© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

Wasser und Abwasser Band 35 (1991) 285 290

Aus der Bundesanstalt für Wassergüte, Wien-Kaisermühlen

Herrn Hofrat Univ.-Prof.Tzt.Dr. W. KOHL zu seinem 65. Geburtstag gewidmet.

ZUR METHODIK DES NACHWEISES VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN ABWASSER UND OBERFLÄCHENWASSER

G. KAVKA

Die Bakterienspecies *Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes, gerades Stäbchen mit einer Länge von 1,5 bis 3,0 µm und einem Durchmesser von 0,5 bis 0,7 µm. Sie ist polar begeißelt, selten unbegeißelt. Die Species zeichnet sich durch einen aeroben Stoffwechsel und eine positive Cytochromoxidase-Reaktion aus. Das Wachstumsoptimum liegt bei 37°C, sie zeigt auch Wachstum bei 41 1°C und verwertet Acetamid unter Bildung von Ammoniak. Typisch ist die Bildung von wasserlöslichen Pigmenten (Pyocyanin). Es kommen auch Pyocyanin-negative Stämme vor. *Pseudomonas aeruginosa* kann aus Wasser, Sediment und Boden isoliert werden (KRIEG 1984).

Diese Spezies kommt auch im Trink-, Mineral- und Badewasser vor. Keimträger beherbergen den genannten Keim im Darmtrakt. Sie sind Ursache von Darmentzündungen (Enteritiden) und generalisierten Infektionen bei geschwächten Erwachsenen und Kindern, z.T. als Folge von Verbrennungen; sie können Infektionen an Ohren (Swimmer's ear) und der Haut auslösen (DIN 38411, Teil 8, 1982). *P. aeruginosa* hat Be-

© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

deutung als Krankheitserreger, der durch Wasser verbreitet werden kann. Diese Species kommt auch in Oberflächengewässern vor und stellt eine potentielle Gefahr für den Menschen bei der Nutzung von Gewässern (Rekreation, Baden, Bewässerung etc.) dar.

Der Nachweis in Oberflächengewässern erfolgt quantitativ mittels MPN-Technik, kann aber auch nur qualitativ oder semiquantitativ als Titer durchgeführt werden.

Als Nachweisverfahren hat sich bei Oberflächengewässern nach Vergleichsuntersuchungen das Anreicherungsverfahren gegenüber dem Membranfilterverfahren als überlegen gezeigt.

Eine Unterscheidung zwischen den gesuchten Pseudomonaden und der Begleitflora erwies sich mit dem Membranfilterverfahren häufig als schwierig bis unmöglich. Das Drake's Medium 10 nach ISO 8360-1 (1988) war selektiver und erbrachte die höhere Ausbeute an Pseudomonaden als das Anreicherungsmedium nach DIN 38 411, Teil 8 (1982) (KLÜGL 1993).

Herstellung der Kulturmedien

Anreicherungsmedium:

Drake's Medium 10 (Asparagine broth with ethanol)

Zusammensetzung		(konzentriert)	
DL-asparagine		2	g
L-proline		1	g
Anhydrous dipotassium hydrogen phosphate		1	g
Magnesium sulfate heptahydrate		0,5	g
Anhydrous potassium sulfate		10	g
Ethanol		25	ml
Water (Aqua bidest.)	to	1000	ml

© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

Zusammensetzung		(nicht konzentriert)	
DL-asparagine		3,2	g
L-proline		1,6	g
Anhydrous dipotassium hydrogen phosphate		1,6	g
Magnesium sulfate heptahydrate		0,8	g
Anhydrous potassium sulfate		16	g
Ethanol		40	ml
Water (Aqua bidest.)	to	1000	ml

Bereitung (KLÜGL 1993):

Die einzelnen Bestandteile werden in 1 l Flaschen bis auf das Ethanol eingewogen, es wird mit Aqua bidest. aufgefüllt und so lange kräftig geschüttelt, bis alle Bestandteile gelöst sind. Nun wird das Ethanol zugegeben und der pH-Wert, der bei 7,2 + 0,2 liegen soll, eingestellt. Die Flaschen samt Medien werden mit leicht geöffneten Verschlüssen, die nach der Sterilisation sofort wieder vollständig verschlossen werden müssen, 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Das Medium ist bei Raumtemperatur und Dunkelheit etwa 3 Monate haltbar.

Konfirmationsmedium

Milk agar with cetrimide

Zusammensetzung

Skim milk powder		100	g
Yeast extract broth		250	ml
Agar		15	g
Hexadecyltrimethylammoniumbromide (cetrimide)		0,3	g
Aqua bidest.	to	750	ml

Yeast extract broth:

Bacteriological yeast extract		3	g
Bacteriological peptone		10	g
Sodium chloride		5	g
Aqua bidest.	to	1000	ml

Bereitung:

Der Hefeextrakt wird durch das Lösen aller Bestandteile unter Kochen und anschließender Sterilisation (20 Minuten bei 121°C) hergestellt. Der sterile Hefeextrakt wird danach mit Cetrimid und Agar vermischt und gekocht, bis der Agar vollständig gelöst ist.

© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

In einem separaten Glasgefäß wird das Magermilchpulver in Aqua bidest. unter Rühren mit einem Magnetrührer gelöst und danach werden beide Lösungen getrennt voneinander 5 Minuten bei 121°C sterilisiert.
Die Lösungen werden steril zusammengemischt und im Wasserbad auf etwa 50°C abgekühlt. Die aus 15 ml Portionen gegossenen Platten können bei 4°C etwa 1 Monat aufbewahrt werden.

Nachweisverfahren

Die Anreicherung von *P. aeruginosa* erfolgt im Flüssigmedium (Drake's Medium 10) mittels MPN-Technik (fünf Parallelen pro Verdünnungsstufe). Für stehende Gewässer (Badegewässer) und unbelastete Fließgewässer eignen sich häufig Probenvolumina von 100 ml, 10 ml, 1 ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml, für abwasserbelastete Oberflächengewässer und Abwässer 10 ml, 1 ml, 10^{-1} ml, 10^{-2} ml, 10^{-3} ml etc. 100 ml Probenvolumen werden mit 250 ml, 10 ml Probe mit 25 ml Drakes'Medium (konzentriert), 1 ml Probe bzw. 1 ml einer Verdünnung werden mit 4 ml Drake's Medium (nicht konzentriert) gemischt. Die Ansätze werden anschließend bei 37°C 1°C 48 Stunden lang inkubiert. Positive Anreicherungskulturen zeigen nach der Inkubation Wachstum durch Trübung und Fluoreszenz unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm.

Die Konfirmation von *P. aeruginosa* wird auf Milchagarplatten durchgeführt. Von allen positiven Anreicherungskulturen wird mittels Impföse etwas Material auf Milchagarplatten ausgestrichen. Die Selektivagarplatten werden bei 42°C 24 Stunden inkubiert. Als positiv gelten Kolonien, die Fluoreszenz (UV-Licht, Wellenlänge 366 nm) und Caseinhydrolyse erkenntlich an einem durchscheinenden Hof um die fraglichen Kolonien zeigen. Apocyanogene Stämme werden nicht erfaßt, kommen aber auch nur selten vor.

© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

Die wahrscheinliche Zahl an *P. aeruginosa* wird mit Hilfe des MPN (Most Probable Number)-Verfahrens ermittelt. Wenn keine MPN-Auswertung möglich ist, wird nur eine qualitative Auswertung (z.B. in 100 ml Wasser positiv oder negativ) vorgenommen.

Mit dem empfohlenen Nachweisverfahren konnte *Pseudomonas aeruginosa* aus Abwasser (Ablauf der Hauptkläranlage Wien, 2 Millionen EGW), aus Fließgewässern (Donau, Wiener Donaukanal) und aus stehenden Gewässern (Neue Donau in Wien) isoliert werden.

Im Ablauf der Hauptkläranlage Wien wurden 700-9200 Pseudomonaden, im abwasserbelasteten Donaukanal 220-1700, in der Donau 11-110 und in der Neuen Donau <1 bis 80 Pseudomonaden (KLÜGL 1993) pro 100 ml Wasser nachgewiesen. Die gefundenen Daten sind mit den Literaturdaten gut vergleichbar (BOTZENHART et al. 1975, HOADLEY et al. 1968b).

LITERATUR

BOTZENHART,K., WOLF,R., THOFERN,E. (1973): Das Verhalten von *Pseudonomas aeruginosa* in Oberflächenwasser, Kühlwasser und Abwasser.- Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.B-161, 72-83.

DIN 38 411-Teil 8 (1982): Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K), Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* (K8).

HOADLEY,A.W., McCOY,E., ROHLICH,G.A. (1968b): Untersuchungen von *Pseudomonas aeruginosa* in Oberflächengewässern: II. Auftreten und Verhalten.- Arch.Hyg. 152, 339-345.

ISO 8360-1 (1988): Water Quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* Part.1: Method by enrichment in liquid medium.

KLÜGL,J.: (1993): Identifizierung und Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* in der Donau und der Neuen Donau im Raum Wien und die Beziehung zu anderen Keimen.- Dipl.Arbeit, Inst.f.Mikrobiologie u. Genetik der Universität Wien und Bundesanstalt für Wassergüte, Wien, 110 S.

© Bundesamt für Wasserwirtschaft, download www.zobodat.at

KRIEG,N.R. (1984): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1.- Williams & Wilkins, Baltimore/London.

Anschrift des Verfassers: O.Rat Dr. Gerhard KAVKA, Bundesanstalt für Wassergüte, Schiffmühlenstr. 120, A-1223 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Wasser und Abwasser

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: 1991

Autor(en)/Author(s): Kavka G.

Artikel/Article: Zur Methodik des Nachweises von Pseudomonas aeruginosa in Abwasser und Oberflächenwasser 285-290