

Vergelijkende onderzoeken over het aantonen van coliformen en E.coli in oppervlaktewater

1. Inleiding

Bij de controle betreffende de hygiënische gesteldheid van water wordt vanouds gebruik gemaakt van kiemen of kiemgroepen van faecale oorsprong. Hierbij zijn in de loop der tijden steeds nieuwe indicator-kiemen, nieuwe voedingsmedia en nieuwe bebroedingstechnieken aanbevolen. Een en ander heeft er toe geleid, dat de officiële methodes van land tot land nogal verschillen en dat op grond hiervan vergelijking van resultaten wordt bemoeilijkt. In deze studie is getracht, door een ver-

gelijkend onderzoek van verschillende methodes voor het aantonen van coliformen en E.coli in water, een deel van deze moeilijkheden weg te nemen.

2. Materiaal en methodes

2.1 Materiaal

Voor alle proeven werd gebruik gemaakt van oppervlaktewater, dat door voortdurende lozing van effluent was verontreinigd, en wel slootwater uit de onmiddellijke omgeving van de rioolwaterzuiveringsinstallatie te De Bilt. In totaal werden bij de diverse onderzoeken 31 monsters van het zojuist genoemde water onderzocht.

2.2 Methodes

De proefopzet alsmede de toegepaste methodes zijn in onderstaand schema opgenomen. In de literatuurlijst zijn nadere gegevens van de in dit rapport vergeleken media vermeld.

3. Resultaten

3.1 Aantonen van coliformen

Alvorens de vergelijking van de onder 2.2 A 1 - 4 genoemde media te bespreken wordt een samenvatting gegeven van de uitkomsten der drie bevestigingsmedia, te weten briljantgroen-gal-lactose-bouillon [5], lactose-ricinoleaat-bouillon [6] en de Endo-agarplaat [7], die door vergelijkende onderzoeken op hun waarde werden getoetst.

Gasvorming in tenminste één der vloeibare bevestigingsmedia werd als bewijs beschouwd voor de aanwezigheid van coliformen in de oorspronkelijke buis. Bij onderzoek van 884 buizen werden bij 94,4 % der buizen met de drie bevestigingsmedia dezelfde resultaten verkregen. Bij gebruik van briljantgroen-gal-lactose-bouillon is aflezing van de gasvorming enigszins duidelijker dan bij gebruik van lactose-ricinoleaat-bouillon. Het percentage der positief bevonden buizen, die slechts met één der drie bevestigingsmedia positief waren, was voor alle bevestigingsmedia nagenoeg gelijk, circa 1,5 %.

De resultaten van het onderzoek inzake de vergelijking van 4 media voor het aantonen van coliformen zijn in tabel I samengevat. Hierbij bleek het formaat-glutamaat-medium in duplobepalingen de meest gelijkmatige en goed waarneembare gasvorming te geven. Evenals bij de overige media bleek in genoemd medium het overgrote deel der buizen met gasvorming na 24 uur bij bevestiging positief te zijn. Bij bebroeding gedurende 48 uur werd slechts een klein aantal buizen met gasvorming 'vals-positief' bevonden. Laurylsulfaat-tryptose-bouillon was na bebroeding visueel even goed af te lezen als het formaat-glutamaat-medium. Het percentage vals-positieve buizen na 48 uur bij dit medium was echter enigszins hoger. Bij het aantonen van coliformen in glutaminezuur werd na bebroeding gedurende 24 uur slechts een uitermate geringe



PROF. DR. E. H. KAMPELMACHER

hoofd van het Laboratorium voor Zoönosen en Levensmiddelenmicrobiologie, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid



DRS. A. B. LEUSSINK

hoofd van de Unit Biometrische Analyse, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid



MW. I. M. VAN NOORLE JANSEN

laboratoriumhoofdassistent, Laboratorium voor Zoönosen en Levensmiddelenmicrobiologie, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid

