

Eine Nachweismethode für Salmonellen in der hydrobakteriologischen Routineuntersuchung

W. KOHL, F. ZIBUSCHKA

Einleitung

Der Hydrobakteriologe soll durch seine Untersuchung immer wieder die Fragen nach der Stärke der fäkalen Belastung und dem Ausmaß der hygienischen Bedenklichkeit eines Gewässers beantworten. Seine Aussage ist vor allem dann von Bedeutung, wenn an einem Gewässer ein öffentliches Bad liegt, wenn eine Beeinflussung des Grundwassers bzw. nahegelegener Brunnen anzunehmen ist oder wenn ein Oberflächengewässer als Zwischenträger in der Infektkette einer Zoonose oder einer Haustiererkrankung vermutet wird. Obwohl es an Publikationen über dieses letzte Problem nicht mangelt, zum Beispiel RICHTER (1956), MÜLLER (1957), KNORR (1957), KOHL (1965) und DAX (1965), wird es in seiner Tragweite leider oft verkannt, wodurch die Gefahr besteht, daß Mensch und Tier erkranken und wirtschaftliche Schäden entstehen können. Für die Beurteilung des Ausmaßes der fäkalen Belastung bzw. der hygienischen Bedenklichkeit dient international in erster Linie die Zahl der *Escherichia coli* bzw. der Coliformen. Allerdings ist man über die Toleranzwerte bis in die jüngste Zeit unterschiedlicher Meinung (JAAG, 1966). Die übrigen durch die bakteriologische Untersuchung feststellbaren Kriterien, die Aufschluß über den hygienischen Zustand eines Gewässers geben, wie Vorkommen und Anzahl von *Clostridium perfringens* und der Fäkalstreptokokken, werden in sehr unterschiedlichem Maße zur Beurteilung herangezogen.

Um den hygienischen Zustand eines Gewässers gut zu kennzeichnen, ist es aber notwendig, ein aussagekräftiges Kriterium zur Verfügung zu haben. Dies ist der Nachweis von Salmonellen. Als pathogene Keime stellen die Salmonellen, die vielfach auch heute noch besser unter der Bezeichnung Typhus-, Paratyphus- und Enteritischeime (TPE-Keime) bekannt sind, ein gutes Kennzeichen für die Beurteilung des hygienischen Zustandes eines Gewässers

dar. Der Nachweis von Salmonellen aus dem Wasser heraus, der vor längerer Zeit noch Schwierigkeiten bereitet hat, ist durch die Verbesserung der Nährmedien und der Methodik heute kein Problem mehr. Viele Autoren berichteten in den letzten Jahren über ihre Erfolge beim Nachweis von Salmonellen aus zum Teil experimentell, zum Teil natürlich kontaminierten Gewässerproben. Einige ausländische Institute haben beim Salmonellennachweis aus Gewässerproben bereits große Erfahrung. So berichten zum Beispiel HEINRICH und PULVERER (1959) von 2140 Stämmen, die 35 Typen angehören und aus 230 Proben isoliert wurden. Auch POPP (1963) kann auf 264 isolierte Stämme, wobei 25 Typen beteiligt waren, aus insgesamt 794 Entnahmen hinweisen.

