordnungsgebers
    - Revision der Anhänge der **EU TWRL**
    - **DAkkS:** Konformitäts- und Kompetenzprüfung
- **Akkreditierung** der neuen Verfahren?
  - Begutachtung, schriftliches Verfahren oder Flexibilisierung
- Anwendung der **DIN EN ISO 11133** (Medienkontrolle)
  - Seit Januar 2015 in Kraft
  - Prinzipiell für alle (!) Verfahren anzuwenden
  - Beschluss-Entwurf der DAkkS (→ Wenn [akkreditierte] Hersteller quantitativ prüfen, nur qualitative Prüfung notwendig)

Schlussfolgerungen

- Neue Methoden zügig einführen (Sekundär-Validieren, SOP, **Ringversuch**)
- Auswahl geeigneter Medien und Membranfilter in Kombination (Hersteller!)
  - Normative Vorgaben zur Produktivität beachten!
- Natürliche belastete Proben testen!
- Flexiblen Geltungsbereich der Akkreditierung (Kat. III oder I) anstreben

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!