

Eine neue Methode der Anwendung der Membranfilter

Imrich Daubner

Bei der bakteriologischen Analyse des Wassers ist eine der grundlegenden Aufgaben ihre rasche Durchführung. Dies ist unumgänglich notwendig, da sich durch den Transport die Gesamtzahl der Mikroorganismen sowie das Zahlenverhältnis der einzelnen Gattungen in der Wasserprobe ändert, und das umsomehr, je länger der Transport andauert. Es handelt sich dabei aber nicht nur um die Gesamtzahl der Mikroorganismen in der Wasserprobe, sondern auch um die Indikatoren der fäkalen Verunreinigung, eventuell um pathogene Bakterien, welche im zu prüfenden Wasser enthalten sein können. In einer neueren Arbeit* stellten wir jedoch fest, daß es während eines zweistündigen Transportes zu keiner wesentlichen Änderung von Zahl und Art der Mikroorganismen in der Wasserprobe kommt. Die Streuung (Variationsbreite) in der Zahl der Mikroorganismen bei parallel beimpften Platten aus ein und derselben Wasserprobe ist größer als der Unterschied zwischen der festgestellten Anzahl der Bakterien im Terrain und nach dem Transport im Laboratorium. Diese Tatsache beeinflusste jedoch nicht unsere Bemühungen, die Analyse des Wassers womöglich sofort am Ort der Probenentnahme durchzuführen.

Aus den oben angeführten Gründen haben wir daher die Einführung solcher Methoden und Analysen angestrebt, die uns im Terrain ein einfaches und schnelles, dabei aber genaues Arbeiten gestatten. Die Verwendung von Membranfiltern und des Gels der Kieselsäure erschien uns bei der Bestimmung der Anzahl der Bakterienkolonien besonders geeignet.

Bei der Bearbeitung der Proben im Terrain nach der bisher geübten Weise stießen wir jedoch auf gewisse Schwierigkeiten. Es handelte sich dabei hauptsächlich um das Trocknen der Platte (Endo, Nährboden für Enterokokken usw.) vor und nach der Beimpfung des Nährbodens. Zu diesem Zwecke bedarf es nämlich eines größeren geeigneten Arbeitsraumes, der aber an den jeweiligen Untersuchungsstellen nur selten zur Verfügung steht. Ferner werden die

* Daubner 1960, im Druck.

Bestimmungen oft ungenau, da die zum Trocknen geöffneten Platten unter den ungünstigen Arbeitsbedingungen im Terrain, wo man viel schwerer als im Laboratorium steril arbeitet, kontaminiert werden können. Schließlich handelt es sich auch um einen bedeutenden Zeitverlust, da das Trocknen der Platte mindestens eine halbe Stunde dauert. Die Beseitigung dieser technischen Schwierigkeit erschien uns daher als ein wertvoller Beitrag zur Verbesserung der Methode und zur Erleichterung der bakteriologischen Untersuchung des Wassers an Ort und Stelle sowie auch im Laboratorium.

Dieses Ziel zu erreichen half uns das Membranfilter. Die Anwendung der Membranfilter besitzt viele Vorteile, wenn es sich um ein Wasser mit einer geringen Anzahl von Mikroorganismen handelt und die Wasserprobe eingeeengt werden soll. Bei der Untersuchung von Wasserproben mit einer größeren Zahl von Bakterien, z. B. Oberflächenwasser oder Abwasser, wo man die Proben nicht konzentrieren, sondern oft bedeutend verdünnen muß, um zu auswertbaren Resultaten zu kommen, verliert die Anwendung der Membranfiltermethode ihren Hauptvorteil.

Mit dem Worte Membranfilter ist der Begriff Filtration verbunden, worunter man das Durchsaugen einer gewissen Menge des zu untersuchenden Wassers durch ein spezielles Filter versteht. Dieses ist in einem geeigneten Apparat eingesetzt. Zur Filtration selbst ist ein Unterdruck notwendig.

