



***Bepaling van totaal coliformen en E.coli***



**INHOUD**

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGEBIED</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b> .....	<b>3</b>
2.1	MEMBRAANFILTRATIE.....	3
2.2	MPN MICROTITERPLAAT METHODE.....	4
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b> .....	<b>4</b>
4.1	APPARATUUR.....	4
4.2	MATERIAAL.....	4
<b>5</b>	<b>REAGENTIA EN BEREIDINGEN</b> .....	<b>5</b>
5.1	REAGENTIA.....	5
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b> .....	<b>5</b>
6.1	MONSTERVERBEREIDING.....	5
6.2	ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE.....	5
6.3	BEVESTIGINGSTESTEN.....	6
6.4	MPN MICROTITERPLAAT METHODE.....	7
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b> .....	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>RAPPORTERING</b> .....	<b>7</b>
<b>9</b>	<b>REFERENTIES</b> .....	<b>7</b>

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

De procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van drinkwater, mineraal water enerzijds en grondwater, oppervlaktewater, recreatiewater, en afvalwater anderzijds. Bepaling van de parameters in water:

totale coliformen en *E.coli* via membraanfiltratie op Tergitol-7 agar (ISO 9308-1) voor drinkwater en water bestemd voor menselijke consumptie

*E.coli* via de microtiter / MPN methode (ISO 9308-3) voor oppervlakte- en afvalwater, in het bijzonder deze met veel gesuspendeerd materiaal.

Een aangewende analysemethode dient conform de normmethode te zijn. Het meetprincipe mag niet anders zijn, en het isolatiemedium moet hetzelfde zijn. Afwijkingen mogen niet kritisch zijn en geen invloed hebben op een resultaat. Extra stappen zijn aanvaardbaar, zolang ze het resultaat enkel meer ondersteunen.

Totale coliformen worden in het kader van de methode voor drinkwater gedefinieerd als organismen die oxidase-negatief zijn, zuur uit lactose produceren, en op Tergitol-7 agar gele-oranje kolonies geven van verschillende vormen en groottes op een membraanfilter na incubatie van 18-24 u bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Coliformen behoren tot genera en species binnen de familie van *Enterobacteriaceae*, zijn in staat om te groeien bij  $36^\circ\text{C}$  en bezitten  $\beta$ -galactosidase. In deze definitie zijn aërobe of facultatief anaërobe stammen inbegrepen (oa stammen die geen gas produceren).

Isolaten die zuur uit lactose produceren en geel-oranje kolonies vormen na incubatie van 18-24 uur bij  $36^\circ\text{C}$ , indol produceren uit tryptofaan na incubatie van 18-24 uur bij  $44^\circ\text{C}$  worden als *E. coli* beschouwd. *E. coli* hoort tot de totale coliformen.

Ze kunnen eveneens  $\beta$ -glucuronidase produceren. De meeste stammen *E. coli* brengen dit tot uitdrukking evenals sommige stammen *Shigella* en *Salmonella*. Op die basis gebeurt de telling via de microtiter / MPN methode:  $\beta$ -D-glucuronidase-positieve micro-organismen groeien in een specifiek medium dat 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) bevat, bij een incubatietemperatuur van  $44^\circ\text{C}$ .

Theoretisch kan respectievelijk de aanwezigheid van 1 kolonievormende eenheid per 100 ml bepaald worden met de filtratietechniek, en 2 kve per 100 ml voor de MPN techniek. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

## 2 PRINCIPE

### 2.1 Membraanfiltratie

Organismen uit een monster worden geïsoleerd op een  $0,45\mu\text{m}$  membraanfilter, dat op een Tergitol-7 agarplaat wordt aangebracht en geïncubeerd gedurende 18-24 uur bij  $36^\circ\text{C}$ . De Tergitol-7 onderdrukt de groei van Gram-positieve bacteriën. In het medium zijn lactose en broomthymolblauw aanwezig; coliformen fermenteren lactose en de zure pH geeft de gele-oranje verkleuring.

Isolatie van de kolonies wordt vervolgd door bevestigingstesten. Voor de bevestiging van coliformen en *E.coli* worden 10 verdachte kolonies op oxidase en indol productie getest, door respectievelijk TSA of nutriënt agar en tryptofaan bouillon te incuberen bij  $36^\circ\text{C}$ . De bevestiging van de coliformen wordt uitgevoerd aan de hand van een oxidase kit. De bevestiging van *E.coli* met indolvorming uit tryptofaan wordt rechtstreeks getest door toevoegen van Kovacs' reagens.

Het aantal kve totale coliformen en *E.coli* worden per 100 ml bepaald.

## 2.2 MPN microtiterplaat methode

Het verdund monster wordt geïnoculeerd in alle rijen cups van een microtiterplaat dat gedroogd medium bevat. De microtiter platen worden onderzocht onder UV van 366 nm na 36 uur en 72 uur bij 44°C. De aanwezigheid van *E.coli* wordt aangeduid met blauwe fluorescentie door hydrolyse van MUG. De resultaten worden weergegeven als MPN waarde per 100ml.

