

Bepaling van totale coliformen en E.coli

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
2.1	<i>Membraanfiltratie</i>	3
2.2	<i>Quanti-Tray Colilert methode</i>	4
2.3	<i>MPN microtiterplaat methode</i>	4
2.4	<i>Uitdrukking van de resultaten</i>	4
3	OPMERKINGEN	5
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	5
4.1	<i>Apparatuur</i>	5
4.2	<i>Materiaal</i>	5
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	6
5.1	<i>Reagentia</i>	6
6	PROCEDURE	6
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	6
6.2	<i>Analyse via de membraanfiltratie</i>	7
6.3	<i>QUANTI-TRAY COLILERT methode</i>	8
6.4	<i>MPN microtiterplaat methode</i>	9
6.5	<i>Identificatie van coliformen en E.coli door middel van MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)</i>	9
	KWALITEITSCONTROLE	9
7	RAPPORTERING	9
8	REFERENTIES	10

1 TOEPASSINGSGBIED

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

- De bepaling van de parameters coliformen en E.coli in waters met weinig achtergrondflora dient volledig conform de norm Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014) uitgevoerd te worden. Dus de aangewende chromogene voedingsbodem dient een identieke samenstelling te hebben conform de norm (zie verder § 5.1.2) .
- Enkel indien de te analyseren waters teveel achtergrondflora bevatten dient de ChromoCult® Coliform Agar met het E. coli/Coliform Selectief Supplement ¹ (EU goedgekeurd , Sp.) of de "REBECCA™ CF WATERS" ² (AFNOR gecertificeerd conform het AFNOR protocol, Fr.) of de "Rapid'E.coli 2 Agar for Water Testing" ³ (AFNOR gecertificeerd conform het AFNOR protocol, Fr.) gebruikt te worden. Dit zijn media waaraan een supplement wordt toegevoegd om aanwezig overvloedige interfererende flora te onderdrukken.
- De bepaling van Escherichia coli en totale coliformen kan via MPN methode (ISO 9308-2) uitgevoerd worden, dit voor alle types water.
- Voor oppervlakte- en afvalwater, in het bijzonder deze met veel gesuspendeerd materiaal kan E.coli via de microtiter / MPN methode (ISO 9308-3) uitgevoerd te worden.

Totale coliformen zijn Enterobacteriaceae die β -D-galactosidase (GAL) tot expressie brengen. *Escherichia coli* zijn Enterobacteriaceae die β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase (GLUC) tot expressie brengen.

In de methodes worden media aangewend die 2 chromogene substraten bevatten:

- een substraat dat specifiek is voor GLUC en dat een specifieke kleur veroorzaakt bij de kolonies die positief zijn voor dit enzym
- een substraat dat specifiek is voor GAL en dat een bijkomende specifieke kleur veroorzaakt bij de kolonies die positief zijn voor dit enzym.

Escherichia coli (GAL+/GLUC+) vormt een gecombineerde gekleurde kolonies op chromogene media. Andere coliformen (GAL+/GLUC-) vormen andere contrasterende gekleurde kolonies.

2 PRINCIPE

2.1 MEMBRAANFILTRATIE

De ISO 9308-1 beschrijft een methode voor de telling van *E. coli* en coliformen gebaseerd op membraanfiltratie, groei op een chromogene coliform agarmedium bij 36°C, en de berekening van het aantal doelorganismen in het monster. Door de lage selectiviteit van het agar medium kan

¹ Geproduceerd door Merck

² Geproduceerd door bioMérieux SA

³ Geproduceerd door Bio-Rad Laboratories

achtergrond groei interfereren met de kwantificering van *E. coli* en coliformen, bijvoorbeeld in oppervlaktewater of ondiep water. Deze methode is niet geschikt voor deze soorten water. De methode is bijzonder geschikt voor water met een laag aantal bacteriën tot 100 kolonies op chromogenic coliformen agar (CCA). Sommige *E.coli* stammen die β -D-glucuronidase negatief zijn zoals *Escherichia coli* O157, zullen niet als *E.coli* gedetecteerd worden. Aangezien deze enkel β -D-galactosidase positief zijn, verschijnen ze als coliformen op dit chromogene agar.