Die angewandten Nachweismethoden waren sehr unterschiedlich. So arbeiteten STRAUCH und MÜNKER (1956) nach der Membranfiltermethode mit darauffolgender Bebrütung der Filter in flüssigen Nährmedien, wobei sowohl Tetrathionat als auch Selenit F-Medium-Leifson Verwendung fanden. Nach zehn- bis zwölfstündiger Bebrütung bei 37 °C wurde auf Desoxycholat-zitrat-Agar sowie auf Brillantgrün-Phenolrot-Agar überimpft. Auch MÜLLER (1965) verwendete Membranfilter, die nachträglich auf Wismutsulfitagar aufgelegt wurden. Dieselbe Autorin berichtete bereits 1947 über ihre Erfolge mit dieser Methode. Der Nachweis glückte jedoch damals nur bei Filtration von 500 ml und nicht bei kleineren Mengen, wenn es sich um Oberflächenwasser handelte. Ebenso wendete BELING (1957) die Membranfiltermethode in Verbindung mit Wismutsulfitagar nach WILSON-BLAIR und Tetrathionatbouillon nach PREUSS an. POHL (1955) zentrifugierte das fragliche Wasser und setzte das Zentrifugat den flüssigen Anreicherungs-nährmedien zu. Nach 24 und 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C wurden Brillantgrün-Phenolrotplatten beimpft. HEINRICH und PULVERER (1959) ermittelten zunächst in Vorversuchen einen optimalen Anreicherungs-nährboden. Sie gingen von einer zehnfach konzentrierten Anreicherungs-nährlösung aus, um größere Wassermengen untersuchen zu können. Diese zehnfach konzentrierte Lösung verdünnten sie durch Zusatz der Wasserproben wieder auf die einfache Konzentration und strichen nach 18 bis 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C aus dem Bodensatz dieser Erstanreicherung eine Öse von 4 mm Durchmesser auf Wismutsulfitagar nach WILSON-BLAIR aus. Nach 48 Stunden erfolgte die Auswertung. Bei zweifacher Anreicherung muß eine ebensolche Öse mit Material auf ein Röhrchen mit 10 ml einfach konzentrierter Nährlösung überimpft und erst am nächsten Tag auf den festen Nährboden ausgestrichen werden. Eventuell kann man noch eine dritte Anreicherung anschließen. Von den festen Nährböden werden — soweit möglich — alle Salmonella-verdächtigen Kolonien isoliert und überprüft. POPP (1963) wendete eine kombinierte Methode an, indem er sowohl direkt auf WILSON-BLAIR-Agar als auch eine doppelte Anreicherung durch-

führte. Dabei verwendete er ebenfalls zehnfach konzentrierte Kaliumtetrathionatbouillon, die er den Wasserproben zusetzte. Nach 48stündiger Bebrütung bei 37 °C filtrierte er durch Membranfilter Co5. Die Membranfilter werden dann in einfach konzentrierte Kaliumtetrathionatbouillon gebracht und 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach 24 und 48 Stunden erfolgt die Ausimpfung auf WILSON-BLAIR-Agar. Der Autor weist darauf hin, daß die Isolierung viel Erfahrung braucht und man anfangs möglichst alle Kolonien prüfen soll, um atypische Kolonien nicht zu verfehlen. So wie HEINRICH und PULVERER (1959) erzielte auch POPP (1963) mit der Selenitanreicherung wesentlich schlechtere Ergebnisse. LIVINGSTONE D. J. (1965) brachte in jene Flaschen, die später die Wasserproben aufnehmen sollten, 12 g eines Pulvers, welches die nutritiven und selektiven Substanzen enthielt, ein und füllte dann bis zu der Marke von 500 ml mit dem zu untersuchenden Wasser auf. Nach einer Bebrütung von 18 bis 20 Stunden bei 37 °C wurde eine Öse mit Material auf SS Agar von Difko überimpft und bei 40 °C 20 bis 24 Stunden bebrütet. Die verdächtigen Kolonien überimpfte er auf Triple Sugar Iron Agar von BBL und Liquid Urea von Oxoid und bebrütete sie bei 37 °C 24 Stunden lang.

Auf der Suche nach einer, den Möglichkeiten des Laborbetriebes der Bundesanstalt für Wasserbiologie und Abwasserforschung entsprechenden Salmonellenachweismethode wurden einige der in der Literatur beschriebenen Methoden versucht. So gut diese einzelnen Methoden auch sein mögen, waren sie dennoch nicht ganz mit den Anforderungen der Untersuchungstätigkeit in Einklang zu bringen. Da die bakteriologische Abteilung zu allen größeren See- und Flußuntersuchungen vorwiegend gemeinsam mit den Abteilungen Biologie und Chemie zwei bis mehrere Tage im Außendienst ist, wobei der Arbeitsrhythmus der Untersuchung weitgehend aufeinander abgestimmt sein soll, ergeben sich besondere Bedingungen. Dies hauptsächlich deshalb, weil in diesen Tagen am Gewässer der Großteil der Zeit für die Probenentnahme gebraucht wird und die Aufarbeitung in einem Behelfslaboratorium in kurzer Zeit erledigt werden muß. Wenn die Untersuchungstätigkeit mehrere Tage in Anspruch nimmt, wirkt sich der Zeitmangel wegen der notwendigen Überimpfungen ganz besonders aus. Es wäre also unmöglich, auch noch eine sehr zeitraubende Salmonellenachweismethode durchzuführen. Insbesondere wäre eine Überprüfung und Isolierung sehr vieler verdächtiger Kolonien undurchführbar, so wie es zum Beispiel HEINRICH und PULVERER (1959) angeben, die bei durchschnittlich zehn Proben einige hundert verdächtige Kolonien isoliert und überprüft haben. Deshalb erfolgte aufbauend auf der von HEINRICH und PULVERER (1959) angegebenen Anreicherungs-nährlösung die Entwicklung einer eigenen Salmonellenachweismethode, die auch unter den ungünstigsten Untersuchungsbedingungen einen Nachweis ermöglicht.

