

SUBSTRAT KHROMOGENIK-FLUOROGENIK PADA UJI CEMARAN KOLI DALAM AIR

Endang Wahjuningsih

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

Abstrak

Kuantifikasi bakteri koli sangat penting untuk kontrol kualitas air. Prosedur standar yang umum digunakan adalah metode tabung ganda yang mengukur indeks MPN / JPT. Metode ini cukup spesifik tetapi menghabiskan waktu karena memerlukan pemurnian kultur bakteri melalui 3 tahapan uji dan menggunakan lebih dari satu media (substrat).

Penggunaan substrat kromogenik-fluorogenik menghasilkan prosedur uji yang sederhana, cepat, spesifik, sensitif, dan akurat. Enzim yang spesifik hanya dimiliki oleh bakteri uji akan menghidrolisa substrat khromogenik-fluorogenik, melepaskan senyawa khromo-gen yang berwarna atau senyawa fluorogen yang berfluorosensi. Dengan media ini kelompok bakteri koli (koli total) maupun *E coli* (koli tinja) dapat diidentifikasi secara spesifik melalui pengujian simultan dalam waktu 24 jam.

Selain untuk kontrol kualitas air dan makanan (susu, daging atau produk olahannya), metode ini juga digunakan untuk mendeteksi cemaran mikroba dalam produk farmasi dan kosmetik. Berbagai mikroba juga dapat diidentifikasi dengan metode ini antara lain *Enterococci*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Neisseria* dan *Candida*.

Kata kunci : kualitas air, bakteri koli, substrat khromogenik-fluorogenik

PENDAHULUAN

Pengujian air secara mikrobiologi diperlukan untuk mengukur kualitas proses sanitasi dan derajat kontaminasi cemaran mikroba dalam air. Deteksi dan kuantifikasi tidak dilakukan dengan mengukur langsung jumlah cemaran mikroba

patogen (penyebab penyakit) tetapi menggunakan mikroba indikator yaitu bakteri golongan koli, streptococci tinja atau klostridia pereduksi sulfat (Sloat & Ziel, 1991).

Bakteri koli merupakan anggota familia enterobacteriaceae, terbagi dalam kelompok koli non tinja yang terdapat di tanah a.l. *Enterobacter* sp dan kelompok koli tinja penghuni usus yaitu *E coli*. Karena kelompok bakteri ini banyak dijumpai dalam air, mampu bertahan hidup dalam air yang sangat kotor, serta dapat diidentifikasi secara spesifik, maka kelompok bakteri koli digunakan sebagai indikator utama cemaran mikroba dalam air.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) tahun 1975 telah menetapkan standar kualitas air minum yang digunakan untuk konsumsi masyarakat. Peraturan ini mengatur batas minimum sampel yang harus diambil per bulan dan batas maksimum kandungan koli per 100 ml air minum yang sudah diolah (siap minum). Pada tahun 1983, WHO juga telah menetapkan pedoman kualitas air minum yang digunakan di berbagai negara.

Prosedur pengujian kualitas air yang umum digunakan memerlukan pemurnian kultur bakteri yang dilakukan secara bertahap dalam beberapa media sehingga perlu waktu yang panjang. Telah dikembangkan metode baru menggunakan substrat sintetik khromogenik-fluorogenik. Pada metode ini substrat akan dihidrolisa oleh enzim spesifik dari bakteri uji, aktivitas enzimatik diukur dari adanya warna dan/atau fluoresensi (Dahlen & Linde, 1973; Edberg et al, 1990; Manafi & Kneifel, 1991).

Dengan metode ini proses identifikasi dan kuantifikasi mikroba dapat dilakukan secara cepat dan akurat pada media primair. Kombinasi substrat khromogenik-fluorogenik dapat mengeliminasi kebutuhan sub kultur dan rangkaian uji biokimia. Peningkatan kemampuan ini sangat berharga untuk monitoring sanitasi dan kontrol kualitas mikrobiologi air maupun makanan.

MEDIA STANDAR PENGUJIAN BAKTERI KOLI

Mekanisme pengujian kelompok bakteri koli didasarkan pada karakter spesifik yang umum dimiliki oleh bakteri-bakteri dalam kelompok koli, untuk membedakannya dengan bakteri-bakteri lainnya yang tidak termasuk dalam kelompok koli. Penumbuhan kultur & identifikasi spesifik juga dilakukan untuk membedakan bakteri koli dengan anggota familia Enterobiaceae lainnya.

