

Nachweis von coliformen Bakterien und *Escherichia coli* in Flusswasser-Biofilmen mit dem Verfahren Colilert-18

Biofilm Centre
Aquatische Mikrobiologie

M. Balzer, A. Dannehl, H.-C. Flemming, J. Wingender

Ziel der Untersuchung

- Hygienisch relevante Mikroorganismen können sich in Umwelt-Biofilmen etablieren
- Als eine rasche Nachweismethode für coliforme Bakterien wurde in Trinkwasser das System "Colilert-18" eingeführt
- Fragestellung war, ob sich dieses System auch für den Nachweis in Umwelt-Biofilmen eignet
- In dieser Studie wurde mit Colilert-18 untersucht, ob es zu einer Anreicherung der coliformen Bakterien im Biofilm gegenüber der Freiwasserphase kommt,

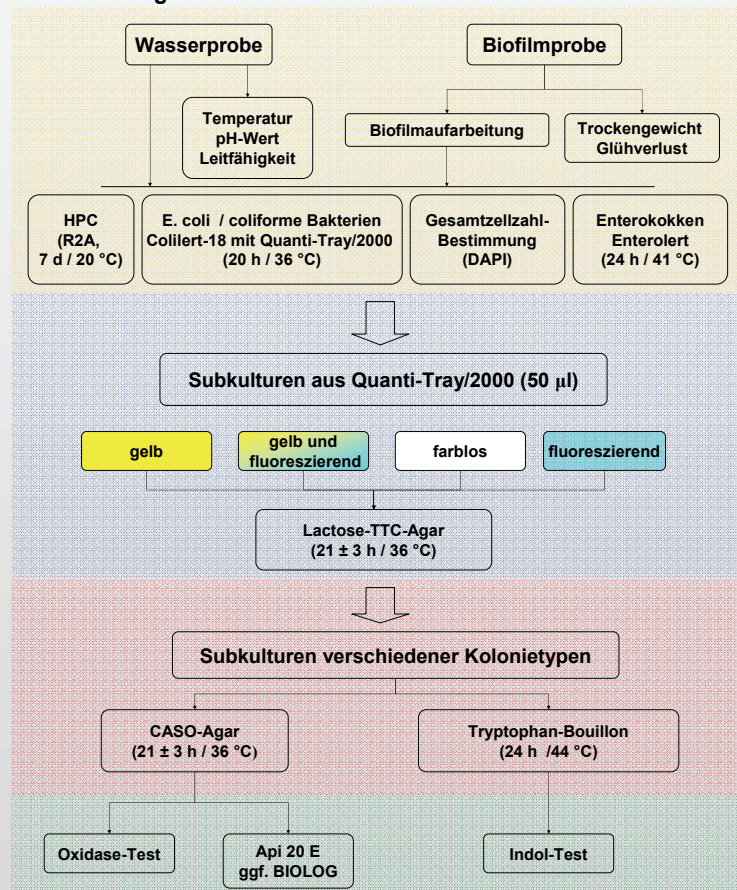
Methoden

Proben: Epilithische Biofilme (Abschaben), Sedimentproben

Herstellung von Biofilm-Suspensionen (10 g Probe + 90 ml Wasser):

- **Rühren** (Magnetrührer 360 UpM, Raumtemperatur, 1 bis 30 min)
- **Ultraschall** (Ultraschallbad, 1 bis 30 min)
- **Stomacher** („Walkmischgerät“, 260 UpM, Raumtemperatur, 1 bis 30 min)

Durchführung der Versuche:



Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mit dem Colilert®-18-System. Funktionsweise:

Nachweis von coliformen Bakterien:

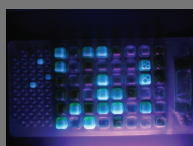
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)
↓ β-D-Galactosidase

o-Nitrophenol + β -D-Galactose
Gelbfärbung

Nachweis von *E. coli*:

4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG)
 $\Downarrow$ β -D-Glucuronidase