Methodik und Material

Als Untersuchungsmenge dient allgemein 225 ml Wasser, obwohl der Nachweis — wie in vielen Paralleluntersuchungen feststellbar war — auch bei einer Menge von 125 ml sehr oft gelingt. Bei stark abwasserbelasteten Gewässern oder bei Abwässern ist der Salmonellennachweis auch aus viel geringeren Volumina möglich. Die Wassermenge von 225 ml des zu untersuchenden Wassers wird in Babyfläschchen gefüllt, die bereits 25 ml der zehnfach konzentrierten Anreicherungs Nährlösung nach HEINRICH und PULVERER (1959) enthalten. Die Babyfläschchen, die auch in der Anschaffung sehr billig sind, haben den Vorteil, daß sie bereits eine Graduierung aufweisen, die den gestellten Anforderungen völlig genügt. Da die Anreicherungs Nährlösung im Kühlschrank monatelang haltbar ist, läßt sich die Vorbereitung der Fläschchen mit der Nährlösung in eine weniger arbeitsintensive Zeit verlegen. Die zehnfach konzentrierte Anreicherungs Nährlösung nach HEINRICH und PULVERER besteht aus einer Stammlösung mit folgenden Bestandteilen:

- 500,0 ml Aqua dest.
- 50,0 g Liebig's Fleischextrakt
- 100,0 g Caseinpepton Merck
- 15,0 g NaCl
- 10,0 g Dikaliumphosphat

Die Anreicherungs Nährlösung enthält

- 100 g Stammlösung
- 10 g Kaliumtetrathionat und
- 100 g Rindergalle.

Nach der Sterilisation, die drei bis fünf Minuten im Dampftopf erfolgt, wird nach völligem Abkühlen 1,6 ml einer einprozentigen Brillantgrünlösung zugesetzt.

Nach Abfüllen der Anreicherungs Nährlösung in die Babyfläschchen werden diese noch fünf Minuten im Dampftopf erhitzt. Bei Gebrauch füllt man sie bis zur Marke 250 ml (Abb. 1) mit dem zu untersuchenden Wasser, wobei darauf geachtet werden muß, daß zwischen Einfüllen der Wasserprobe und Hineinstellen in den Brutschrank möglichst wenig Zeit vergeht. Wenn vorauszusehen ist, daß diese Zeit einige Stunden betragen wird, ist es zweckmäßiger, die Wasserprobe in einer anderen sterilen Flasche von der Entnahmestelle mitzunehmen und erst kurz vor der Bebrütung in das Babyfläschchen mit der Nährlösung einzufüllen. Nach einer Bebrütungszeit von 18 bis 24 Stunden bei 43 bis 44 °C erfolgt die Überimpfung mit einer 1 ml Pipette auf die Zweit-