Kelompok bakteri koli menghasilkan enzim α -D-Glucosidase yang berfungsi sebagai katalisator hidrolisa laktosa membentuk gas, asam dan aldehyd. Gas yang terbentuk dapat diamati dengan tabung Durham, sedangkan asam atau aldehyd dengan indikator. Pada pewarnaan Gram kelompok bakteri ini mempunyai sel berbentuk batang, Gram negatif, dan tidak membentuk spora (Greenberg, Clesceri & Eaton, 1992).

Pelaksanaan pengujian bakteri pada umumnya masih menggunakan lebih dari satu tahapan uji dengan lebih dari satu macam media. Pengujian diawali dengan tahapan penumbuhan selektif untuk memisahkan bakteri koli dari bakteri-bakteri lainnya. Setelah kultur bakteri tumbuh optimum baru bisa dilakukan penumbuhan dalam media yang dapat mendeteksi bakteri koli secara spesifik.

Metode pengujian yang umum digunakan adalah metode fermentasi tabung ganda & metode filtrasi. Metode fermentasi tabung ganda (MPN / JPT) mengukur kuantitas bakteri koli melalui perhitungan jumlah perkiraan terdekat (JPT) atau Most Probable Number (MPN). Metode filtrasi mengukur langsung densitas bakteri koli. Kedua metode ini dapat digunakan untuk mengukur jumlah cemaran koli total maupun koli tinja (*E coli*).

Beberapa media standar yang umum digunakan pada pengujian bakteri koli dalam air (Greenberg, Clesceri & Eaton, 1992; Merck, 1996) dapat dilihat pada tabel 1. Selain kandungan sumber nutrisi media juga mengandung bahan-bahan

yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba non koli. Identifikasi bakteri koli diamati dari terbentuknya sebagai hasil hidrolisa enzimatis laktose. Beberapa media juga mengandung bahan-bahan spesifik seperti pewarna atau indikator untuk mengidentifikasi asam atau aldehyd.

Tabel 1
Media Standar Pengujian Bakteri Koli

Media	Prinsip Kerja
Bile Broth	➤ Bile dan brilliant green menghambat mikroba non koli
Brilliant Green Bile	➤ Terbentuknya gas pada 35°C menandai bakteri koli
2% Broth	➤ Terbentuknya gas pada 44°C menandai koli tirja (E coli)
EC Broth	➤ Bile salts menghambat mikroba non intestinal
EC Medium	➤ Terbentuknya gas menandai bakteri koli
EMB	➤ Pewarna menghambat pertumbuhan mikroba non koli
Eosin Methylene- blue Agar	➤ Koloni E coli berwarna hijau dengan kilau metalik dan inti binu hitam
Endo Agar	➤ Sodium sulfite & fuchsin menghambat bakteri Gram +
Endo Agar Base	➤ Koloni koli berwarna merah, pada E coli + kilau metalik
Lactose broth	➤ Terbentuknya gas menandai bakteri koli dan bakteri lactose positif lainnya
Lauryl sulfate broth	➤ Lauryl sulfat menghambat mikroba non koli, nutrisi & dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri & pembentukan gas
Lauryl tryptose broth	➤ Terbentuk gas menandai bakteri koli
m-Endo Agar LES	➤ Lauryl sulfat & deoxycholat menghambat bakteri non koli
	➤ Koloni koli berwarna merah, pada E coli warna merah disertai dengan kilau metalik
m-FC Agar	➤ Bile salts menghambat pertumbuhan bakteri Gram +
	➤ Koloni E coli berwarna binu-binu gelap
MacConkey Agar	➤ Bile salts & kristal violet menghambat bakteri Gram +
	➤ Koloni bakteri koli berwarna merah dengan lapisan luar tampak keruh

Walaupun media-media standar di atas mempunyai karakter yang spesifik, metode pengujian yang umum digunakan (metode fermentasi tabung ganda atau metode MPN) memerlukan lebih dari satu tahapan uji dan menggunakan lebih dari satu media uji. Metode filtrasi dapat dilakukan dalam satu tahapan uji dan satu media bila jumlah cemaran yang ada tidak terlalu tinggi.

