

METHODEN ZUM NACHWEIS VON COLIFORMEN / E. COLI

Beziehungen zwischen *Enterobacteriaceen*, Coliformen, Fäkalcoliformen und *E. coli*:

Der Familie der *Enterobacteriaceae* werden u.a. folgende pathogene, gelegentlich pathogene und apathogene Stäbchen-Bakterien zugeordnet:

Escherichia
Enterobacter
Klebsiella
Citrobacter

Salmonella
Shigella
Edwardsiella
Hafnia

Erwinia
Serratia
Proteus
Yersinia

Enterobacteriaceen

fakultativ anaerob
gram neg.-Stäbchen
peritrich begeißelt oder unbegeißelt
Katalase pos., Oxidase neg.
Glucose u.a. KH vergärend
gasbildend



Coliforme (Gattung *Escherichia*,
Enterobacter, *Klebsiella* und *Citrobacter*)
Laktose positiv



Fäkalcoliforme (thermotrophe C.
oder präsumptive C.)
Wachstum und Gasbildung bei 45 °C



E. coli

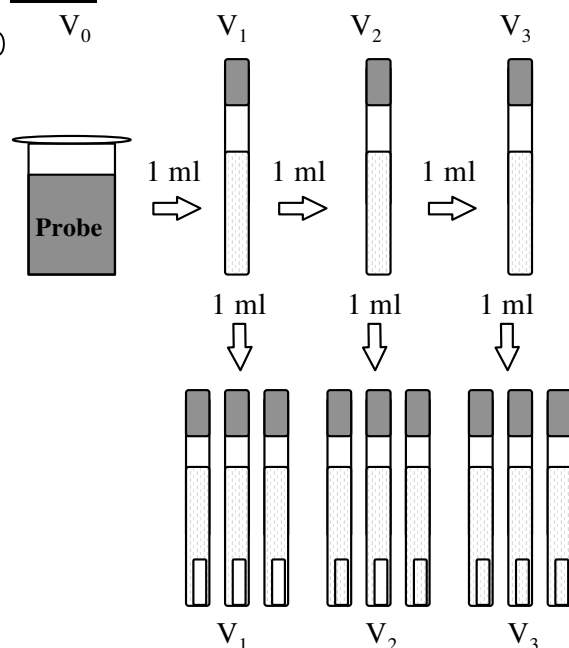
Indol-pos.
Glucuronidase-pos.

Bedeutung der Coliformen Keime:

- technologische Bedeutung bei innerbetrieblichen Untersuchungen und Qualitätskontrollen (Erfolg bei Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen)
- bes. Bedeutung bei allen Produktuntersuchungen (Rekontaminationsflora besteht nicht nur aus Coliformen)
- Schadkeim (z.T. pathogen, Toxinbildner und Bildung von biogenen Aminen oder Fehllochung bei Käse)
- Zur Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit – Hygieneindikator

A) Bestimmung von **coliformen Keimen** in Milch und MilchproduktenKoloniezähltechnik bei 30 °C ohne Wiederbelebung (FIL-IDF 73B:1998 Teil 1)

<u>Nährmedium:</u>	VRBL-Agar (15ml)
<u>Methode:</u>	Plattengussverfahren mit Overlay. Die erstarrten Agarplatten werden mit ca. 4 ml VRB-Agar überschichtet, um anaerobe Bedingungen zu erhalten.
<u>Bebrütung:</u>	24 +/- 2 h bei 30 °C
<u>Auswertung:</u>	10 – 150 Kolonien/Platte, rote Kolonien ($\Phi > 0,5\text{mm}$) mit/ohne rötl. Präzipitathof
<u>Bestätigung:</u>	von jeder Platte werden 5 Kolonien abgeimpft und in BGGL-Bouillon mit Durhamröhrchen (24h bei 30 °C) bestätigt. Gasbildung wird beurteilt.

MPN Technik bei 30 °C ohne Wiederbelebung (FIL-IDF 73B:1998 Teil 2)**1. Tag:**

(Verdünnungsstufe)

Verdünnungsreihe:

je 1 ml Probe bzw. Probenverdünnung in 9 ml Ringerlösung überimpfen.