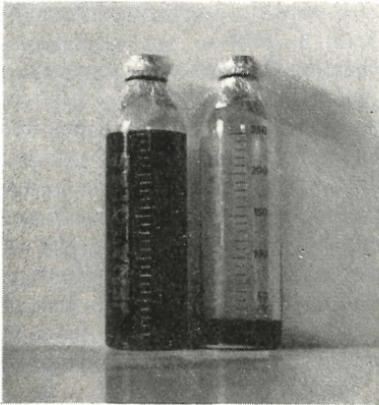


Abbildung 1

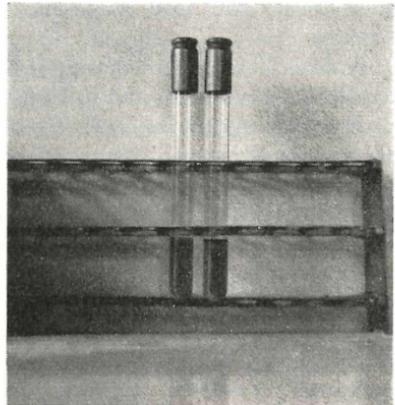


Abbildung 2

anreicherung. Dafür sind zwei Eprovetten mit 5 ml einer einfach konzentrierten Nährlösung erforderlich (Abb. 2). Die Überimpfung erfolgt so, daß man mit der verschlossenen Pipette bis auf den Grund der Erstanreicherung stößt und vom Bodensatz durch kurzzeitiges Abziehen und Aufsetzen des Fingers auf die Pipette – wobei die Pipette an verschiedenen Stellen des Flaschenbodens aufgesetzt wird – einen halben Milliliter Bodensatz aufsteigen läßt. Dieser halbe Milliliter wird in das erste Röhrchen gebracht, gut durchpipettiert und 0,2 ml auf das zweite übertragen. Die Zweitanreicherung in der einfach konzentrierten Nährlösung ist 18 bis 24 Stunden bei 37 ° C zu bebrüten.

Bei der daraufhin folgenden Überimpfung auf den festen Nährboden sind vier Platten des modifizierten Brillantgrün-Phenolrot-Nährbodens erforderlich. Der Brillantgrün-Phenolrot-Traubenzucker-Harnstoff-Nährboden setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 250,0 ml gewöhnlicher Agar 1,5 %
- 7,5 g Traubenzucker
- 0,5 ml Brillantgrünlösung 1 %
- 5,0 ml Phenolrotlösung 0,2 %
- 5,0 g Harnstoff

Die Herstellung ist sehr einfach. Der vorrätig gehaltene gewöhnliche Agar wird gemeinsam mit dem Traubenzucker und der Brillantgrün- und Phenolrotlösung eine Stunde im Dampftopf erhitzt, nach Abkühlen auf 45 ° C der

erforderliche Harnstoff zugesetzt, gut durchgemischt und in Petrischalen gegossen.

Je zwei Platten werden von einem Röhrchen der Zweitanreicherung beimpft. Die Vorgangsweise ist dabei ähnlich wie bei der Erstüberimpfung. Mit einer zunächst verschlossenen 1 ml Pipette stößt man bis auf den Grund des Röhrchens und läßt wieder von verschiedenen Punkten der Kuppe 0,2 ml Bodensatz aufsteigen, die man auf die erste diesem Röhrchen zugehörige Platte in Form eines Impfstiches aufbringt. Dann spatelt man dieses Material, wie auch sonst üblich, aus. Von dem ersten mit der Pipette gezogenen Impfstich, der sehr viel Material enthält, entnimmt man so viel wie auf dem Spatel bleibt und beimpft damit die zweite zugehörige Platte. Daraufhin verfährt man mit dem zweiten Röhrchen der Zweitanreicherung in derselben Weise. Die beimpften Platten werden bei 37 ° C 18 bis 24 Stunden bebrütet und dann auf Salmonella-verdächtige Kolonien geprüft. Dies ist verhältnismäßig einfach, da die Salmonellen auf diesem Nährboden grün wachsen, aus dem Impfstrich in dünner Schicht gleichsam herausrinnen (wie die Abb. 3 zeigt) und daher sehr

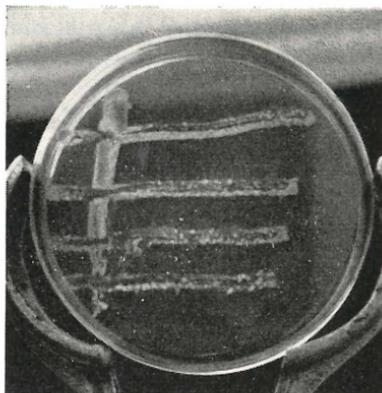


Abbildung 3

leicht zu erkennen sind. Eine Störung durch schwärmende Proteuskolonien ist nicht zu befürchten, da diese den Harnstoff spalten und den Nährboden dann rotviolett verfärben. Außerdem ist die Brillantgrün-Phenolrotplatte in der Lage, das Ausschwärmen des Proteus eine Zeit hindurch zu verhindern. Diese von den Impfstichen herausfließenden Kolonien weisen im Anfangsstadium zum Teil eine finger-, zungen- oder flammenförmige Gestalt auf. Wenn die Bebrütungszeit einige Stunden länger dauert, kommt es auch vor, daß die Platten

