

**BIO-RAD**

**MUG/EC VERFAHREN** 355 3782  
355 3785

---

**MINIATURVERFAHREN ZUR ZÄHLUNG  
VON *Escherichia coli* IN OBERFLÄCHENWASSER  
UND ABWASSER**

---

## 1 - BEDEUTUNG DER MIKROTITERPLATTE FÜR *E.coli*

Seit 1975 ist in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union die Qualitätskontrolle für das Baden in Meer- oder Süßwasser durch eine Richtlinie des Europarates vorgeschrieben. Zur Vorbeugung von Gesundheitsrisiken im Zusammenhang mit dem Baden werden in dieser Richtlinie Grenzwerte für die Fäkalienindikatoren festgelegt.

In dieser Richtlinie werden zwei allgemeine Verfahren zur Zählung der Fäkalienindikatoren genannt.

Das erste Verfahren besteht in der Beimpfung von Röhrrchen mit Nährlösung durch unterschiedliche Mengen zu untersuchenden Wassers. Anhand von Statistiktabelle kann aus der Anzahl (MPN\*) der positiven Röhrrchen die größte wahrscheinliche Anzahl der in 100 ml Wasser enthaltenen Keime berechnet werden.

Im zweiten Verfahren werden nach dem Filtern des zu untersuchenden Wassers durch eine Membran mit einer Durchlässigkeit von 0,45 µm die Kolonien auf festen Nährböden ausgezählt. Es wird davon ausgegangen, daß jede Kolonie aus einem einzigen Keim entstanden ist, so daß die Anzahl der vorhandenen Kolonien der ursprünglichen Anzahl an Bakterien gleichgesetzt wird.

Unter den Keimen, die eine fäkale Kontamination anzeigen, kommt *E.coli* eine besondere Bedeutung zu, da es ausschließlich in der Darmflora vorkommt.

Die Mikrotiterplatte für *E.coli* stellt einen Fortschritt im Vergleich zu den klassischen Verfahren da (Miniaturisierung, Genauigkeit, Präzision, Zeitersparnis).

Diese Methode ist NF EN ISO 9308-3 standardisiert (10).

\* (*Most Probable Number*)

## 2 - VERFAHRENSPRINZIP

Das Verfahren basiert auf dem Nachweis eines bei *E.coli* vorhandenen Enzyms, das als Trockensubstrat in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten enthalten ist.

In Gegenwart des Enzyms setzt das Substrat eine fluoreszierende Substanz frei, die bei ultraviolettem Licht erkennbar wird.

Nach der Auswertung und je nach Anzahl der fluoreszierenden Vertiefungen ermöglicht eine statistische Analyse auf der Grundlage der Poisson-Verteilung die Bestimmung der in der Probe enthaltenen *E.coli*.

Bei dem ermittelten Enzym handelt es sich um die  $\beta$ -Glucuronidase, die in ca. 95 % der *E.coli* (5) (8), 50 % der Shigellen, 30 % der Salmonellen (9) und einigen *Yersinia enterocolitica* (11) vorhanden ist. Diese Enzymaktivität wird nicht bei anderen *Enterobacteriaceae* beobachtet.

Bei dem Trockensubstrat in den 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte handelt es sich um MUG (4-Methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid).

Das Trockensubstrat wird mit Verdünnungen des zu untersuchenden Wassers rekonstituiert.

Da es sich um einen Elektivnährboden handelt und die MUG (+) der Shigellen und Salmonellen in Oberflächenwasser im Vergleich zu *E.coli* nur in verschwindend kleiner Zahl vorliegen, kann die Konzentration an Bakterien-MUG (+) auf *E.coli* zurückgeführt werden. Daher genügt eine Mikrotiterplatte für die Zählung in je einer Probe des zu untersuchenden Wassers.

### **3 - INHALT DES KITS**

- 25 einzelverpackte, gebrauchsfertige Mikrotiterplatten
- 28 Abdeckfolien
- eine Gebrauchsanweisung mit einer Statistiktabelle (2 Verdünnungen) auf der Grundlage der Poisson-Verteilung zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Anzahl der Bakterien in 100 ml Wasser.

*Die statistischen Tabellen 4 und 6 "Verdünnungen" sind auf Anfrage erhältlich.*

### **4 - AUFBEWAHRUNG**

Die Mikrotiterplatten müssen bei +2°C bis +8°C aufbewahrt werden und sind bis zu dem auf den Kits angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **5 - ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES MATERIAL**

- Spezialverdünner für Mikrotiterplatten (**S.M.D.**)

Dieser Verdünner ist unbedingt erforderlich für die

- 1:2 Verdünnung von Süßwasserproben bzw.
- Anderen Verdünnungen von Süß- und Meerwasserproben.

Unbedingt spezialverdünnungspuffer für Mikrotiterplatten verwenden (Art.Nr. 53784).