Schema van de proefopzet en de toegepaste methodes

	A. Coliformen		B. E.coli volgens Eijkman		C. E.coli uit media voor Coliformen
Oppervlaktewater	directe kweek		I directe kweek	II kweek na 24 uur bij 4 - 6 °C bewaring	
aankweek medium	glutaminezuur-medium [1] formaat-glutamaat-medium [2] McConkey-bouillon [3] laurylsulfaat-tryptose-bouillon [4]		Eijkman + lactose [8] Eijkman + glucose [9]	[8] [9]	[1] [2] [3] [4]
bebroeding	stoof 37 °C		stoof 44 °C waterbad 44 °C	stoof 44 °C	stoof 37 °C
aflezing gasbellen	na 24 uur en 48 uur		na 24 uur en 48 uur	na 24 uur en 48 uur	na 24 uur en 48 uur
bevestigingsmedia **	briljantgroen-gal-lactose-bouillon [5] lactose-ricinoleaat-bouillon [6] endo-agar [7]		trypton-water [5] [6]	trypton-water [5] [6]	trypton-water [5] [6]
bebroeding	stoof 37 °C		stoof 44 °C	stoof 44 °C	stoof 44 °C
aflezing	na 24 uur [5] op gasvorming [6] op gasvorming [7] op karakteristieke kolonies, welke in glucose- en lactose-bouillon na 24 uur bij 37 °C zuur- en gasvorming vertonen		na 24 uur trypton-water op indolvorming (m.b.v. Kovacs reagens) [5] op gasvorming [6] op gasvorming	na 24 uur trypton-water op indolvorming [5] op gasvorming [6] op gasvorming	na 24 uur trypton-water op indolvorming [5] op gasvorming [6] op gasvorming
kwantitatieve schatting	Most Probable Number (MPN) *		MPN	MPN	MPN

* Elke MPN-bepaling werd in duplo uitgevoerd. Hiertoe werden telkens twee verdunningsreeksen en wel 5 x 1 ml van 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ en 10⁻⁴ ingezet in buizen met 10 ml der verschillende media, voorzien van Durham-buisjes.

** Bij alle onderzoeken werden voor de bevestigingsreacties tenminste twee buizen uit de hoogste verdunningsreeks gekozen. Bij een afwijkend aspect, bijv. vliësvorming (waarbij bekend is, dat het percentage vals-positieven hoog kan zijn) werden alle buizen met gasvorming ter bevestiging ingezet.

TABEL I - *Overzicht van verkregen meetuitkomsten.*

Categorie/methode	gemiddeld ¹⁰ log MPN		bevestigingsproeven (ingezette aantallen buizen respectievelijk percentage positief bevonden ingezette buizen)					
	24 uur onbevestigd	48 uur bevestigd	na 24 uur *		na 24 uur, uitgesteld **		na 48 uur ***	
			ingezet	% pos.	ingezet	% pos.	ingezet	% pos.
A. (Coliformen)								
1. glutaminezuur-medium	4,25	4,72	166	99,4	3	100,0	94	91,5
2. formaat-glutamaat-medium	5,07	5,33	168	98,9	15	46,7	54	83,3
3. McConkey-bouillon	4,52	4,62	154	98,8	10	100,0	38	55,3
4. laurylsulfaat trypose-bouillon	4,66	4,73	153	99,4	10	80,0	19	73,7
B. E.coli vlg. Eijkman								
I. direct ingezet:								
1. lactose, stoof	4,64	4,61	272	91,9	8	62,5	41	19,5
2. lactose, waterbad	4,41	4,40	243	94,7	9	88,9	28	85,7
3. glucose, stoof	4,47	4,28	148	83,1	10	0,0	15	6,7
4. glucose, waterbad	4,53	4,24	130	89,2	4	0,0	10	20,0
II. na 24 uur ingezet:								
1. lactose, stoof	4,82	4,75	162	88,3	9	55,6	37	27,0
2. lactose, waterbad	—	—	—	—	—	—	—	—
3. glucose, stoof	5,11	4,50	150	69,3	36	25,0	21	0,0
4. glucose, waterbad	—	—	—	—	—	—	—	—
C. E.coli, uit media voor coliformen								
1. glutaminezuur-medium	4,14	4,47	165	86,1	2	50,0	93	55,9
2. formaat-glutamaat-medium	4,94	5,02	171	84,2	14	78,6	53	35,9
3. McConkey-bouillon	4,33	4,32	151	75,5	10	60,0	37	10,8
4. laurylsulfaat trypose-bouillon	4,54	4,53	152	80,3	9	100,0	19	10,5

* Bevestiging ingezet direct na eerste aflezing der buizen op gasvorming.