zwischen den Impfstriichen beinahe ganz überwuchert sind. Die Gefahr einer Verwechslung mit anderen Keimen besteht für Ungeübte nur mit manchen Pseudomonasarten. Diese Verwechslung läßt sich jedoch leicht und rasch durch eine Cytochromoxydaseprobe ausschalten. Von den herausfließenden Kolonien wird wenig Material entnommen und auf eine Dreifarben-Agar-Platte nach GASSNER (HALLMANN, 1953) überimpft. Da erfahrungsgemäß nicht selten vier bis fünf verschiedene Serotypen aus einer Anreicherung isoliert werden können, ist es empfehlenswert, zehn Kolonien zu überimpfen, um möglichst viele Serotypen zu erfassen. Bei der Überimpfung auf die GASSNER-Platte ist es anzuraten, nach dem Verdünnungssystem auszustreichen, um gleich zu Einzelkolonien zu gelangen. Wenn daraufhin von der GASSNER-Platte Gelbkeime biochemisch und serologisch überprüft werden, wird mit nur wenigen Ausnahmen die Diagnose „Salmonellen“ bestätigt werden.

D i s k u s s i o n

Die Methode hat den Vorteil, nur wenig Zeit in Anspruch zu nehmen. Bei der Entnahme ist durchschnittlich pro Probe mit zehn Minuten auszukommen, außer wenn aus einer großen Tiefe entnommen werden muß. Am zweiten Tag sind für die Überimpfung auf die Zweitanreicherung auch nur zehn Minuten notwendig. Die Zeit für die Überimpfung auf die Brillantgrün-Phenolrotplatten kann man mit fünfzehn Minuten berechnen. Hingegen ist die für die Entnahme von den Brillantgrün-Phenolrotplatten und die biochemischen und serologischen Überprüfungen erforderliche Zeit von der Anzahl der Kolonien und dem Umfang der Differenzierungsreaktionen abhängig und läßt sich daher nicht bestimmen. Die Methode bringt unabhängig von der Jahreszeit, bei hohen und tiefen Außentemperaturen, positive Erfolge und gelingt sowohl bei extrem starker Verschmutzung — wie etwa mit Abwasser — als auch bei höheren Verdünnungen mit Vorfluterwasser. Dies läßt sich am besten am Vergleich der Keimzahlen auf Agar pro Milliliter erkennen. So weist die Donau bei Nußdorf eine Keimzahl von 2400/ml und unterhalb von Wien bei Haslau von 620.000/ml auf. Im Zulauf zur Kläranlage der Stadtgemeinde Wiener Neustadt war eine Keimzahl von 24.000.000 feststellbar. In allen Fällen gelang es mit dieser Methode Salmonellen nachzuweisen. Als wesentlichen Vorteil aber kann man die Tatsache ansehen, daß mit einiger Übung die Salmonellen fast ausschließlich bereits auf der Brillantgrün-Phenolrotplatte zu erkennen sind.

Durch diese einfach zu handhabende Methode ist der Hydrobakteriologe in die Lage versetzt, die Stärke der fäkalen Belastung und das Ausmaß der

hygienischen Bedenklichkeit eines Gewässers eindeutig festzustellen. Dies ist insbesondere bei der hygienischen Überprüfung der Wasserqualität von Badeseen von Bedeutung (GÄRTNER und REPLOH, 1964). Außerdem wird durch diese einfache Methode die Möglichkeit gegeben, epidemiologische Fragen zu klären. Auf die Bedeutung einer konsequenten Salmonellenfeststellung in Oberflächengewässern für die Epidemiologie von Salmonellen haben bereits verschiedene Autoren, zum Beispiel STEININGER (1954) und POPP (1957) hingewiesen.