Om te voorkomen dat vals positieve resultaten worden veroorzaakt door oxidase positieve bacteriën zoals *Aeromonas spp.*, worden de presumptieve coliformen kolonies bevestigd door een negatieve oxidase reactie.

De membraanfiltratie-methode op ChromoCult® Coliform Agar met het *E. coli*/Coliform Selectief Supplement of REBECCA™ CF waters of op Rapid *E.coli* for water testing gebeurt volgens hetzelfde principe, maar door de aanwezigheid van een selectief supplement in het medium worden de belangrijkste storende flora in het water afgeremd.

2.2 QUANTI-TRAY COLILERT METHODE

Voor analyse van drink-, oppervlakte-, grond(put-), of afvalwater kan voor de detectie van coliformen/ *E.coli* op basis van hetzelfde principe met dezelfde simultane detectie gebaseerd op de enzymatische reacties β -D-glucuronidase (GLUC) en β -D-galactosidase (GAL) via de MPN Quanti-Tray Colilert methode conform ISO 9308-2 gebruikt worden. De Quanti-Tray Colilert is weliswaar voorzien zijn van een supplement specifiek ter onderdrukking van nevenflora.

Aan een 100ml watermonster wordt een Colilert reagens toegevoegd, het watermonster wordt overgebracht in de Quanti-Tray, dat wordt geseald en geïncubeerd bij 36°C. Tellingen van gekleurde en UV fluorescerende cupjes worden aan de hand van MPN tabellen omgezet in een resultaat.

2.3 MPN MICROTITERPLAAT METHODE

Volgens hetzelfde principe kan de telling via ISO 9308-3 de microtiter / MPN methode gebeuren: β -D-glucuronidase-positieve micro-organismen groeien in een specifiek medium dat 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) bevat, bij een incubatietemperatuur van 44°C.

Het verdund monster wordt geïnoculeerd in alle rijen cups van een microtiterplaat dat gedroogd medium bevat. De microtiterplaten worden onderzocht onder UV van 366 nm na 36 uur en 72 uur incubatie bij 44°C. De aanwezigheid van *E.coli* wordt aangeduid met blauwe fluorescentie door hydrolyse van MUG.

2.4 UITDRUKKING VAN DE RESULTATEN

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

Bij de quanti-tray methode en de microtiterplaat worden de resultaten weergegeven als MPN waarde per 100ml.

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.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Alle manipulaties -behalve het filtreren zelf - worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (4.1.8).

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% Umonium³⁸ (5.1.6) en nadien met 70% ethanol (5.1.7).

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 (4.1.8) 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 Incubator 36 ± 2°C

4.1.3 Incubator 44 ± 0,5°C

4.1.4 Schudtoestel

4.1.5 Vortex

4.1.6 Kolonietelapparaat

4.1.7 Pipetus akku

4.1.8 Veiligheidskabinet

4.1.9 Filtratietoestel met pomp

4.1.10 Membraandispenser met steriele 0,45 µm cellulose-esterfilters⁴ of gelijkwaardig

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

⁴ De membraanfilters moeten vrij zijn van groeiremmende of groeibevorderende eigenschappen en de drukinkt voor het raster mag geen invloed hebben op de groei van bacteriën. Indien niet steriel, zullen de filters worden gesteriliseerd volgens de instructies van de fabrikant.

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing⁵
- 5.1.2 CCA conform ISO 9308-1:2014
Samenstelling Chromogeen Coliform Agar CCA
- | | |
|---|----------|
| Caseine pepton | 1,0 g |
| Gist extract | 2,0 g |
| Natriumchloride | 5,0 g |
| Natriumdiwaterstoffosfaat.2H ₂ O | 2,2 g |
| Dinatriumdiwaterstoffosfaat | 2,7 g |
| Natriumpyruvaat | 1,0 g |
| Sorbitol | 1,0 g |
| Tryptofaan | 1,0 g |
| Tergitol® 7 | 0,15 g |
| 6-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside | 0,2 g |
| 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronzuur | 0,1 g |
| Isoporpyl-β-D-thiogalactopyranoside | 0,1 g |
| Agar | 9 - 18 g |
| Water | 1000 ml |
- pH 6,8 ±0,1 bij 25°C
- 5.1.3 Oxidase reagens
- 5.1.4 ChromoCult® Coliform Agar met het E. coli/Coliform Selectief Supplement of REBECCA™
 CF Waters of Rapid'E.coli 2 for water testing
- 5.1.5 Nutriënt agar of TSA agar
- 5.1.6 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.7 gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.8 ultra puur water
- 5.1.9 coliform referentie bacterie