A. Pengujian Koli Dengan Metode MPN

Tahap I - Pengujian perkiraan

Tahap ini merupakan uji pendahuluan untuk memperkirakan ada/tidaknya bakteri koli di dalam sampel air. Suatu seri pengenceran sampel ditumbuhkan dalam media lactose broth atau lauryl tryptose broth (lauryl sulfat broth) pada 35°C. Uji dinyatakan positif bila terbentuk gas hasil hidrolisa laktosa oleh enzim bakteri dari kelompok koli.

Beberapa bakteri non koli yang termasuk dalam kelompok “lactose positive bacteria” juga mempunyai enzim yang dapat menghidrolisa laktosa. Media lauryl tryptose broth mengandung senyawa lauryl sulfat yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroba non koli. Dapar fosfat dan kandungan nutrisi tinggi yang ada dalam media ini akan mempercepat pertumbuhan bakteri koli dan meningkatkan pembentukan gas. Keunggulannya ini membuat media lauryl tryptose broth lebih direkomendasikan untuk pengujian koli.

Tahap II - Pengujian penegasan

Tahap kedua berfungsi untuk memastikan bahwa koloni yang tumbuh murni bakteri koli. Kultur positif dipindah ke media BGLB, inkubasi untuk koli total pada 35°C dan untuk *E coli* pada 44°C. Bakteri non koli dihambat pertumbuhannya oleh bile dan brilliant-green yang ada dalam media. Uji dinyatakan positif bila terbentuk gas dalam tabung uji.

Tahap III - Pengujian lengkap

Kultur dari tabung positif dipindah ke media Endo Agar inkubasi pada 35°C. Sodium sulfite dan fuchsin menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Reaksi fuchsin dan aldehyd akan membentuk warna merah spesifik, pada *E coli* disertai kilau hijau-metalik.

Tahap ini juga dapat dilakukan dengan media EMB Agar. Pertumbuhan bakteri Gram positif dihambat oleh pewarna, kombinasi lactose-sucrose digunakan untuk membedakan kelompok lactose-sucrose negative bacteria (*salmonella* & *shigella*) yang tampak transparan & tak berwarna dengan kelompok koli (lactose positive bacteria) yang tampak kehijauan dengan inti gelap (biru-hitam) dan kilau metalik.

Untuk memastikan kemurniannya koloni dipindah ke lactose broth untuk mengamati adanya pembentukan gas, dan ke nutrient agar untuk mengamati adanya bakteri berbentuk batang, Gram negatif, dan tidak membentuk spora yang merupakan ciri-ciri spesifik kelompok bakteri koli.

B. Pengujian Koli Dengan Metode Filtrasi

Metode filtrasi (Membrane Filter Technique) mengukur langsung densitas bakteri koli dalam air. Sampel air dilewatkan pada membran filter bakteri kemudian membran ditempatkan pada media m-Endo Agar LES suhu 35°C. Pertumbuhan mikroba non koli dihambat oleh lauryl sulfate & deoxycholate. Koloni koli akan berwarna merah hasil reaksi dengan fuchsin, pada *E coli* dan *Enterobacter aerogenes* disertai kilau metalik (fuchsin-sheen).

Untuk memastikan adanya koli tinja kultur ditumbuhkan dalam media m-FC Agar pada suhu 44°C. Dalam media yang mengandung rosolic acid ini, bakteri *E coli* akan menghasilkan warna biru dari indikator methylen blue / aniline blue.

Metode filtrasi dapat digunakan untuk pengujian sampel dalam jumlah/ volume besar, hasil langsung menunjukkan densitas bakteri, waktu pengujian lebih singkat, dan mempunyai tingkat keterulangan tinggi. Metode ini umum digunakan dalam monitoring kualitas air sumber & pengolahan air minum. Air limbah harus melalui perlakuan pendahuluan untuk mengurangi kekeruhannya bila akan dilakukan pengujian dengan metode filtrasi.

SUBSTRAT KHROMOGENIK-FLUROGENIK

Komisi Nasional American Public Health Association telah memberikan pengesahan bagi penggunaan substrat khromogenik untuk pengujian cemaran mikroba dalam air pada tahun 1992 (Greenberg, Clesceri & Eaton, 1992). Tidak seperti metode standar yang memerlukan adanya senyawa kimia dalam media untuk menghambat pertumbuhan mikroba non koli, metode ini menggunakan nutrisi yang lebih selektif dan spesifik.