Die Arbeit im Terrain ist bei Anwendung des Filtrationsapparates wegen seiner Sterilisation und des Einlegens sowie Entnehmens der Filterblättchen etwas erschwert. Die Exaktheit der Arbeit leidet auch durch das Anheften von Mikroorganismen an der Wand des Filtrationsapparates, wovon wir uns schon des öfteren überzeugen konnten.

Mucha gab daraufhin die Anregung, die Membranfilter ohne Benützung des Filtergerätes zu verwenden. Das Prinzip ist sehr einfach. Das Membranfilter wird auf eine geeignete, sterile und saugfähige Unterlage gelegt und die nötige Menge des Wassers mittels einer Pipette auf das Filter aufgetragen.

Nach Einsaugen des Wassers in die Unterlage überträgt man die Membrane auf einen Nährboden zur Bebrütung. Wie unsere Versuche zeigten, ist diese Methode schnell, genau und im Terrain gegenüber anderen Verfahren unbedingt vorteilhafter.

Arbeitsmethodik

In eine sterile Petrischale von 8 cm Durchmesser wird eine sterilisierte, wassersaugende Einlage von 0,5—1,0 mm Dicke ge-

geben, die wenigstens 1 ml Wasser absorbieren kann. Als solche benützen wir ein stärkeres Filtrierpapier oder mehrere dünne Papiere, die jedoch keine antibakteriellen Verbindungen enthalten dürfen. Auf diese Unterlage wird das frisch sterilisierte, noch feuchte Membranfilter mit 6 cm Durchmesser und einer mittleren Porenweite von 0,4 Mikron gelegt (Filter Nr. 2 der Membranfiltergesellschaft A.G., Göttingen). Bei der Sterilisaiton durch Kochen zeigen die Filter dieser Provenienz eine Kontraktion von 10 %, wodurch auch ihre Porenweite verkleinert wird. Diese Kontraktion erschwert die genaue Befestigung des Membranfilters im Filtergerät. Bei der hier beschriebenen Anwendungsart des Membranfilters ist jedoch die Kontraktion nicht nachteilig.

Auf die Membrane wird mit einer Pipette die erforderliche Menge der Wasserprobe aufgetragen. Es ist dabei notwendig, so zu pipettieren, daß das Wasser gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Membrane verteilt wird, wobei das Wasser nicht über den Rand fließen darf. Pipettieren kann man die Wasserprobe direkt oder ihre entsprechenden Verdünnungen, die mit gepuffertem destilliertem Wasser angesetzt werden (American Standard Methods 1955). Die Verdünnungen sollen so sein, daß man auf der Membrane nicht weniger als 0,5 ml und nicht mehr als 1 ml Wasser auftragen muß und nicht mehr als 50 Kolonien kultivieren kann. Eine größere Anzahl von Kolonien ist einerseits umständlich auszuzählen, andererseits ist die Isolierung der einzelnen Kulturen erschwert.

Nach einigen Sekunden saugt die Unterlage das Wasser von der Oberfläche des Membranfilters. Das noch feuchte Filter nehmen wir mit einer Pinzette, deren Ende kurz vorher in der Flamme sterilisiert wurde, von der Unterlage und legen es mit der Filterseite nach oben auf den Nährboden in der Petrischale. Dabei beachten wir, daß zwischen Nährboden und Membrane keine Luftblasen entstehen; falls solche entstanden sind, muß man das Filter wieder aufheben und langsam zurücklegen, bis es mit seiner ganzen Fläche am Nährboden aufliegt.

Der Nährboden wird nunmehr bebrütet, wobei wir die Schale umkehren, so daß der Boden nach oben zu liegen kommt.

Experimenteller Teil

Arbeitsmethodik

Diese Art der Anwendung der Membranfilter versuchten wir an 90 Proben aus fließenden und stehenden Oberflächenwässern und

zwar 50 Proben zur Feststellung der Anwesenheit und Anzahl von Bakterien der Subfamilie Eschericheae und 40 Proben zur Bestimmung der Anwesenheit und Anzahl von Enterokokken (Tabellen 1 und 2). Parallel mit der Züchtung (Pipettierung) auf Membranfiltern kultivierten wir auch direkt auf Nährböden.