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERVOORBEREIDING

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) 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 10⁰ tot 10⁻², of van 10⁻¹ tot 10⁻³.

⁵ 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 leidingwater of steriel demiwater.

Aan de hand van wegwerppipetten (4.2.3) bediend door de pipetus (4.1.7) 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 (4.1.4).
- 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 (4.1.4).

De procedure wordt achtereenvolgend uitgevoerd tot de gewenste verdunningen zijn bereikt.

6.2 ANALYSE VIA DE MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). 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 µm (4.1.10).

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 chromogeen agarmedium (5.1.2/5.1.4) (luchtbellen tussen membraan en bodem vermijden), en geïncubeerd op $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 21 ± 3 uur, om het aantal coliformen en E.coli te bepalen.

6.2.1 Analyse van waters met een lage bacteriële achtergrond flora

Alle kolonies op de CCA platen, onafhankelijk van grootte, die een roze tot rode kleuring geven (positief β -D-galactosidase reactie) worden als presumptieve coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle kolonies op de CCA platen, onafhankelijk van grootte, die een donkerblauwe tot paarse kleuring geven (positief β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase reactie) worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Bevestiging

Om de presumptieve coliformen die geen *E.coli* zijn te bevestigen, dient een oxidasetest uitgevoerd te worden. De test dient bij voorkeur op alle, of ten minste 10 roze tot rode kolonies uitgevoerd te worden, en geselecteerd zoals beschreven in ISO 8199. Andere coliformen dan *E.coli* worden bevestigd met een negatieve reactie op oxidase test ⁶.

Voor deze bevestigingsstap dient een passend gecommercialiseerde oxidase (5.1.3) test gebruikt te worden, indien nodig vertrekkende van de reïncultuur op een niet-selectieve agar plaat (5.1.5).

Een oxidase positieve reactie wordt veroorzaakt door het enzym cytochrom oxidase dat inwerkt op het N,N-dimethyl-p-fenyleendiamine, met de vorming van indofenolblauw.

⁶ Uit studies in Hongarije en Oostenrijk blijkt dat sommige *Aeromonas* species blauwe kolonies op chromogene media kunnen vormen. Het is aangewezen om dan ook blauwe kolonies te onderwerpen aan de oxidasetest en indoltest, door ze te strijken op een niet selectieve voedingsbodem, om ze daarop rechtstreeks te testen op oxidase en indol..

De werkwijze is afhankelijk van de leverancier van de oxidase kit. De test wordt op een goed geïsoleerde kolonies van de agar uitgevoerd volgens de indicaties op de bijsluiters van het reagens⁷. Coliformen zijn oxidase negatief. Als positieve controle op de oxidase kit wordt een *Pseudomonas* sp. getest, en als negatieve controle een coliform. *Aeromonas* species, die natuurlijk voorkomen in water, zijn te onderscheiden van coliformen door een positieve oxidase reactie.

Als er veel kolonies gegroeid zijn op de membraanfilter of als een presumptieve kolonie vlak naast andere kolonies gelegen is, kan het nodig zijn om subculturen van de presumptieve kolonies te maken, teneinde te waarborgen dat de oxidase test met zuivere culturen uitgevoerd worden. Het is ook noodzakelijk om subculturen van de presumptieve kolonies te maken die te klein voor een betrouwbaar resultaat van de oxidase test. Subculturen worden opgekweekt op een niet-selectieve agar (5.1.5) bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) gedurende 21 ± 3 uur.