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

Nach einer kurzen Besprechung anderer Salmonellennachweismethoden wird über eine neue, sehr einfache und zeitsparende Methode berichtet, mit der die bakteriologische Abteilung der Bundesanstalt für Wasserbiologie und Abwasserforschung in Wien-Kaisermühlen sehr gute Erfahrungen gemacht hat. Auf den Aussagewert, den derartige Untersuchungen für eine hygienische Beurteilung haben und auf die Bedeutung für die Epidemiologie der Salmonellose, wird hingewiesen.

L I T E R A T U R

- BELING, A. (1957): Nachweis von Keimen der Salmonella-Gruppe im Abwasser mit Hilfe der Membranfiltermethode auf Wismutsulfidagar. — Zbl. Bakt., I Orig., 170, 137–145.
- DAX, A. (1965): Infektionsgefahr im Betrieb. — Alimenta, H. 4, 153–154.
- GÄRTNER, H., REPLOH, H. (1964): Lehrbuch der Hygiene. — Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- HALLMANN, L. (1953): Bakteriologische Nährböden. — Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HEINRICH, S., PULVERER, G. (1959): Ein Beitrag zur Methodik des Salmonella-Nachweises im Abwasser, Flußwasser und Schlamm. — Ztsch. für Hygiene, 145, 529–542.
- JAAG, O. (1967): Die zunehmende Gefährdung unserer Seen. Warum Gewässerschutz? — Föderation Europäischer Gewässerschutz, Inform. Bl. Nr. 14, 1–10.
- KNORR, M. (1957): Hygiene des Abwassers. — Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie, XIX, 283–309.
- KOHL, W. (1965): Oberflächengewässer als Zwischenträger in der Infektkette bei Haustierkrankungen. — Wasser und Abwasser, Bd. 1965, 177–194.
- LIVINGSTONE, D. J. (1965): An Improved Method for Isolating Salmonellae from Polluted Waters. — Public Health, Febr. 1965.
- MÜLLER, G. (1965): Die Salmonellen im Lebensraum einer Großstadt. — Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, H. 19.

- MÜLLER, G. (1957): Die Infektion von Gemüsepflanzen durch die Beregnung mit häuslichem Abwasser. — Städtehygiene, 8, H. 2, 30–32.
- MÜLLER, G. (1947): Der Nachweis von Keimen der Typhus-Paratyphusgruppe im Wasser. — H. H. Nölke Verlag, Hamburg.
- POHL, G. (1955): Über das Vorkommen von Salmonellen in geklärten Abwässern, ihren Vorflutern, Rieselfeldabflüssen und -drainagen und Klär- und Faulschlamm. — Berl. u. Münch. tierärztl. Wschr., 68, 163–167.
- POPP, L. (1963): Der Nachweis von Salmonellen in Flußwasser und Abwasser. Bewährte Methoden in der Mikrobiologie, Lieferung 3, 16–18.
- (1957): Der Salmonella-Kataster eines Flußgebietes. — Gesundheits-Ingenieur, 78, H. 21/22, 333–335.
- RICHTER, J. (1956): Salmonellen im Vorfluter: Ein örtliches Abwasserproblem. Städtehygiene, 7, H. 5, 101–102.
- STEININGER, F. (1954): Über die Notwendigkeit einer Berücksichtigung freilebender Typhus-Paratyphuskeime in der Abwassertechnik. — Vom Wasser, XXI, 172–185.
- STRAUCH, D., MÜNKER, W. (1956): Bakteriologische Wasseruntersuchung in einem oberhessischen Fluß im Zusammenhang mit in diesem Flußtal aufgetretenen Salmonellainfektionen bei Haustieren. — Berl. u. Münch. tierärztl. Wschr., 69, 205–208.

Anschrift der Verfasser: Tzt. Dr. Werner KOHL, Leiter der Abteilung Bakteriologie, Friedrich ZIBUSCHKA, beide Bundesanstalt für Wasserbiologie und Abwasserforschung, A 1223 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1966

Band/Volume: [1966](#)

Autor(en)/Author(s): Kohl Werner, Zibuschka Franziska

Artikel/Article: [Eine Nachweismethode für Salmonellen in der hydrobakteriologischen Routineuntersuchung 9-17](#)