- Röhrcchen mit 9 ml steriles aqua dest.
- Röhrcchen mit 9 ml des sterilen SMD.

- Pipetten für 10 ml
- Pipetten für 1 ml
- Mehrkanal (8er) - Pipetten für 200 µl
- Sterile Pipettenspitzen
- Ständer
- Sterile Petrischalen
- Brutschrank (44°C)
- UV-Lampe 366 nm (ggf. in einem Lichtkasten mit einem Ausschnitt von ca. 12 x 8 cm) zum Ablesen der Mikrotiterplatten
- Bunsenbrenner
- Tragbares Refraktometer (wenn eine Salzgehaltsbestimmung notwendig ist)

## 6 - VORBEREITUNG DER PROBEN

### 6.1 Wahl der geeigneten Probenverdünnung

Die gewählte Probenverdünnung orientiert sich an dem auf Grund der Probenherkunft zu erwartenden Verunreinigungsgrad :

ART DER PROBE	VERDÜNNUNGS-ZAHL	ANZAHL VERTIEFUNGEN/ VERDÜNNUNG	MEßBEREICH Bakterien/100 ml
Badewässer	<b>2</b>	64 für Vert. 1/2 32 für Vert. 1/20	<b>15 to 3,5 x 10<sup>4</sup></b>
Oberflächen- wasser	<b>4</b>	24 für Vert. 1/2 24 für Vert. 1/20 24 für Vert. 1/200 24 für Vert. 1/2 000	<b>40 to 3,2 x 10<sup>6</sup></b>
Abwasser/ Kläranlage	<b>6</b>	16 für Vert. 1/2 bis 16 für Vert. 1/200 000	<b>60 to 6,7 x 10<sup>8</sup></b>

### 6.2 PROBENVORBEREITUNG

#### Süß- und Brackwasser (Salzgehalt < 30 g/Kg)

- In einem Reagenzglasständer für die gewählten Verdünnungen erforderliche Anzahl von Röhrchen mit 9 ml des steriles SMD vorbereiten.

- Das Behältniss mit der zu untersuchenden Wasserprobe wird zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien gut aufgeschüttelt. Sofort anschließend werden mit einer sterilen Pipette 9 ml der Probe entnommen in das erste Röhrchen pipettiert (Verd. 1:2).
- Mit einer neuen, sterilen Pipette wird 1 ml von dieser Verdünnung gut durchmischt in das zweite Röhrchen pipettiert (Verd. 1:20).
- Ausgehend von diesem Röhrchen (Verd. 1:20) werden, in gleicher Weise, die nächstfolgende Verdünnung (1:200) and alle weiteren Verdünnungen hergestellt.

### **Meereswasser (Salzgehalt $\geq 30$ g/Kg)**

- In einem Reagenzglasständer für die gewählten Verdünnungen erforderliche Anzahl von sterilen Röhrchen vorbereiten.
- In das erste Röhrchen werden 9 ml steriles aqua dest. und in die übrigen Röhrchen 9 ml des sterilen SMD pipettiert.
- Das Behältniss mit der zu untersuchenden Wasserprobe wird zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien gut aufgeschüttelt. Sofort anschließend werden mit einer sterilen Pipette 9 ml der Probe entnommen in das erste Röhrchen (mit 9 ml steriles aqua dest.) pipettiert (Verd. 1:2).
- Mit einer neuen, sterilen Pipette wird 1 ml von dieser Verdünnung gut durchmischt in das zweite Röhrchen pipettiert (Verd. 1:20).
- Ausgehend von diesem Röhrchen (Verd. 1:20) werden, in gleicher Weise, die nächstfolgende Verdünnung (1:200) and alle weiteren Verdünnungen hergestellt.

## **7 - HINWEISE**

Es empfiehlt sich :

- die einzelnen Arbeitsgänge unter sterilen Bedingungen durchzuführen
- Kontaminationen benachbarter Vertiefung durch Überlaufen zu vermeiden.

## **8 - VORBEREITUNG DER MIKROTITERPLATTE**

Die Mikrotiterplatten sind steril und gebrauchsfertig. Auf diese Weise erübrigt sich die Vorbereitung sowie die Sterilisation des Nährbodens. Die Mikrotiterplatten können sofort nach dem Herausnehmen aus dem Kühlschrank beimpft werden.

## 9 - BEIMPFFEN DER MIKROTITERPLATTE

- Inhalt des ersten Verdünnungsröhrchens in eine sterile Petrischale geben. Mit einer Mehrkanal (8er)-Pipette mit sterilen Spitzen, 200 µl des Ansatzes in alle für die erste Verdünnung reservierten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren (1:2).
- Für jede weitere Verdünnung (1:20, 1:200...etc.) wird genauso verfahren, wobei jeweils eine neue sterile Petrischale sowie neue (sterile) Pipettenspitzen zu verwenden sind.