Bei der Analyse von Wasserproben hinsichtlich Gegenwart und Anzahl von Bakterien der Subfamilie Eschericheae verfahren wir folgendermaßen:

Die Wasserprobe wurde mit sterilem, gepuffertem Wasser 1:100 verdünnt, um eine dem Zweck entsprechende Anzahl der Kolonien (bis zu 20) zu erhalten. Von jeder verdünnten Wasserprobe entnahmen wir 1 ml, pipettierten 0,5 ml auf das Membranfilter und 0,5 ml direkt auf den Endoagar. Weiters verfahren wir nach der oben beschriebenen Methode. Die Inkubationsdauer betrug 24+2 Stunden bei 37° C. Nach dieser Zeit wurde die Gesamtzahl der Kolonien auf dem Membranfilter und dem Endonährboden gezählt. Außerdem unterschieden wir die Anzahl der Kolonien nach ihrer Färbung (typischer Metallglanz, rot, rosa oder weiß).

Alle Kolonien, und zwar ohne Unterschied hinsichtlich Färbung, untersuchten wir mikroskopisch; die gramnegativen, nicht sporenbildenden Stäbchen wurden auf diagnostischen Nährböden identifiziert.

Zur Feststellung der Gegenwart und Anzahl von Enterokokken wurde folgendes Verfahren gewählt:

Aus der Wasserprobe impft man 0,5 ml des nicht verdünnten Wassers auf Membranfilter und 0,5 ml direkt auf Nährböden. Zur Kultivierung wählt man ein Substrat, welches Triphenyl-tetrazoliumchlorid enthält und nach Literaturangaben (Slanetz-Bartley, 1957) sowie nach unseren eigenen Erfahrungen einen guten, hochselektiven Nährboden für Enterokokken darstellt. Der Nährboden ist schwachgelb gefärbt (ähnlich wie Agar). Die Enterokokken wachsen auf ihm als purpurrote Kolonien von durchschnittlicher Größe von 0,5—0,2 mm.

Man kultiviert 24 Stunden bei 37°C und zählt dann mikroskopisch und durch Färbung nach Gram wird festgestellt, ob es sich um grampositive Streptokokken handelt.

Besprechung der Ergebnisse

- a) Vorstehende Versuche mit der neuvorgeschlagenen Methode der Anwendung der Membranfilter sollten in erster Linie feststellen, ob sie als gleichwertig mit der Methode der

der Anwendung der Membranfilter

13

Nr.	Wasser- probe	Anzahl der Kolonien auf		Nr.	Wasser- probe	Anzahl der Kolonien auf	
		Endoboden	Membran- filter			Endoboden	Membran- filter
1	D o n a u w a s s e r	17 (15)	10 (10)	26	D o n a u w a s s e r	2 (1)	3 (3)
2		11 (6)	14 (12)	27		3 (1)	1 (1)
3		5 (3)	8 (4)	28		3 (0)	4 (3)
4		8 (7)	7 (6)	29		2 (0)	3 (3)
5		12 (10)	9 (6)	30		4 (4)	7 (7)
6		3 (2)	6 (2)	31		8 (5)	12 (12)
7		1 (1)	3 (2)	32		4 (3)	13 (13)
8		3 (2)	6 (3)	33		4 (4)	7 (7)
9		6 (6)	12 (8)	34		12 (10)	8 (8)
10		0 (0)	5 (1)	35		9 (5)	7 (7)
11		5 (4)	7 (7)	36		10 (6)	5 (5)
12		6 (5)	5 (4)	37		12 (5)	8 (7)
13		4 (4)	11 (7)	38		12 (11)	10 (10)
14		4 (4)	4 (4)	39		11 (11)	9 (8)
15		4 (4)	5 (5)	40		6 (1)	3 (3)
16		4 (4)	7 (6)	41		10 (3)	4 (3)
17		2 (2)	5 (5)	42		5 (4)	7 (3)
18		4 (4)	5 (4)	43		5 (4)	2 (2)
19		10 (9)	8 (8)	44		5 (4)	9 (5)
20		2 (2)	2 (2)	45		7 (7)	9 (3)
21		6 (6)	8 (8)	46		6 (6)	6 (6)
22		14 (6)	13 (13)	47		4 (4)	6 (6)
23		1 (0)	7 (7)	48		5 (5)	4 (3)
24		7 (3)	7 (5)	49		4 (4)	6 (3)
25		8 (6)	13 (10)	50		9 (7)	10 (7)