4-Methylumbelliferon + β -D-glucuronat
hellblaue Fluoreszenz



Fazit

- ☞ Colilert-18 erwies sich als geeignet für die Untersuchung von epilithischen Biofilmen und Sedimenten in einem Fließgewässer (Ruhr)
- ☞ **In epilithischen und Sediment-Biofilmen finden sich die coliformen Bakterien sowie *E. coli* in ca. 100fach höherer Konzentration.**
- ☞ Flusswasser-Biofilme können somit ein Reservoir für Bakterien fäkaler Herkunft darstellen
- ☞ Bei der Nutzung der Gewässer als zur Trinkwasser-Aufbereitung oder als Badegewässer ist dies von hygienischer Bedeutung

Ergebnisse

Optimierung der Methode zur Aufbereitung der Biofilme für Colilert-18

- Beste Ausbeute bei Sediment-Biofilmen: 10 min Ultraschallbad
- Beste Ausbeute bei epilithischen Biofilmen: 20 min Stomacher

Biofilm:

Gesamtzellzahlen: $2,2 \times 10^9$ bis $4,5 \times 10^{10}$ Zellen/g ww

Konzentration coliformer Bakterien:

4,5 x 10² MPN/g bis 8,8 x x10³ MPN/g ww

Anteil an *E. coli*:

7,5 x 10¹ MPN/g bis 3,7 x 10² MPN/g ww

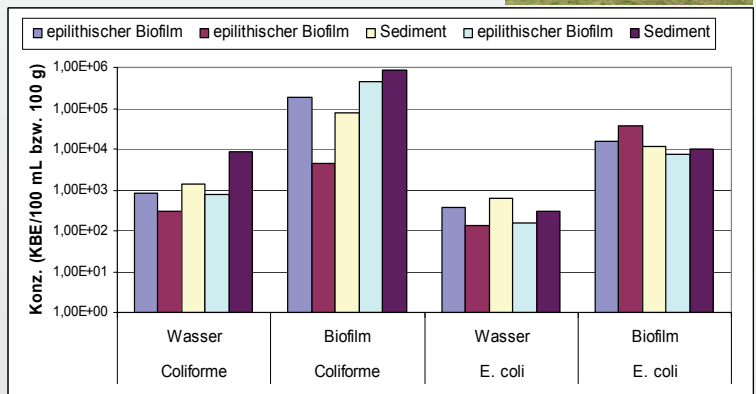


Abbildung: Vergleich der Konzentrationen von coliformen Bakterien und *E. coli* in Biofilmen und parallel gewonnenen Wasserproben aus der Ruhr (Ergebnisse von fünf separaten Probenahmen)

- Biofilme weisen eine etwa 100fach höhere Konzentration von Gesamtzellzahl, Koloniezahl und coliformen Bakterien sowie *E. coli* auf als die Wasserphase
- Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht nur autochthone Mikroorganismen sondern auch allochthone Bakterien fäkaler Herkunft wie *E. coli* sich in Umweltbiofilmen anreichern und dort überleben können.

Auswertung der Trays für coliforme Bakterien: 3,9 % falsch positive, 5,9 % falsch-negative Reaktionen

Auswertung der Trays für *E. coli*: 0 % falsch positive, 9,2 % falsch-negative Reaktionen

Die falsch-negativen Reaktionen für *E. coli* ergaben sich aus ONPG-positiven/MUG-neгатiven (nur gelben) Vertiefungen und ONPG-negativen/MUG-positiven (nur fluoreszierenden) Vertiefungen.
Bestätigung der aus diesen Vertiefungen gewonnenen *E. coli*-Isolate mit atypischer Reaktion: Colisitu-Gensonde

Tabellen-Aufstellung aller identifizierten Bakterienisolate aus dem Gallert 12 System. Unterstrichene Isolate konnten

Tabelle: Auflistung aller identifizierten Bakterienisolate aus dem Colilert-18-System. Unterstrichene Isolate konnten mit dem Api 20 E-System nicht eindeutig identifiziert werden und wurden daraufhin mit dem BIOLOG-System identifiziert. N = Häufigkeit, Quanti-Tray-Vertiefungen: g = gelb, gf = gelb und fluoreszierend, f = nur fluoreszierend, fl = farblos, mit a gekennzeichnete Spezies konnten mit Api 20 E nicht näher identifiziert werden.