MPN-Ansatz:je 1 ml der Verdünnung in 3 Eppouvetten mit 10 ml Laurylsulfat Trypton - Bouillon mit Durhamröhrchen überimpfen.Bebrütung: 24 - 48 h ± 2 h, 30 ± 1 °C**2. Tag:**

+++	--+	---
↓	↓	↓
Bestätigung:		
V ₁	V ₂	V ₃

vorläufige Auswertung der **Gasbildung** / Trübung (Beispiel)Mittels Pipette die pos. Eppouvetten (Gasbildung/Trübung) auf BGGL-Bouillon mit Durhamröhrchen überimpfen.Bebrütung: 24 - 48 h ± 2 h, 30 °C**3. Tag:****Auswertung** (Beispiel):

pos. Ergebnisse (**Gasbildung**): +++, --+, ---
 Indexziffer (Stichzahl): 310
 MPN: 4,30
 Keimzahl: $4,3 \times 10^1$ Coliforme/ml

Die Lactosevergärung kann entweder an Hand der Gasbildung in flüssigen oder an Hand der Säurebildung auf festen Nährmedien bestimmt werden. Im Einzelfall können beide Nachweismethoden stark abweichende Ergebnisse liefern. Dies wird immer dann eintreten, wenn der Anteil gasnegativer coliformer Keime in der Flora hoch ist. In der Regel findet man aber durchaus befriedigende Übereinstimmung der beiden Methoden.

Prinzip von chromogenen Nährmedien (MUG, FC)

Glucuronidasenachweis

E. coli besitzt das Enzym Glucuronidase, dieses Enzym spaltet das Substrat 4-Methylumbelliferyl-D-Glucuronid (MUG), Methylumbelliferin (eine fluoreszierende Substanz) wird frei. Es gibt die verschiedensten Medien mit MUG-Zusatz (z.B. FC-BGGL-Bouillon, FC-LMX-Bouillon u.a.).

Zur Absicherung der Ergebnisse wird zusätzlich der Indolnachweis durchgeführt.

Nährmedien, welche MUG enthalten, werden von der Fa. Merck als Fluorocult-Medien bezeichnet.

Epruvetten, die in den Durham-Röhrchen Gasbildung zeigen, weisen auf coliforme Bakterien (Gesamtciforme) hin. Der Nachweis der Anwesenheit von *E. coli* erfolgt mittels Fluoreszenz im UV-Licht. Das Spaltprodukt des spezifischen Enzyms β -D-Glucuronidase-4-Methylumbelliferon fluoresziert bei ca. 366 nm. Die hellblaue Fluoreszenz in der Epruvette zeigt *E. coli* an. Die Fluoreszenz kann noch durch Zugabe von 0,5ml 0,5 M NaOH je Epruvette verstärkt werden. Durch eine positive Indolprobe (kirschrote Verfärbung des KOVACS-Indolreagenz 0,5ml je Epruvette – nach 1min ablesen) wird der Befund bestätigt. Fluoreszierende Epruvetten mit positiver Indolprobe werden als positive Epruvetten angesehen.

B) Bestimmung Coliformen und / oder *E. coli*

Bestimmung von presumptive Coliforme und *E. coli*

MPN Technik bei 30 °C (ISO 11866-1:2005 / IDF 170-1:2005 ersetzt IDF170A:1999 Teil 2)

Anwendung: Milch und Milchprodukte, Pudding, Dessert, Cremes (<100 *E. coli*/g bzw. <10 *E. coli*/ml)

Beimpfung der **FC-Laurylsulfat Trypton Bouillon** (dk und nk) mit Durhamröhrchen

Bebrütung: 24 – 48 ± 2 h bei 30±1 °C,

Auswertung:

Coliforme: Beurteilung der Gasbildung

E. coli : Fluoreszenz bei 366nm und Indolbildung aus Tryptophan

Bestimmung von presumptive *E. coli*

Zähltechnik bei 44 °C mittels Membran (ISO 11866-2:2005 u. IDF 170-2:2005 ersetzt IDF170A:1999 Teil 3)

Anwendung: Milch und Milchprodukte, Pudding, Dessert, Cremes (>100 Coliforme-*E. coli*/g bzw. >10 Coliforme-*E. coli*/ml)

Insbesondere für gefrorene, getrocknete Produkte und Produkte, die Kälte oder Hitze oder Chemikalien besonders ausgesetzt waren, so dass eine Wiederbelebung der *E. coli* notwendig ist

;

Wiederbelebung: auf vorgetrocknete Glutamat-Agar Platten werden Celluloseacetat-Membranen (0,45µm Φ 85mm) luftblasenfrei aufgebracht, ev. mit Spatel glattstreichen;

von der jeweiligen Verdünnung dann je 1ml auf die Membran auftragen und mit einem Spatel verteilen;

die Petrischalen mit der Membran nach oben 15min bei Raumtemperatur stehen lassen und anschließend für 4h bei 37± 1 °C bebrüten;

Selektivmedium: die bebrüteten Membranen werden auf vorgetrocknete Trypton-Bile-Agar Platten überführt, keine Spatel mehr verwenden!!