## 3 OPMERKINGEN

Alle manipulaties -behalve het filtreren zelf - worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (4.1.9).

De besmette vaste afval (petriplaten, doekjes, pipettips...) worden in een speciale daartoe bestemde container verwijderd. Na het waarnemen van de resultaten worden de resterende monsters en suspensies verwijderd als vloeibare bacterie-afval.

Glaswerk dat gecontamineerd is met klasse twee bacteriën wordt vóór de afwas eerst geautoclaveerd (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium<sup>38</sup> (5.1.7) en nadien met 70% ethanol (5.1.8).

Vóór het enten van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een veiligheidskabinet (4.1.9) **of in een droogstoof**. Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

## 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

### 4.1 Apparatuur

- 4.1.1 Autoclaaf 121 ± 3°C
- 4.1.2 Koelkast 5 ± 3°C
- 4.1.3 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.4 Incubator 44 ± 0,5°C
- 4.1.5 Schudtoestel
- 4.1.6 Vortex
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Pipetus akku
- 4.1.9 Veiligheidskabinet
- 4.1.10 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.11 Membraandispenser met steriele 0,45 µm filters of gelijkwaardig systeem

### 4.2 Materiaal

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Glazen tubes en flessen
- 4.2.3 Wegwerppipetten
- 4.2.4 Entnaald met Pt-öse

## 5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

### 5.1 Reagentia

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing<sup>1</sup>
- 5.1.2 platen Tergitol agar + TTC supplement
- 5.1.3 Tryptofaan bouillon
- 5.1.4 Nutriënt agar of TSA agar
- 5.1.5 Kovacs reagens
- 5.1.6 Oxidase reagens
- 5.1.7 Umonium<sup>38</sup> 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.8 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.9 ultra puur water
- 5.1.10 coliform referentie bacterie

## 6 PROCEDURE

### 6.1 Monstervoorbereiding

Een monster wordt zo snel mogelijk bij aankomst in het laboratorium geanalyseerd, en maximum gedurende 24 uur bewaard bij  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  in een koelkast (4.1.1).

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.5) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Uit voorkennis van een monster wordt -indien nodig- een verdunningsreeks gemaakt. Van een te verdunnen watermonster worden drie opeenvolgende verdunningen geanalyseerd  $10^0$  tot  $10^{-2}$ , of van  $10^{-1}$  tot  $10^{-3}$ .

Aan de hand van wergwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.8) wordt een verdunning uitgevoerd met stappen factor 10:

- in flesjes (4.2.2) gevuld met 450 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) waaraan 50 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.5).
- in flessen (4.2.2) gevuld met 900 ml steriele Ringer 1/40 (voor ringtestmonsters) (5.1.1) waaraan 100 ml van de suspensie van de hoogste verdunning wordt toegevoegd; mengen met de hand of op een schudtoestel (4.1.5).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt. De verdunningen van de monsters dienen dusdanig gekozen te worden dat het aantal te tellen kolonies op een membraan tussen 20 en 80 ligt. De voorkeur wordt gegeven aan de verdunning met een resultaat in deze range.

### 6.2 Analyse via de membraanfiltratie

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.10). Er worden steriele aangekochte kokers met filter gebruikt, of geflambeerde kokers worden aan door middel van een pincet (4.2.1) voorzien van steriele filters van  $0,45 \mu\text{m}$  (4.1.11).

---

<sup>1</sup> Voor een verdunningsreeks van een watermonster aan ten maken mogen naast Ringer 1/40 andere diluenten worden gebruikt zoals vermeld in ISO 8199 (Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture) alsook steriel leidingswater of steriel demiwater.

Van één monster wordt 100 ml (of een kleiner volume: 50 ml, 10 ml) volume gefiltreerd. Wanneer een volume van een monster minder is dan 50 ml, brengt men eerst 20 ml steriele Ringer 1/40 (5.1.1) in de filterkoker vóór het toevoegen van het monster. Dit bevordert de dispersie van de bacteriën over het volledige oppervlak van het membraan gedurende het filtratieproces.

De filter(s) worden aangebracht op een Tergitol schaal (5.1.2) (luchtballen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.3) gedurende  $21 \pm 3$  uur, om het aantal coliformen te bepalen. **Bijkomende filter(s) op een Tergitol schaal (5.1.2) mogen voor de bepaling van *E.coli* geïncubeerd op  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (4.1.4) gedurende  $21 \pm 3$  uur, om de groei van bijkomende flora te onderdrukken.**

Alle kolonies op de Tergitol platen, onafhankelijk van grootte, die geel-oranje kolonies geven worden als presumptieve coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.7); de waarden worden genoteerd.

Indien geen gele kolonies aanwezig zijn, zijn geen coliformen in het monster aanwezig.

