

Stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli* na chromogenním médiu

DANA BAUDIŠOVÁ

Klíčová slova: koliformní bakterie – *Escherichia coli* – chromogenní agar – pitná voda

SOUHRN

Tento příspěvek předkládá praktické zkušenosti s chromogenním médiem CCA, které se podle novely normy ČSN EN ISO 9308-1 používá ke stanovení koliformních bakterií a *E. coli* ve vodách s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry. Jsou uvedeny vybrané charakteristiky metody a jsou diskutovány hlavní problémy s jeho využitím ve vodohospodářské praxi.

ÚVOD

V dubnu 2015 došlo v souvislosti s novelizací normy ČSN EN ISO 9308-1 [1] k významné změně metody stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Jedná se o vysoce citlivou metodu, vhodnou pouze pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry, především tedy pro dezinfikované vody (upravená pitná voda, bazény). U ostatních typů vod (mělké soukromé studny, povrchové vody, zejména stojaté apod.) je její využití sporné, především pro vysoký nárůst doprovodné mikroflóry. Tato metoda byla v minulých letech testována pro případné použití v přírodních koupacích vodách a vzhledem k nízké selektivitě (viz dále) byla vyhodnocena pro tento typ vod jako nevyhovující [2].

Koliformní bakterie jsou podle této normy skupina gramnegativních tyčinek netvořících spory s negativním cytochromoxidázovým testem, které tvoří za aerobních podmínek kolonie během 24 hodin na selektivním diferenačním médiu při kultivační teplotě $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$. Koliformní bakterie vykazují **aktivitu β -D-galaktosidázy** a *E. coli* je ta koliformní bakterie, která zároveň vykazuje aktivitu **β -D-glukuronidázy**. Významná je změna „detekčního systému“ koliformních bakterií a *E. coli* oproti dřívější metodě založené na fermentaci laktózy (koliformní bakterie) a tvorbě indolu (*E. coli*). Aktivitu β -D-galaktosidázy vykazuje mnohem širší spektrum bakterií (tento enzym štěpí laktózu na galaktózu a glukózu, která dále může a nemusí být fermentována na kyselé produkty); podrobně jsou biochemické vlastnosti jednotlivých druhů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* uvedeny v Bergey's Manual of Determinative Microbiology [3]. Počet koliformních bakterií detekovaných na chromogenním médiu tak bývá významně vyšší, než byl jejich záchyt na dříve používaném laktóзовém TTC agaru s tergitolem, a výsledky proto nekorelují. Naproti tomu stanovení *E. coli* pomocí enzymu β -D-glukuronidázy je mnohem specifitější než dříve používaný indol test (test na β -D-glukuronidázu byl v dřívější verzi normy pouze nepovinný a prakticky se nepoužíval), takže výsledky stanovení *E. coli* na chromogenním médiu budou výrazně spolehlivější.