Bebrütung: 18 – 24 ± 2 h bei 44 ± 0,5 °C mit Membran nach oben, max. 3 Petrischalen übereinander;

Auswertung: überschichten mit 2ml Indolreagenz und nach 5min auswerten

E. coli → pinke Kolonien (ev. 30min unter das UV Licht)

10-150 Kolonien pro Platte

Gemeinsame Bestimmung von Coliformen Keimen und *E. coli* mit chromogenen Substraten

Koloniezähltechnik mit Chromocult® Coliformen Agar

Unter **Gesamtcoliformen** (Coliforme) wird die Anzahl der koloniebildenden Einheiten verstanden, die auf Chromocult® Coliformen Agar bei einer Bebrütung für 24 h bei 35-37 °C **rosarote Kolonien** (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) und **dunkelblau-violette** Kolonien (*E. coli*) bilden.

Andere Enterobacteriaceae und gramnegative Keime bilden **farblose** Kolonien (*Shigellen*, *Proteus*, *Salmonellen*, etc.). Eine Ausnahme bilden einige Stämme, die β -D-Glucuronidase-Aktivität besitzen. Glucuronidase(+) Lactose(-) Keime bilden **hellblau-türkise** Kolonien (einige *Shigellen* und *Salmonellen*, einige *Yersinien*, lactose-negative *E. coli*).

Der simultane Nachweis von Coliformen (Gesamtcoliformen) und *E. coli* wird durch die Kombination von zwei chromogenen Substraten möglich. Das Substrat Salmon-GAL wird durch die für Coliforme charakteristische β -D-Galaktosidase gespalten und bewirkt eine rosarote Färbung der Coliformen-Kolonien. Der Nachweis der für *E. coli* charakteristischen β -D-Glucuronidase erfolgt über das Substrat X-Glucuronid, das eine Blaufärbung der positiven Kolonien bewirkt. Da die *E. coli*-Kolonien sowohl Salmon-GAL als auch X-Glucuronid spalten, färben sie sich dunkelblau-violett und sind somit leicht von den übrigen Coliformen, die rosarot erscheinen, zu differenzieren.

Zur Bestätigung des *E. coli*-Nachweises können die dunkelblau-violett gefärbten Kolonien mit KOVACS-Indolreagenz überschichtet werden. Eine kirschrote Verfärbung des Reagenzes nach wenigen Sekunden zeigt die Indolbildung an.

Anwendung: Wasser und Lebensmittel allgemein

Methode zum Nachweis von Coliformen und *E. coli* mittels MPN Technik

MPN Technik mit FC-LMX-Bouillon (LM; Wasser)

Bebrütung: 24-(48)h bei 37 °C

Auswertung: Verfärbung der Bouillon von gelb auf blau → Gesamtcoliforme
Fluoreszenz bei 366nm
Positive Indolprobe → *E. coli*

MPN Technik mit FCBGGL-Bouillon (LM; Wasser, FM)

Bebrütung: 24-(48)h bei 35 °C, *E. coli* ev.auch 44 °C

Auswertung: Gasbildung → Gesamtcoliforme
Fluoreszenz bei 366nm
Positive Indolprobe → *E. coli*

C) Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung von coliformen Keimen und/oder *E. coli* mit festen Nährmedien – Plattengussverfahren

Siehe Nährmedienhandbücher

VRBD-Agar:

Selektivagar zur Isolierung und Keimzahlbestimmung sämtlicher *Enterobacteriaceae*n in Lebensmittel
AW: rote Kolonien mit rötl. Präzipitathof
Bebrütung: 16-18h bei 37°C

VRB-Agar:

Selektivagar zur Keimzahlbestimmung Coliformer Keime in Wasser, Milch, Speiseeis, Fleisch u.a. Lebensmittel
AW: rote Kolonien mit rötl. Präzipitathof
Bebrütung: 24+/-2h bei 30+/-1°C

Endo-Agar:

Nachweis und Isolierung fäkaler *E. coli* und Coliformer Keime in verschiedenen Materialien, Standard für Wasser und Abfallwasser
AW: rote Kolonien → Lactose pos.
Rote Kolonien mit Metallglanz → *E. coli*
Bebrütung: 24h bei 37°C

FC-VRB-Agar:

Gleichzeitiger Nachweis von Coliformen und *E. coli*;
AW: rote Kolonien → Coliforme
Rote Kolonien und Fluoreszenz im UV-Licht → *E. coli*
Bebrütung: 18-24h bei 37°C

Coli-ID-Agar:

Gleichzeitiger Nachweis von Gesamtciliformen und *E. coli* in Lebensmittel
AW: blau-graue Kolonien → Coliforme
Rosa-violette Kolonien → *E. coli*
Farblose Kolonien → andere *Enterobacteriaceae*n
Bebrütung: 24-48h bei 35-37°C

ECD-Agar:

Direkter Nachweis von *E. coli*; Membranfilterverfahren
AW: Kolonien und Fluoreszenz im UV-Licht und Indol positiver Reaktion → *E. coli*
Bebrütung: 18-24h bei 44°C