Pada dasarnya substrat khromogenik dan fluorogenik bekerja berdasarkan kemampuannya untuk mendeteksi enzim-enzim spesifik yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri yang ada dalam kelompok koli maupun yang hanya dihasilkan oleh *E coli*. Enzim spesifik dari bakteri ini akan menghidrolisa substrat dan melepaskan aglikon yang bersifat khromogen (berwarna) atau fluorogen (berfluorosensi).

Enzim spesifik yang dapat dideteksi dengan substrat khromogenik - fluorogenik a.l : $\hat{\alpha}$ -D-Galactosidase pada kelompok bakteri koli (Edberg, Allen & Smith, 1991), $\hat{\alpha}$ -D-Glucuronidase pada bakteri *E coli* (Dahlen & Linde, 1973), aminopeptidase pada familia Enterobacteriaceae (Giammanco & Pignato, 1984) dan 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\hat{\alpha}$ -galactosaminide pada *Candida* (Dalton, Haldane, MacDonald, 1989).

Umumnya substrat khromogenik merupakan turunan fenol, dan substrat fluorogenik merupakan turunan coumarin (Manafi, Kneifel & Bascomb, 1991) terdiri dari:

1. Pewarna fluorogenik, yang akan meningkatkan fluorosensi akibat adsorbansi pewarna fluorescent pada DNA atau protein sel bakteri. Contoh: $\hat{\alpha}$ -aniline-1-naphthalene-sul-phonic acid (ANS) dan Acridine-orange.

2. Indikator pH-fluoroscent, yang merubah intensitas fluoresensi atau absorbansi indikator pH, akibat adanya aktivitas enzimatis. Contoh: Acridine dan 7-Hydroxycoumarin.
3. Enzim-substrat kompleks. Enzim bakteri akan menghidrolisa substrat dan melepaskan yang dideteksi dari terbentuknya warna atau fluoresensi. Contoh: o- atau p-Nitrophenol; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- ; 4-Methylumbelliferone-.

UJIKHROMOGENIK-FLUOROGENIKUNTUKKOLI

Pengujian koli total didasarkan pada aktivitas enzim β -D-Galactosidase (β -Gal) yang dimiliki oleh kelompok bakteri koli dan dapat dideteksi dengan substrat: (a) o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), (b) 6-bromo-2-naphthyl-galactopyranoside (BNG), (c) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL), dan (d) 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUGA).

Pengujian *E coli* didasarkan pada aktivitas enzim β -D-Glucuronidase (GUD) yang terdapat pada 96-98% strain *E coli*, kecuali strain 0157: H7 (Killian & Bulow, 1976; Edberg & Kontnick, 1986). Substrat yang dapat digunakan adalah: (a) p-nitro-phenyl- β -D-glucuronide (PNPG), (b) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLU), dan (c) 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG).

Tabel 2

Substrat Khromogenik - Fluorogenik

Substrat:	Jenis:	Hasil Reaksi:	Bakteri positif:
ONPG	Khromogenik	Kuning	Koli total
PNPG	Fluorogenik	Kuning	<i>E coli</i>
X-GAL	Khromogenik	Biru hijau	Koli total
Salmon-GAL	Khromogenik	Salmon - merah violet	Koli total & <i>E coli</i>
X-GLU	Khromogenik	Biru gelap - ungu	<i>E coli</i>
MUGA	Fluorogenik	Fluoresensi-	Koli total
MUG	Fluorogenik	Fluoresensi	<i>E coli</i>

Penggunaan X-GAL atau MUGA lebih direkomendasikan untuk digunakan pada pengujian bakteri koli dalam air (Manafi, Kneifel & Bascomb, 1991), karena turunan nitro-fenolik cenderung berdifusi ke dalam media agar padat.

Media uji dengan substrat khromogenik–fluorogenik untuk pengujian kualitas air antara lain Colilert® yang mengandung ONPG dan MUG. Pertumbuhan bakteri non koli dapat dihambat, ONPG terhidrolisa oleh β -Gal dari bakteri koli membentuk warna kuning, sedangkan MUG terhidrolisa oleh GUD dari bakteri *E coli* menimbulkan fluoresensi biru (Covert et al, 1989; Edberg, Ludwig & Smith, 1991).