** Bevestiging ingezet na voortgezette bebroeding gedurende nogmaals 24 uur, echter alléén van buizen, waarin bij eerste aflezing reeds gasvorming werd waargenomen.

*** Bevestiging ingezet na totaal 48 uur bebroeding van buizen waarbij gasvorming is opgetreden na de eerste aflezing.

gasvorming waargenomen, die slecht is af te lezen. McConkey-bouillon tenslotte voldeed het minst, al is de aflezing der positieve buizen enigszins gemakkelijker dan bij glutaminezuur. Het aantal vals-positieve buizen daarentegen is hoger dan bij gebruik van glutaminezuur.

3.2 Aantonen van *E.coli* volgens Eijkman

Met betrekking tot de bevestigingsmedia (briljantgroen-gal-lactose-bouillon [5] en lactose-ricinoleaat-bouillon [6]) werden dezelfde resultaten verkregen als bij het onderzoek betreffende het aantonen van coliformen. Indien in de bevestigingsmedia 5 en/of 6 gasvorming optrad en tevens in tryptonwater indolvorming werd aange-toond, werd dit als bewijs beschouwd voor de aanwezigheid van *E.coli* in de oorspronkelijke buis. Bij controle van 1333 buizen werden bij 98 % met beide bevestigingsmedia gelijke uitkomsten verkregen, al is de visuele aflezing bij gebruik van medium 5 enigszins gemakkelijker door een meer duidelijke gasbel-vorming. Bij 0,8 % der positief bevonden buizen werd bevestiging alléén met medium 5 en bij 1,2 % alléén met medium 6 verkregen.

Vervolgens werden de media volgens Eijkman met lactose [8] resp. glucose [9] met elkaar vergeleken en wel bij bebroeding in een waterbad en in een stoof. Bovendien werd van elk watermonster een deel direct (binnen 1 uur) en een ander deel na 24 uur bewaring bij 4 - 6 °C op de zojuist beschreven wijze ingezet. De resultaten van deze onderzoeken zijn eveneens in tabel I samengevat. Het medium volgens Eijkman met lactose geeft gemiddeld hogere initiële MPN-waarden en een aanzienlijk geringer percentage vals-positieve buizen dan het medium volgens Eijkman met glucose.

Tussen bebroeding in een waterbad resp. in een stoof werden geen duidelijke verschillen waargenomen, ofschoon er een tendentie bestaat met betrekking tot een enigszins geringer percentage vals-positieve buizen in het waterbad. Bij het uitgesteld (na 24 uur) inzetten der monsters werden met de methode 'glucose-stoof' na bebroeding gedurende zowel 24 als 48 uur bij de bevestiging opmerkelijk veel vals-positieve buizen gevonden. Bij gebruik van de methode lactose-stoof bleken geen verschillen in uitkomsten op te treden tussen direct en uitgesteld inzetten der monsters.

3.3 Aantonen van *E.coli* in media gebruikt voor het aantonen van coliformen

Ook nu werd gasvorming in tenminste één der bevestigingsmedia, gevoegd bij indolvorming in trypton-water, beschouwd als bewijs voor de aanwezigheid van *E.coli* in de oorspronkelijke buis.

Bij het aantonen van *E.coli* in de 4 media voor coliformenonderzoek [1 - 4] werden bij 876 bevestigingsreacties in 98,4 % der gevallen met beide bevestigingsmedia, te weten briljantgroen-gal-lactose-bouillon [5] en lactose-ricinoleaat-bouillon [6], dezelfde uitkomsten verkregen, bij 1,6 % der positief bevonden buizen werd bevestiging alléén met medium 5 verkregen. Overigens was de gasvorming in dit medium opnieuw het duidelijkst af te lezen.

