









### 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% Umonium<sup>38</sup> (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-esterfilters<sup>4</sup> 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

---

<sup>4</sup> 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 oplossing<sup>5</sup>
- 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 <sub>2</sub> 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 Umonium<sup>38</sup> 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 MONSTERVEROORBEREIDING

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 10<sup>0</sup> tot 10<sup>-2</sup>, of van 10<sup>-1</sup> tot 10<sup>-3</sup>.

<sup>5</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 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  $21 \pm 3$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-galactosidase en  $\beta$ -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 <sup>6</sup>.

Voor deze bevestigingsstap dient een passend gecommercialiseerde oxidase (5.1.3) test gebruikt te worden, indien nodig vertrekkende van de reincultuur 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.

---

<sup>6</sup> 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 bijsluiter van het reagens<sup>7</sup>. 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  $21 \pm 3$  uur.

#### 6.2.2 Analyse van waters met een hoge bacteriële achtergrond flora

Alle roze tot rode kolonies (positief  $\beta$ -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  $\beta$ -D-galactosidase en  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -D-galactosidase en  $\beta$ -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 reincultuur 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.

---

<sup>7</sup> 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.