### 6.3 Bevestigingstesten

Tien representatieve kolonies op de Tergitol filter worden telkens aan de hand van een geflambeerde entnaald (4.2.4) geënt op TSA of nutriënt agar (5.1.4) voor de oxidase test en in Tryptofaan bouillon (5.1.3) tubes voor de indol productie test. De agar platen worden geïncubeerd bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.3) voor de bepaling van totale coliformen en de tubes worden na vortexen (4.1.6) geïncubeerd bij  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (4.1.4) voor de bepaling van *E.coli*, telkens gedurende  $21 \pm 3$  uur.

#### Indol test:

In deze tubes wordt bevestiging van *E.coli* met indolvorming uit tryptofaan rechtstreeks getest door toevoegen van enkele druppels uit het flesje Kovacs reagens (5.1.5).

Rode kleur aan het oppervlak wijst op aanwezigheid van presumptieve *E.coli*. Deze detectie is voldoende als bewijs voor *E. coli* aanwezigheid.

#### Oxidase test:

De oxidase test wordt uitgevoerd aan de hand van een oxidase-reagens (5.1.6). Een oxidase positieve reactie wordt veroorzaakt door het enzym cytochroom oxidase dat inwerkt op het N,N-dimethyl-p-fenyleendiamine, met de vorming van indofenolblauw. De werkwijze is afhankelijk van de leverancier van de oxidase kit. De test wordt op een goed geïsoleerde kolonie van de agar uitgevoerd en na 30 seconden afgelezen. Indien geen kleurverandering optreedt, leest men nog eens af na 3 minuten.

Coliformen zijn oxidase negatief. Als positieve controle op de oxidase kit wordt een *Pseudomonas* sp. getest, en als negatieve controle op de kit een coliform.

Sommige organismen geïsoleerd uit water vertonen bijna dezelfde eigenschappen omschreven in de definitie van coliformen, en zijn enkel in staat om zuur te produceren uit lactose bij een temperatuur onder  $37^\circ\text{C}$ . *Aeromonas* species, die natuurlijk voorkomen in water, hebben een optimale groeitemperatuur tussen  $30-35^\circ\text{C}$  maar kunnen zuur uit lactose vergisten bij  $36^\circ\text{C}$ . Deze organismen zijn allen te onderscheiden van coliforme bacteriën door een positieve oxidase reactie.

Indien twijfel bestaat over de bevestigingen voor coliformen en *E.coli* wordt een identificatie uitgevoerd aan de hand van een commerciële kit vertrekkende van de reincultuur op een agar plaat (5.1.4). De analyse-verantwoordelijke beslist over de noodzaak voor de identificatie.

## 6.4 MPN microtiterplaat methode

Voor de methode wordt verwezen naar ISO 9308-3 (1998).

## 7 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: wordt getest door filtratie van 100 ml steriel water (5.1.9). Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een coliform referentie bacterie (5.1.10).

De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.

Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet binnen de vooropgestelde waarden valt, of de blanco controle een positief resultaat ( $>1$  kve presumptieve coliformen/100 ml) geeft wordt de proef als niet betrouwbaar beschouwd. De test wordt dan opnieuw uitgevoerd. Dit ook indien onjuiste verdunningen zijn ingezet.

De analyseverantwoordelijke volgt de test op en beslist over de geldigheid van de resultaten.

Validatie van de analysemethode op verschillende matrices: herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid testen.

De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

## 8 RAPPORTERING

- Bepaal aan de hand van het aantal karakteristieke presumptieven en resultaten van de bevestigingstesten de kve totale coliformen en *E.coli* waarden per 100 ml watermonster volgens ISO 8199.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde kolonies (waarde tussen 20-80 kolonies) vermenigvuldigd met de overeenstemmende verdunningsfactor.
- Indien geen kolonies aanwezig zijn op platen geïncubeerd met een onverdund monstermonster, vermeld het resultaat als  $<1$  kve / 100 ml.
- Indien meer dan 80 kolonies op de geïnculeerde platen met de grootste verdunning  $10^{-x}$  voorkomen, vermeld het resultaat als benaderend (geschat aantal  $>80 \cdot 10^x$  kve/ml).

### Rapport

Vermeld in het rapport:

- de identificatie van het monster, en alle gegevens over de monstername
- de verwijzing naar de gebruikte methode
- (incubatietijd en –temperatuur)
- het resultaat
- bijzondere opmerkingen

## 9 REFERENTIES

- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 9308-1 (2000) Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - part 1 : membrane filtration method.

- ISO 9308-1 tech corrigendum 1 (2007) Water quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* -part 1 Membrane filtration method.
- ISO 9308-3 (1998) Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water part 3: miniaturized method by inoculation in a liquid medium.
- ~~ISO 9308-1 (1990) Water quality – Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* – part 1 – Membrane filtration method.~~
- A medium detecting  $\beta$ -glucuronidase for the simultaneous membrane filtration enumeration of *Escherichia coli* and coliforms from drinking water. *Letters in Applied Microbiology*, Sartory, D.P. & Howard, L., 1992, **15**, 273-276.
- Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Feng, P.C.S. & Hartman, P.A., 1982, **43**, 1320-1329.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.