## 10- INKUBATION

Nach der Beimpfung werden die Mikrotiterplatten mit die dafür vorgesehenen Folien abgedeckt und mindestens 36 h bei 44°C inkubiert.

## 11- ABLESEN DER ERGEBNISSE

Vertiefungen, in denen nach Inkubation bei 44°C ein Wachstum erkennbar ist (Belag am Boden der Vertiefungen) und die unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) blau fluoreszieren, gelten als positiv (d.h., es sind *E.coli* in der Probe).

Da die Fluoreszenz sich nicht verändert, können die Platten auch zu einem späteren Zeitpunkt (als nach 36 Std.) abgelesen werden.

## 12 - BERECHNUNG DER GRÖßTEN WAHRSCHEINLICHEN ANZAHL

Die mitgelieferte Statistiktabelle ermöglicht die Bestimmung der größten wahrscheinlichen Anzahl mit einem Vertrauensbereich von 95%.

MPN : Wahrscheinlichste Anzahl

UG : Unterer Grenzwert des Vertrauensbereiches

OG : Oberer Grenzwert des Vertrauensbereiches

### **Bestimmung die "Charakteristische Zahl" (CZ)**

Für jede Verdünnung wird die Zahl der positiven Vertiefungen notiert. Wenn mehr als drei Verdünnungen angelegt wurden, erhält man eine charakteristische, dreistellige Zahl, die nach Möglichkeit auf 0 oder aber auf der kleinsten, in den Verdünnungsstufen ermittelten Zahl enden sollte.

### Beispiel 1 : Badewässer

1:2                    32 positive von 64

1:20                   5 positive von 32

**Daraus ergibt sich als Charakteristische Zahl : 32/5**

*Verwendung der Statistiktabelle (2 Verdünnungen)*

Für das Beispiel :  $CZ = 32/5 \Rightarrow MPN = 756 E.coli/100 ml$

[ UG = 542 ; OG = 1054 ]

### Beispiel 2 : Oberflächenwasser

1:2                    24 positive von 24

1:20                   18 positive von 24

1:200                   5 positive von 24

1:2 000                1 positive von 24

**CZ : 18/5/1**

*Verwendung der Statistiktabelle (4 Verdünnungen)*

Für das Beispiel :  $CZ = 18/5/1 \Rightarrow MPN = 15908 E.coli/100 ml$

[ UG = 10199 ; OG = 24811 ]

### Beispiel 3 : Abwässer

1:2                    16 positive von 16

1:20                   16 positive von 16

1:200                   12 positive von 16

1:2 000                5 positive von 16

1:20 000               0 positive von 16

1:200 000             0 positive von 16

**CZ : 12/5/0**

*Verwendung der Statistiktabelle (6 Verdünnungen)*

Für das Beispiel :  $CZ = 12/5/0 \Rightarrow MPN = 172461 E.coli/100 ml$

[ UG = 100398 ; OG = 296250 ]

Sollte keine bzw. nur eine Vertiefung der Verdünnungsreihen positiv geworden sein, wird als Ergebnis  $< n/100 ml$  angegeben.

## 13 - LITERATUR

1. CABELLI V.J. (1983)  
Health effects criteria for marine recreational waters.  
E.P.A. rept 600/1-80-031. E.P.A., Cincinnati
2. Conseil des Communautés Européennes  
Directives du 8 Décembre 1975 concernant la qualité des eaux de baignade. (J.O. des CE, 5-2-76)
3. DE MAN J.C. (1975)  
The probability of most probable numbers.  
Europ. J. appl. Microbiol., **1**, 67-78
4. DUFOUR A.P. (1984)  
Health effects criteria for fresh recreational waters.  
E.P.A. rept. 60/1, 84-004. E.P.A., Washington D-C
5. FENG P.C.S. and HARTMAN P.A. (1982)  
Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*.  
Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1320-1329
6. HERNANDEZ J.F, GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C.,  
CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. and SINEGRE F. (1991)  
Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E.coli* and enterococci in marine water.  
Wat. Sci. Tech. Vol. **24**, N° 2, 137-141
7. HERNANDEZ J.F, GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C.,  
CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. and SINEGRE F. (1993)  
Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide.  
Wat. Res. Vol. **25**, N° 9, 1073-1078
8. KILIAN M. and BULOW P. (1976)  
Rapid Diagnosis of *Enterobacteriaceae*, I. Detection of bacterial glycosidases.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect., **B.84**, 245-251
9. LE MINOR L. (1979)  
Tetrathionate reductase,  $\beta$ -glucuronidase and ONPG-test in the genus *Salmonella*  
Zentralb. Bakteriologie Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. Reihe A **243**, 321-325

10. NF EN ISO 9308-3 (März 1999)

Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* in Oberflächenwasser und Abwasser - Teil 3 : Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN - Verfahren).

11. ROBINSON B.J. (1984)

Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. Appl. Environ. Microbiol. **48** : 285-288