Probe/ Datum	N	Isolate	Probe/ Datum	N	Isolate	Probe/ Datum	N	Isolate
RW 30.03.04	9	<i>Enterobacter cloacae</i> (g)	BF 26.04.04	1	<i>Citrobacter freundii</i> (g)	BF 07.06.04	3	<i>Citrobacter braakii</i> (g)
	1	<i>Escherichia coli</i> (g, fg)		1	<i>Citrobacter freundii</i> (g)		1	<i>Citrobacter freundii</i> (g)
	1	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> (g)		10	<i>Escherichia coli</i> (g, fg, f)		3	<i>Citrobacter youngae</i> (g)
	1	<i>Klebsiella terrigena</i> (g)		1	<i>Pantoea</i> spp. (g)		1	<i>Enterobacter aerogenes</i> (g)
	1	<i>Pantoea</i> spp. (g)		1	<i>Yersinia mollaretii</i> (f)		1	<i>Enterobacter amnigenus</i> (g)
	1	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> ⁴⁰ (ff)					4	<i>Enterobacter asburiae</i> (g)
	1	<i>Rahnella aquatilis</i> (ff)					2	<i>Enterobacter cloacae</i> (g)
							25	<i>Enterobacter intermedius</i>
RW 13.04.04	1	<i>Citrobacter freundii</i> (g)	BF 12.05.04	1	<i>Citrobacter braakii</i> (g)		4	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> (g)
	1	<i>Enterobacter cloacae</i> (g)		1	<i>Citrobacter koseri/farmeri</i> ⁴⁰ (g)		25	<i>Escherichia coli</i> (g, fg)
	1	<i>Enterobacter intermedius</i> (g)		4	<i>Escherichia coli</i> (fg, f)		3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (g)
	1	<i>Enterobacter sakazakii</i> (g)		2	<i>Klebsiella oxytoca</i> (g)		6	<i>Pantoea</i> spp. (g)
	1	<i>Escherichia fergusonii</i> (g)		6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (g)		4	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (g)
	5	<i>Escherichia coli</i> (g, fg)		1	<i>Kluyvera</i> spp. (g)		2	<i>Pseudomonas maculicola</i> (g)
	1	<i>Hafnia alvei</i> (ff)		2	<i>Serratia fonticola</i> (g)		1	<i>Rahnella aquatilis</i> (g)
	1	<i>Klebsiella terrigena</i> (g)		2	<i>Serratia marcescens</i> (g)		3	<i>Serratia liquefaciens</i> (g)
	1	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (g)					17	<i>Serratia fonticola</i> (g)
	1	<i>Pasteurella pneumotropica/haemolytica</i> (ff)					1	<i>Serratia marcescens</i> (g)
	1	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> ⁴⁰ (ff)					1	<i>Serratia rubidea</i> (g)
								<i>Yersinia enterocolitica</i> (g)
BF 13.04.04	1	<i>Butiauxella agrestis</i> (g)	B 27.05.04	1	<i>Citrobacter braakii</i> (g)			
	1	<i>Enterobacter cloacae</i> (g)		1	<i>Citrobacter freundii</i> (g)			
	2	<i>Enterobacter intermedius</i> (g)		7	<i>Escherichia coli</i> (g, fg)			
	3	<i>Escherichia coli</i> (fg)		1	<i>Klebsiella oxytoca</i> (g)			
	1	<i>Pantoea</i> spp. (g)		1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (g)			
	1	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> ⁴⁰ (ff)						
	1	<i>Serratia liquefaciens</i> (g)						

Legende:
RW = Ruhrwasser
BF = Biofilm
N = Anzahl der Isolate