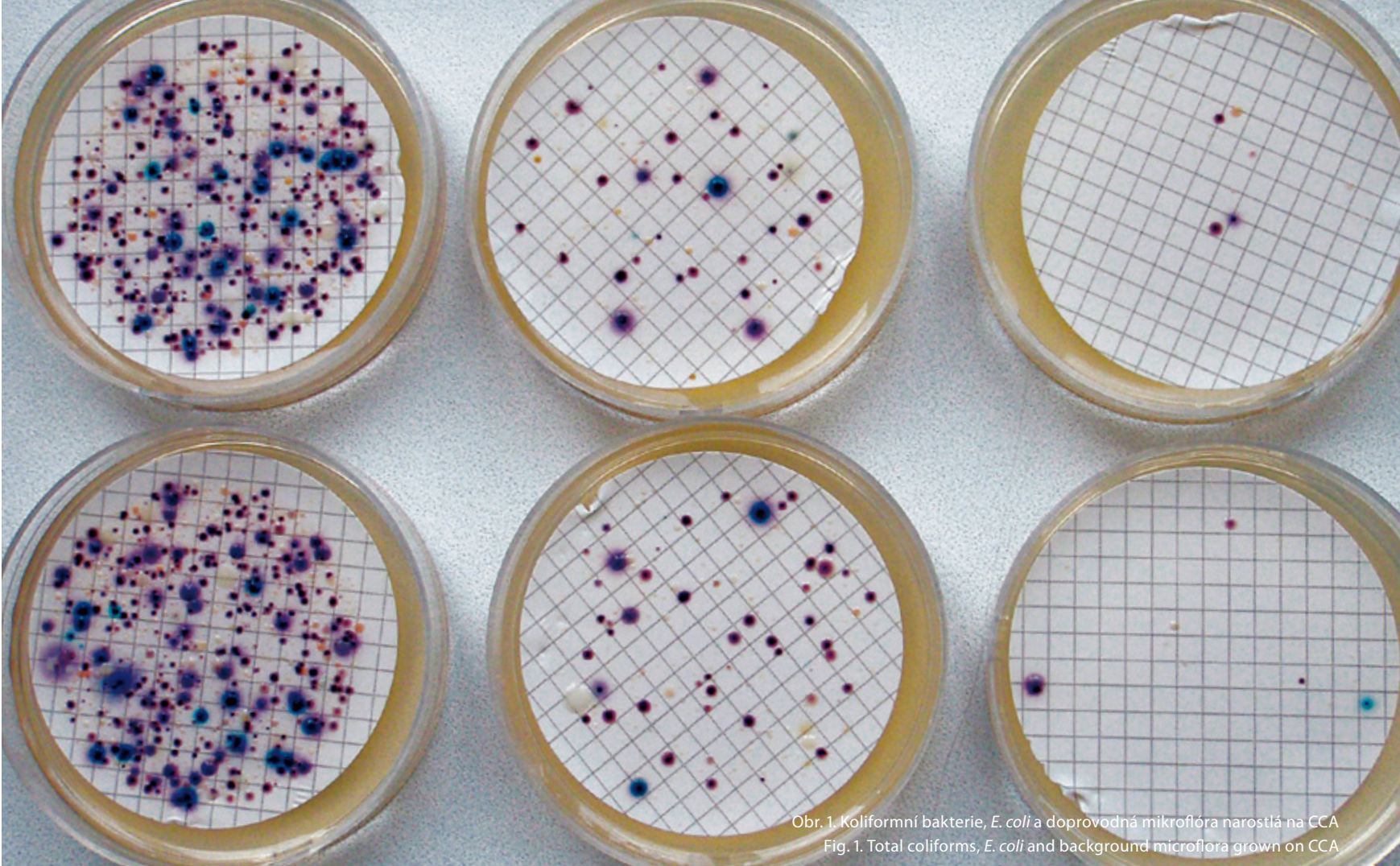
METODIKA

Koliformní bakterie a *E. coli* se stanovují membránovou filtrací (většinou se filtruje objem 100 ml vzorku), membránové filtry mají porozitu $0,45\ \mu\text{m}$. Filtr se umístí na chromogenní médium (Chromogenic-Coliform Agar) a kultivuje se (21 ± 3) hodiny při $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$. Složení Chromogenic-Coliform Agaru (dále CCA) je uvedeno v *tabulce 1*. CCA je běžně komerčně dostupný. Příprava CCA je velmi jednoduchá, naváží se příslušné množství prášku, resp. granulí, a rozpustí se v destilované vodě. Nepřidávají se žádné další přísady. Nesmí se autoklávat. Po zchlazení na $45\text{--}50^\circ\text{C}$ se agarové médium sterilně rozleje do Petriho misek. PH má být $6,8 \pm 0,2$ při 25°C (podle našich zkušeností deklarované pH vždy sedělo, přesto je nutné u každé šarže provést kontrolu). Médium je velmi stálé, uvažené vydrží minimálně měsíc, jen je nutná ochrana před jeho vyschnutím. Kvalita média se testuje podle normy ČSN EN ISO 11133 [4].