De resultaten van de vergelijking der hierboven bedoelde 4 media zijn eveneens in tabel I samengevat. Van deze media blijkt het formaat-glutamaat-medium opnieuw de meest gelijkmatige en goed waarneembare gasvorming te geven. Vergeleken bij het aantonen van *E.coli* volgens Eijkman (3.2) zijn nu in het algemeen de percentages vals-positieve buizen enigszins hoger: ze zijn

het laagst voor glutaminezuur en het formaat-glutamaat-medium.

4. Bespreking der resultaten

4.1 De reproduceerbaarheid

Ten aanzien van de reproduceerbaarheid, zoals deze numeriek tot uiting komt in de ongelijkheid van de uitkomsten van bij elkaar behorende duplo-bepalingen, werden tussen de diverse meetmethodes geen significante verschillen aangetroffen. Gebleken is, dat bij uitkomsten van MPN-bepalingen, verricht volgens de hier beschouwde meetmethodes, rekening moet worden gehouden met een onzekerheid ter grootte van een factor vijf, zowel naar beneden als naar boven. De beperkende implicaties, die hieruit voortvloeien voor de praktische gebruikswaarde van gemeten MPN-waarden, dienen niet uit het oog te worden verloren.

4.2 De bevestigingsmedia

Voor de drie bevestigingsmedia, 5 t/m 7, zijn de waargenomen geringe onderlinge verschillen in de uitkomsten niet significant. Een praktische gebruiksk keuze kan derhalve gebaseerd worden op tijd en werk besparen de aspecten. Bij gebruik van de endoplaat zullen de verdachte kolonies nog eens moeten worden onderzocht in glucose- en lactose-bouillon en deze bodem is daarom niet aan te bevelen.

4.3 Aantonen van coliformen

Ten aanzien van de als einduitkomsten vastgestelde MPN-waarden verschillen de vier onderzochte media significant van elkaar: het formaat-glutamaat-medium levert de hoogste einduitkomsten op. Ten aanzien van de percentages vals-positieve buizen is eerst na 48 uur bebroeding een significante ongelijkheid tussen de vier media aantoonbaar, waarbij de glutaminezuur- en de formaat-glutamaat-media als beste uit de bus komen. Op grond van deze bevindingen en vooral ook gelet op de meer gelijkmatige en beter afleesbare gasvorming lijkt derhalve het formaat-glutamaat-medium de voorkeur te verdienen. Opgemerkt kan nog worden, dat, gezien de (betrekkelijk) geringe percentages vals-positieve buizen, overwogen zou kunnen worden het verrichten van bevestigingsreacties achterwege te laten.

4.4 Aantonen van *E.coli* volgens Eijkman

De resultaten, verkregen met lactose, zijn significant beter (i.e.: hogere MPN-waarden en minder vals-positieve reacties) dan de resultaten verkregen met glucose. Bij gebruik van lactose zijn de verschillen tussen bebroeding in de stoof en de bebroeding in het waterbad slechts significant ten aanzien van de percentages vals-positieve buizen bij bebroeding gedurende 48 uur. Op grond

van praktische voordelen (grotere capaciteit, minder onderhoud, energiebesparing) zou derhalve de voorkeur kunnen uitgaan naar bebroeding in stoven.

Het bestaan van mogelijke verschillen tussen de uitkomsten van directe dan wel uitgestelde inzet der monsters is slechts onderzocht voor bebroeding in stoven. Uit tabel I blijkt duidelijk, dat bij gebruik van glucose uitgestelde inzet tot opmerkelijk hoge percentages vals-positieve buizen leidt. Bij gebruik van lactose is echter in dit opzicht het verschil tussen directe en uitgestelde inzet niet significant, evenmin als het verschil ten aanzien van de MPN-einduitkomsten. Geconcludeerd kan worden dat, bij gebruik van lactose en bebroeding in stoven, een uitstel van 24 uur geen gevolgen heeft voor de bruikbaarheid der meetuitkomsten wanneer gedurende dat uitstel de watermonsters bij 4 - 6 °C worden bewaard.