Tabelle 1

Anzahl der Kolonien vom Endoboden und vom Membranfilter aus Proben von Flußwasser (Donau) und stehendem Wasser (Teich beim Eisenbründl). In der Klammer nach jeder Nummer ist die Anzahl der Kolonien, die zur Subfamilie Eschericheae gehören, angeführt.

Nr.	Wasser- probe	Anzahl der Kolonien auf		Nr.	Wasser- probe	Anzahl der Kolonien auf	
		TTC Boden	Membran- filter			TTC Boden	Membran- filter
1	D o n a u w a s s e r	4	11	21	D o n a u w a s s e r	0	4
2		0	4	22		3	3
3		8	5	23		0	0
4		6	5	24		0	1
5		1	2	25		3	4
6		7	8	26		2	2
7		3	5	27		1	2
8		3	2	28		2	5
9		5	4	29		0	4
10		5	0	30		2	6
11		1	0	31		11	16
12		0	1	32		10	13
13		0	1	33		9	12
14		1	1	34		16	12
15		0	3	35		6	7
16		1	1	36		6	13
17		2	2	37		6	15
18		0	0	38		10	9
19		1	3	39		8	14
20		1	3	40		14	9

Tabelle 2

Anzahl der Kolonien vom TTC-Nährboden und vom Membranfilter aus Flußwasserproben (Donau). In 10 Wasserproben aus dem Teiche (Eisenbründl) stellten wir in 1 ml Wasser in keinem Falle Enterokokken fest.

direkten Aufimpfung der Probe auf Endoagar empfohlen werden kann. Weiters sollte vergleichend festgestellt werden, wieviele Kolonien, die nicht zur Subfamilie Eschericheae gehören, auf den Membranfiltern und auf Platten wachsen. Drittens sollte geprüft werden, ob die Membranfilter keine Selektivität für *E. coli* aufweisen, wie einige Literaturangaben behaupten (Streeter-Robertson 1960), bzw. wie hoch die prozentuelle Verteilung der Gruppen der Subfamilien Eschericheae auf Membranfilter und auf Nährboden ist.

- b) Soweit es sich um Enterokokken handelt, beobachteten wir nur die Anzahl der Kolonien, die auf Membranfiltern und im Vergleich dazu auf Nährböden kultiviert wurden. Wir bearbeiteten dieses Problem einesteils deswegen nicht, weil wir gegenwärtig die Methode der Bestimmung und Identifikation noch nicht genügend ausgebaut haben, andernfalls bei unserer Routineanalyse des Wassers diese erst in Vorbereitung befindliche Bestimmung noch nicht ausgeführt wird.

- zu a) Die Gesamtzahl der isolierten und identifizierten Kolonien betrug 594. Davon fanden sich 301 auf Membranfiltern und 293 Kolonien auf direkt beimptem Endoagar (siehe Tabelle 1). Schon der erste Blick beweist, daß es sich um fast die gleiche Anzahl der Kolonien handelt und eine statistische Bewertung überflüssig ist.

Von den 301 auf Membranfiltern kultivierten Kolonien gehörten 287, das sind 95,4% zur Subfamilie Eschericheae (Kaufmann 1954). Dagegen gehörten von den 293 aus Endonährböden isolierten Kolonien nur 230, das sind 78,4 %, zur Subfamilie Eschericheae. Dieser Unterschied ist sogar statistisch bedeutend (Tabelle 3).