Tabulka 1. Předepsané složení CCA

Table 1. Prescribed composition of CCA

Enzymatický hydrolyzátní kaseinu	1,0 g
Kvasničný extrakt	2,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Dihydrogenfosforečnan sodný * 2H ₂ O	2,2 g
Hydrogenfosforečnan sodný	2,7 g
Pyrohroznán sodný	1,0 g
Sorbitol	1,0 g
Tryptofan	1,0 g
Tergitol 7	0,15 g
6-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid	0,2 g
Kyselina 5-brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-glukuronová	0,1 g
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	0,1 g
Agar	9–18 g
Destilovanou vodou doplnit do	1 000 ml



Obr. 1. Koliformní bakterie, *E. coli* a doprovodná mikroflóra narostlá na CCA
 Fig. 1. Total coliforms, *E. coli* and background microflora grown on CCA

Koliformní bakterie rostou jako růžové až červené kolonie, *E. coli* jako tmavě modré až fialové kolonie (viz obr. 1). Doprovodná mikroflóra roste ve formě bezbarvých kolonií. Koliformní bakterie je nutné potvrdit pomocí oxidázového testu (koliformní bakterie jsou oxidáza negativní), který norma připouští provádět přímo na membránovém filtru. Při případném přeočkování kolonií na neselektivní agar (pro další konfirmaci) je nutné kolonie pečlivě přečistit, aby se vždy pracovalo s čistou kulturou. Pro případnou další konfirmaci, resp. pro potvrzení aktivity enzymů β -D-galaktosidázy a β -D-glukuronidázy, lze využít např. ONP test a GLR test (Erba, Lachema). Tyto testy lze využít i pro stanovení citlivosti a specifčnosti příslušných reakcí na CCA. Při výpočtu výsledků je nutné mít na paměti důležitý fakt a to, že i *E. coli* patří mezi koliformní bakterie, a musí se tudíž do jejich počtu přičíst:

- počet *E. coli* = počet modrých až modrofialových kolonií,
- počet koliformních bakterií = počet růžových až červených kolonií s negativním oxidázovým testem + počet modrých až modrofialových kolonií.

VÝSLEDKY A DISKUSE

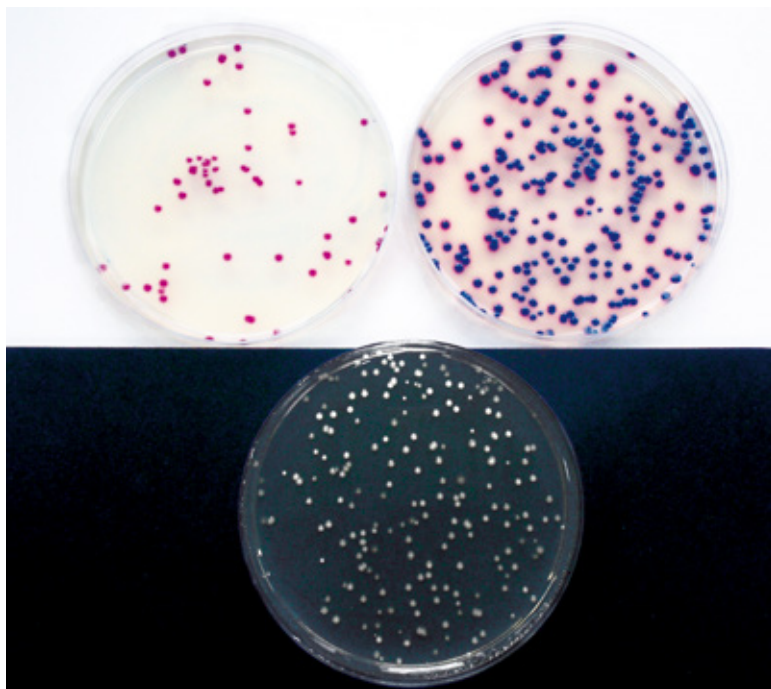
Byly testovány desítky mírně organicky znečištěných vod, především za účelem získání charakteristik metody stanovení koliformních bakterií a *E. coli* na CCA. Přestože byly vzorky paralelně testovány na původním laktózovém TTC agaru s tergitolem (ČSN EN ISO 9308-1, 2001), výsledky nevykazovaly žádnou korelaci vzhledem k odlišnému principu obou médií. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky Zkoušení způsobilosti (ZZ) organizovaného ASLAB – OR-MB-1/15 (vzorky 1–5 jsou vzorky, které sloužily k ověření homogenity v laboratoři VÚV TGM, v.v.i.), vztažná hodnota poté byla určena ze souboru všech účastníků (KTJ/ml, n = 19).