4.5 Aantonen van *E.coli* in media gebruikt voor het aantonen van coliformen

Met betrekking tot de onderlinge vergelijking der vier media verschillen de verkregen bevindingen niet van hetgeen in 4.3 werd beschreven. Ook nu verdient — vooral ook wegens de gelijkmatige en beter afleesbare gasvorming — het formaat-glutamaat-medium de voorkeur.

Van belang is echter vooral de vergelijking van deze werkwijze met de methode volgens Eijkman. Op grond van het voorgaande kan deze vergelijking beperkt blijven tot enerzijds het formaat-glutamaat-medium en anderzijds het Eijkman-medium + lactose. Het blijkt dan dat dit laatste significant lagere MPN-einduitkomsten oplevert en tevens — zoals overigens a priori te verwachten was — significant lagere percentages vals-positieve buizen. Geconcludeerd kan worden, dat het formaat-glutamaat-medium niet tot verliezen leidt, wanneer het gebruikt wordt voor het aantonen van *E.coli*. Het is echter duidelijk, dat een dergelijke werkwijze zou leiden tot overschatting der *E.coli*-concentraties, wanneer niet alle buizen met gasvorming ter bevestiging worden ingezet. De bebroedingstemperatuur werkt immers niet selectief voor de groei van *E.coli*. Bevestigingsreacties moeten dus uitsluitend geven over de aanwezigheid van *E.coli* in het uitgangsmateriaal. Op grond van deze overwegingen kan geconcludeerd worden dat het onderzoek naar het aantal *E.coli* op deze wijze alleen dan zinvol is wanneer te weinig onderzoekingsmateriaal aanwezig is om het aantal *E.coli* en coliformen afzonderlijk te bepalen.

5. Samenvatting

In een vergelijkend onderzoek van verschillende media voor het aantonen van

coliformen blijkt het formaat-glutamaat-medium de beste resultaten te geven. Tussen de in dit onderzoek met elkaar vergeleken bevestigingsmedia zijn geen significante verschillen gevonden.

Voor het aantonen van *E.coli* blijkt het medium van Eijkman met lactose bij bebroeding in een stoof de voorkeur te verdienen. Bij toepassing van laatstgenoemde methode zijn geen significante verschillen in de resultaten gevonden tussen enerzijds directe inzet der monsters en anderzijds inzet na 24 uur bewaring bij 4 - 6 °C. Voor eventueel in de praktijk gewenste combinatie van onderzoek op *E.coli* en op coliformen blijkt eveneens het formaat-glutamaat-medium de voorkeur te verdienen. Er zijn geen aanwijzingen verkregen, dat bij een dergelijke werkwijze opbrengstverliezen ontstaan ten opzichte van het aantonen van *E.coli*. Vanzelfsprekend zijn bij deze werkwijze bevestigingsreacties noodzakelijk.

Literatuur

1. Glutaminezuur. Bacteriologisch onderzoek van drinkwater. N3043 Augustus 1956, p. 18.
2. Formaat-glutamaat-medium. The Bacteriological Examination of Water Supplies No. 71, London. Her Majesty's Stationery Office, 1969, p. 40.
3. McConkey-bouillon. Idem blz. 39.
4. Lauryl-sulfaat-tryptose-bouillon. Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish, 4th Ed. 1970. The American Public Health Ass. 7nd. 1740 Broadway New York N.Y. 10019, p. 9.
5. Brilljantgroen-gal-lactose-bouillon. The Bacteriological Examination of Water Supplies No. 71, London. Her Majesty's Stationery Office 1969, p. 41.
6. Lactose-ricinoleaat-bouillon. Idem.
7. Endo-agar. Bacteriologisch onderzoek van drinkwater. N3043 Augustus 1956, p. 19.
8. Eijkman + lactose. Difco 0017.
9. Eijkman + glucose. Bacteriologisch onderzoek van drinkwater. N3043 Augustus 1956, p. 17.