$F_{\text{theoretisch}}$	für 0,01	0,05
	6,9	3,9
F_{wirklich}	6,9	

Tabelle 3

Dies deutet darauf hin, daß auf der Oberfläche des Endoagars sich eine größere Anzahl anderer Kolonien entwickelt als auf dem Membranfilter, welches durch seine spezifische Struktur und der damit verbundenen Diffusion der Nährstoffe aus dem Boden wahrscheinlich die Entwicklung solcher Kolonien nicht begünstigt.

Insofern es sich um die Selektivität der Membranfilter für *E. coli* handelt, war diese aus unseren Versuchen nicht ersichtlich. Von 287 Kolonien waren zwar 210 (73,1%) *E. coli*, doch erhielten wir ein ähnliches Ergebnis auch auf dem Endoagar, wo von 230 identifizierten Kolonien 164 (71,3%) *E. coli* waren. Das gesamte prozentuelle Vorkommen der Gruppen von Bakterien der Subfamilie *Eschericheae* führen wir in Tabelle 4 an. Die Ergebnisse beweisen, daß beide Methoden gleichwertig sind.

	<i>E. coli</i> (inkl. Alkalescens- Dispar)	<i>E. freundii</i> (inkl. Bethesda- Ballerup)	<i>Aerobacter</i> <i>aerogenes</i>	Cloaca
Endonährboden	71,3	9,2	5,2	14,3
Membranfilter	73,1	5,9	5,5	15,5

Tabelle 4

Das prozentuelle Auftreten der einzelnen Arten der Subfamilie Eschericheae, festgestellt durch Identifikation der auf Endoboden und Membranfiltern gewachsenen Kolonien.

Die Anzahl der Kolonien mit typischem Metallglanz im Vergleich zu den Kolonien mit rosa und anderen Farbtönungen ist bei beiden Methoden praktisch gleich (auf dem Endoboden wuchsen 47% Kolonien, auf den Membranfiltern 48% Kolonien mit Metallglanz).

- zu b) Auf Membranfiltern und TTC-Böden kultivierten wir insgesamt 370 Kolonien grampositiver Kokken (siehe Tabelle 2), davon 158 direkt auf TTC-Boden und 212 auf Mem-

branfiltern. Obwohl auf den letzteren um 54 Kolonien mehr wuchsen, war im Hinblick auf die gesamte Variationsbreite beider Methoden dieser Unterschied statistisch nicht bedeutsam. Er bewies jedoch, daß auch in diesem Falle die Membranfilter die direkte Inkubation auf Nährböden ersetzen können, was aus vielen, vorher erwähnten Gründen vorteilhaft ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die durchgeführten Experimente und die dabei gesammelten Ergebnisse erbrachten die Voraussetzung, daß die neue Anwendung der Membranfilter mit der Methode der Inkubation des Wassers auf der Oberfläche des Nährbodens (Plattenmethode) gleichwertig ist, insofern es sich um die Anzahl der gewachsenen Kolonien handelt. Für die Anwendung im Terrain bedeutet sie jedoch einen Vorteil, da sie Material und Arbeit spart und das Verdampfen des Wassers und das Trocknen des Nährbodens entfällt.

Durch diese Methode kann man leicht und verhältnismäßig schnell die Anwesenheit und Anzahl von Bakterien der Subfamilie Escherichaeae, Enterokokken usw. in einem oder mehreren Millilitern Wasserprobe feststellen. Durch Identifikation der gewachsenen Kolonien kann man weiters den Anteil der *E. coli* und den perzentuellen Anteil der Gruppen von Bakterien der Subfamilie Escherichaeae ermitteln. Dies ist nicht nur für die gesamte Beurteilung des Wassers vom hygienischen Standpunkte bedeutsam, sondern auch für die ständige Kontrolle des Wassers, wobei man über den Grad der Verunreinigung und über die Selbstreinigung informiert wird.

Das Membranfilter kann, nach Fixierung der Kolonien mit Formalin, als Beweismaterial dem Arbeitsprotokoll beigelegt werden.