Tabulka 2. Koliformní bakterie a *E. coli* na CCA a laktózovém agaru s Tergitolem 7 (Tergitol) při OR-MB1/15

Table 2. Coliforms and *E. coli* on CCA and lactose agar with Tergitol 7 (Tergitol) at OR-MB1/15

	CCA <i>E. coli</i>	CCA koliformní	Tergitol <i>E. coli</i>	Tergitol koliformní
1	1	11,1	2,7	2,7
2	1	12	4,8	4,8
3	1	9,7	1,1	1,1
4	1	9,1	3,6	3,6
5	1	11,66	0,8	4
Vztažná hodnota	1	12	2	4

Z dalších charakteristik byly stanoveny produktivita (viz obr. 2), reprodukovatelnost v počítání a podíl falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Produktivita byla stanovena pomocí kmenů *E. coli* WDCM 00013 (CCM 3954) a *Serratia rubidae* (CCM 4684), která není uvedena v normě ČSN EN ISO 11133. Další kmeny, které jsou předepsány ve výše uvedené normě (*Enterobacter aerogenes* WDCM 00175, nebo *Citrobacter freundii* WDCM 00006), nebyly v době testování ještě k dispozici.



Obr. 2. Stanovení produktivity; vlevo nahoře *Serratia rubidaea* na CCA, vpravo nahoře *E. coli* (WDCM 0013) na CCA a dole *E. coli* na neselektivním tryptózovém agaru s kvasničným extraktem

Fig. 2. The productivity testing; left above *Serratia rubidaea* on CCA, right above *E. coli* (WDCM 0013) on CCA, and down *E. coli* on nonselective tryptose agar with yeast extract

V informativní příloze C normy ČSN EN ISO 9308-1 [1] je uvedena předepsaná minimální produktivita (výťažnost) > 70 %, a naše testování toto hodnotu významně překročilo. Produktivita pro kmen *E. coli* (CCM 3954) byla na CCA od firmy Merck 100 %, na CCA od firmy Himedia 87,41 %; produktivita pro kmen *Serratia rubidaea*, jakožto zástupce koliformních bakterií (CCM 4684), byla na CCA od firmy Merck 83,82 % a na CCA od firmy Himedia 100 %.

Při reprodukovatelnosti v počítání (dva pracovníci, n = 18) byl dosažen variační koeficient 9 % pro *E. coli* a 10 % pro ostatní koliformní bakterie, což je minimálně srovnatelné, spíše lepší, než tomu bylo u dříve používaného laktózosvého TTC agaru s Tergitolem 7.

Pomocí konfirmačních testů byl stanoven podíl falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Aktivita β -D-glukuronidázy byla ověřena pomocí fluorogenního substrátu (4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid), a v 98 % se výsledky shodovaly (n = 50). Aktivita β -D-galaktosidázy byla konfirmována ONP testem. Vínové kolonie byly 100% konfirmovány jako β -D-galaktosidáza pozitivní (0 % falešně pozitivních výsledků), u světlých kolonií byly zaznamenány falešně negativní výsledky v 9 % (91 % světlých kolonií bylo konfirmováno jako β -D-galaktosidáza negativní). Dále byly ověřovány oxidáza negativní kolonie testované přímo na membránovém filtru a po jejich přečištění byla negativní reakce potvrzena v 90 %.

Mezi hlavní výhody stanovení koliformních bakterií na CCA agaru patří skutečnost, že výsledky stanovení jak koliformních bakterií, tak *E. coli* jsou k dispozici již 24 hodin po naočkování a není třeba žádné další přeočkování kmenů na neselektivní agar. Zároveň norma připouští provedení oxidázového testu přímo po přenesení membránového filtru na podložku nasycenou oxidázovým činidlem. Kromě tak pracného přeočkování a přečišťování kolonií odpadne i následný přepočet na původní počet presumptivních kolonií, čímž se stanovení nejenom zrychlí, ale i zpřesní.

Nevýhodou stanovení je velký záchyt doprovodné mikroflóry, což znemožňuje využití k jinému než deklarovanému účelu (vody s nízkým obsahem doprovodné

mikroflóry). Otázkou zůstává používání CCA u surových vod, které jsou sice nedezinfikované, nicméně není logické stanovovat koliformní bakterie a *E. coli* u surové a upravené vody na médiích o jiných biochemických principech.