6.2.2 Analyse van waters met een hoge bacteriële achtergrond flora

Alle roze tot rode kolonies (positief β -D-galactosidase reactie) op de ChromoCult® Coliform agarplaten (met het *E. coli*/Coliform selectief supplement) of REBECCA™ CF Waters, worden als coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle donker blauwe tot paarse kolonies (positief β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase reactie) op de ChromoCult® Coliform agarplaten (met het *E. coli*/Coliform selectief supplement) of REBECCA™ CF Waters, worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle blauwgroene kolonies (positief β -D-galactosidase reactie) op de Rapid *E.coli* 2 for water testing agarplaten, worden als coliformen beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

Alle donker blauwe tot violette kolonies (positief β -D-galactosidase en β -D-glucuronidase reactie) op de Rapid *E.coli* 2 for water testing agarplaten, worden als *E.coli* beschouwd en geteld met behulp van een kolonietelapparaat (4.1.6); de waarden worden genoteerd.

6.2.3 Bijkomende bevestigingstest

Indien twijfel bestaat over de identificatie van coliformen en *E.coli* of als alternatief voor de bevestigingstest wordt een identificatie uitgevoerd aan de hand van een commerciële kit vertrekkende van de reïncultuur op een niet-selectieve agar plaat (5.1.5). De analyseverantwoordelijke beslist over de noodzaak voor de identificatie.

6.3 QUANTI-TRAY COLILERT METHODE

Voor de methode wordt verwezen naar handleiding van Quanti-tray Colilert.

⁷ Indien geen commerciële oxidase test wordt gebruikt, kan het oxidase-test uitgevoerd door het toevoegen 2-3 druppels verse oxidase reagens op een filtreerpapier in een petrischaal. De kolonies die moeten worden bevestigd, worden overgebracht op een filterpapier met een plastic of platina entnaald. Een positieve oxidase reactie blijkt bij het optreden van een donkerblauwe kleur binnen 30 s. Dit mag niet worden waargenomen voor coliformen omdat ze negatief zijn oxidase.

6.4 MPN MICROTITERPLAAT METHODE

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

6.5 IDENTIFICATIE VAN COLIFORMEN EN E.COLI DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *coliformen* en *E.coli* of ter vervanging van de bevestigingstest kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een validatie uitgewerkt te worden conform ISO 16140.

KWALITEITSCONTROLE

~~Inzetten van een blanco controle bij elke meetreeks: wordt getest door filtratie van 100 ml steriel water (5.1.8). Inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een coliform referentie bacterie (5.1.9).~~

~~De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.~~

~~Indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet binnen de vooropgestelde waarden vallen, 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.~~

7 RAPPORTERING

- Bereken van het aantal bevestigde kolonies geteld op de membraanfilter het aantal *E. coli* en coliformen in 100 ml van het monster (of andere gefiltreerd volume) overeenkomstig ISO 8199. De telling van coliformen is de som van alle oxidase-negatieve (van CCA) roze tot rode kolonies (van CCA of ChromoCult® Coliform agar met supplement of REBECCA™ CF Waters) of blauwgroene kolonies (van Rapid E.coli 2 for water testing agar) plus alle donkerblauwe tot violette kolonies. De *E. coli* zijn het aantal donker-blauw tot violette kolonies.
- Bij verdunningen wordt het aantal getelde 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 of als 0 kve / 100 ml.
- Indien meer dan 100 kolonies op de geïnoculeerde schalen met de grootste verdunning 10^x voorkomen, wordt het resultaat als benaderend vermeld (geschat aantal $>100 \cdot 10^x$ kve/gefilt. volume).

Rapport

Vermeld in het rapport:

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

8 REFERENTIES

- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 9308-1:2014 Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora
- Lange, B., Strahtmann, M., Ossmer, R. 2013. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Letters in Applied Microbiology* Volume 57, Issue 6, pages 547–553, December 2013
- 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.
- Validation certificate for alternative analytical method for Rapid E.coli 2 + supplement (Water Testing) Enumeration of β D-galactosidase positive coliform and positive β D-glucuronidase *E.coli*
- A medium detecting β -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.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- **MALDI-TOF MS**
http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/documents/2015-04_labinfo13-p12_en.pdf
Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." *The open microbiology journal* 7 (2013): 135.