Auch die Interpretation der Ergebnisse ist genauer, da das Zählen (auch nach eventueller Umrechnung auf 1000 ml) der angewachsenen Kolonien ein genaueres Bild über die im Wasser gegenwärtige Anzahl der Bakterien gibt als die tabellarische Berechnung der wahrscheinlichen Anzahl, die sich auf statistische Erwägungen begründet und bei weitem nicht der tatsächlichen Zahl der Bakterien in der Wasserprobe entspricht.

R e s u m é

Es wurden 90 Proben von Oberflächenwässern (fließendes und stehendes) auf Anwesenheit und Anzahl der Bakterien der Subfamilie

Escherichiae und Enterokokken mittels der Methode der Inkubation direkt auf Nährböden sowie auch durch eine neuartige Anwendung von Membranfiltern untersucht. Das Prinzip der letzteren Methode besteht darin, daß die benötigte Menge der Wasserprobe mit einer Pipette auf ein Membranfilter aufgetragen wird, welches luftblasenfrei einer saugfähigen Unterlage anliegt. Nach Einsaugen des Wassers in die Unterlage legt man das Membranfilter auf einen Nährboden und kultiviert es. Diese Methode ist vorteilhaft bei Untersuchungen von Oberflächenwässern, weil die Probe nicht viel eingengt werden muß. Da das Abtrocknen des Wassers und die Trocknung der Platte entfällt, ist diese Methode insbesondere bei der Anwendung im Terrain günstig.

Auf Grund der durchgeführten Versuche und ihrer Bewertung betrachtet der Autor diese neuartige Verwendung der Membranfilter vorteilhafter als die Plattenmethode.

Literatur

1. Adams R. B.: „Comparison of Standard Dilution and Membrane Filter Methods“. J. Amer. Water Works Ass. 49, 1452, 1957.
2. Aleksandrov V. M.: „Metody sanitarno-gigieničeskich issledovanij“ Medgiz Moskva 1955.
3. „American Standard Methods for Water Analysis“ Sewage and Industrial Wastes, N. Y. 1955.
4. Daubner I.: „Membránové filtre a ich použitie v hydrobakteriologii“ SAV Bratislava 1960.
5. Daubner I.: „Použitie gélu kyseliny kremičitej ako základu bakteriologickej živnej pôdy“ Čsl. hyg. (im Druck).
6. Jeter H. L., Geldreich E. E., Clark H. F.: „Type Differentiation of Coliform Organisms With Membrane Filter Technique“ J. Amer. Water Works Ass. 46, 386, 1954.
7. Karaškevič B.: „Bakteriologische Untersuchungen der Trinkwasser mit Hilfe der Membranfiltern“. Z. Hyg. Infekt. Kr. 5, 140, 1954.
8. Kauffmann F.: „Enterobacteriaceae“ Kopenhagen 1954.
9. Litsky W., Mallmann W., Fifield C. W.: „Comparison of the Most Probable Numbers of Escherichia coli and Enterococci in River Waters“ Amer. J. Publ. Hlth. 45, 8, 1955.
10. McKee J. E., Derby R. L., Noble R. E., Streicher L. (Task Group Report): „Technique of Bacterial Examination of Water With Molecular Filter Membranes“ J. Amer. Water Works Ass. 45, 1196, 1953.
11. Mucha V. „Ulohy výskumu povrchových vôd“, Naša veda 3, 1, 1956.

12. Slanetz L. W., Bartley C. H.: „Evaluation of Membrane Filters for the Determination of Numbers of Coliform Bacteria in Water“ Appl. Microbiol. 3, 1, 1955.

13. Streeter H. W., Robertson D. A. Jr.: „Evaluation of Membrane Filter Technique for Appraising Ohio River Water Quality“ J. Amer. Water Works Ass. 52, 229, 1960.

Anschrift des Verfassers: Imrich Daubner, Institut für experimentelle Medizin der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Abteilung für Hygiene. Abteilungsleiter: Akademiker V. Mucha.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1960

Band/Volume: [1960](#)

Autor(en)/Author(s): Daubner Imrich

Artikel/Article: [Eine neue Methode der Anwendung der Membranfilter 9-19](#)