Podle Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. [3] fermentuje laktózu ve více než 90 % kmenů 25 druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*Butiaxella agrestis*, pět druhů rodu *Enterobacter*, šest druhů rodu *Erwinia*, *E. coli*, tři druhy rodu *Klebsiella*, *Kluyvera ascorbata* a *K. cryocrescens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Rahnella aquatilis*, *Moellerella wisconsensis* a dva druhy rodu *Serratia*). Další čtyři druhy fermentují laktózu v 79–89 % a 18 druhů fermentuje laktózu v 25–75 % (včetně řady druhů rodu *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* či *Yersinia*), ale jsou vždy β -D-galaktosidáza pozitivní. Dvacet druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* (zahrnující rody *Cedecea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella* (*S. arizona*), *Shigella* (*S. sonnei*), *Serratia*, *Pantoea*, *Yersinia*), které i když jsou v 90–100 % kmenů β -D-galaktosidáza pozitivní, laktózu nefermentují (další druhy jsou β -D-galaktosidáza pozitivní variabilní a laktóza negativní). Výše uvedené skutečnosti skupinu koliformních bakterií posouvají významně více od fekálního k obecnému znečištění a malé nedezinfikované studny prakticky nemají šanci limit pro koliformní bakterie 0 KTJ/100 ml splnit.

Další malou, ale opticky výraznou skupinou jsou kolonie, které rostou jako tyrkysové, v některých případech velmi drobné (které většinou nevyrostou po přeočkování na neselektivní agar), v dalších případech rostou jako kolonie běžné velikosti (v průměru 1 mm). Podle firemních materiálů zveřejněných na internetu (Merck, VWR Chemicals apod.) se jedná o další gramnegativní bakterie (doprovodná mikroflóra), β -D-glukuronidáza pozitivní. Podle našich praktických zkušeností šlo buď o oxidáza pozitivní kmeny, nebo o β -D-galaktosidáza negativní *E. coli*, případně o intermediální kmeny z oblasti okolo rodů *Shigella* a *Yersinia*. V některých případech byly konfirmovány i β -D-galaktosidáza pozitivní kmeny.

ZÁVĚR

Výhody (popř. nevýhody) využití CCA v mikrobiologické praxi ukáže čas, nicméně už teď se ukazuje, že jeho využití je vhodné pouze pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry (především pro dezinfikované pitné, popř. bazénové vody). V tomto případě se jedná o stanovení rychlé (během 24 hodin jsou k dispozici kompletní výsledky) a velmi citlivé. Využití CCA pro stanovení koliformních bakterií a *E. coli* v povrchových, popř. odpadních vodách lze prakticky vyloučit, sporné je i jeho použití pro nedezinfikované malé studny, které v České republice nejsou legislativně ošetřeny.

Autor

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

✉ dana_baudisova@vuv.cz

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., Praha

Příspěvek prošel lektorským řízením.

Literatura

[1] ČSN EN ISO 9308-1. Kvalita vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry, 2015.

[2] BAUDIŠOVÁ, D. Metody stanovení *Escherichia coli* a intestinálních enterokoků v koupacích vodách. VTEI, roč. 55, č. 1, 2013, s. 5–7, příloha Vodního hospodářství č. 2/2013. ISSN 0322-8916.

[3] HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P. H.A., STALEY, J.T., and WILLIAMS, S.T. Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Baltimore, 1994.

[4] ČSN EN ISO 11133. Mikrobiologie potravin, krmiv a vody – Příprava, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd, 2015.



DETECTION OF TOTAL COLIFORMS AND *ESCHERICHIA COLI* ON CHROMOGENIC MEDIUM

BAUDISOVA, D.

TGM Water Research Institute, p. r. i.

Key words: total coliforms – *Escherichia coli* –
chromogenic agar – drinking water

The aim of this study is introduction and practice of chromogenic medium CCA that is prescribed in the amendment of EN ISO 9308-1 standard for detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria in waters with low bacteria background flora. Selected characteristics of the method are given, and the main problems dealing with its usage in water microbiology are discussed.