Chromocult® Coliform Agar mengandung kombinasi salmon-Gal dan X-Glu. Keberadaan bakteri koli terlihat dari warna salmon-merah hasil hidrolisa Salmon-GAL. Bakteri *E coli* akan menghidrolisa Salmon-GAL dan X-GLU membentuk koloni yang berwarna biru gelap violet. Tergitol menghambat pertumbuhan bakteri non koli (Frampton, Restaino & Blaszkowski, 1988; Manafi & Kneifel, 1989).

Manafi & Kneifel (1989) meneliti kombinasi substrat khromogenik dan fluorogenik untuk pengujian simultan koli total dan koli tinja dalam air, terdiri dari campuran ONPG untuk koli dan MUG untuk *E coli*, campuran X-GAL untuk koli dan MUG untuk *E coli*, serta campuran MUGA untuk koli dan PNPG untuk *E coli*. Hasil terbaik diperoleh pada campuran substrat khromogenik-fluorogenik X-GAL dan MUG di dalam Endo agar atau lauryl tryptose broth. Kombinasi optimum diperoleh pada perbandingan X-GAL : MUG = 60 μ g/ml : 70 μ g/ml untuk lauryl tryptose broth dan 50 μ g/ml : 60 μ g/ml untuk endo agar.

Modifikasi lauryl tryptose broth oleh Manafi & Ossmer menjadi Fluorocult® LMX -Broth menggunakan kombinasi X-GAL dan MUG-LST

terbukti efektif untuk pengujian simultan bakteri koli dan *E coli*. Seluruh kelompok koli tampak berwarna biru-hijau dan *E coli* dapat dideteksi dari adanya fluoresensi biru dalam waktu 24 jam (Ossmer, 1993).

Ossmer (1996) membandingkan penggunaan metode filtrasi dengan m-FC Agar dan m-Endo Agar, terhadap Chromocolt Coliform Agar yang mengandung kombinasi substrat Salmon-GAL & X-GLU. Koloni bakteri koli akan berwarna salmon-merah dari hidrolisa Salmon-GAL, sedangkan X-GLU akan mewarnai koloni *E coli* menjadi biru gelap-ungu.

Dari 100 sampel yang diamati pada media m-FC Agar tidak satupun yang menunjuk kan hasil positif. Pada media m-Endo Agar 13 sampel positif mengandung bakteri koli & teridentifikasi sebagai *E coli*, sedangkan pada media Chromocult Coliform Agar terdapat 34 sampel positif mengandung bakteri koli dan 30 diantaranya mengandung *E coli*.

Hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan substrat khromogenik lebih sensitif dibandingkan substrat standar pengujian air dengan metode filtrasi. Sampel positif yang ditemukan pada penggunaan Chromocult Coliform Agar tidak terdeteksi oleh media m-FC Agar dan hanya terdeteksi < 50% pada media m-Endo Agar.

KESIMPULAN

Kehadiran bakteri koli, khususnya *E coli*, umum digunakan sebagai indikasi cemaran tinja dalam air. Oleh karena itu deteksi dan kuantifikasi kelompok bakteri ini sangat penting pada monitoring sanitasi maupun pengujian kualitas air, makanan, produk farmasi & kosmetik serta penegakan diagnosa klinis.

Kemampuan untuk mendeteksi secara spesifik enzim eksklusif yang dihasilkan oleh bakteri pada penggunaan substrat khromogenik dan fluorogenik,

menghasilkan terobosan besar bagi pengujian mikroba. Metode ini terbukti lebih sensitif, spesifik, dapat dilakukan secara sederhana, dalam waktu singkat, dan menghasilkan pengukuran yang lebih akurat.

Walaupun media yang menggunakan substrat khromogenik-fluorogenik lebih mahal dibandingkan media-media standar lainnya, perlu dipertimbangkan adanya penghematan waktu, jumlah media dan peralatan yang dibutuhkan maupun peningkatan sensitivitas uji. Proses pengujian yang pendek akan sangat diperlukan untuk efisiensi proses produksi.

Sebagian besar mikroba yang ada didalam air berasal dari familia enterobacteriaceae. Beberapa diantaranya (salmonella, shigella) merupakan mikroba patogen penyebab penya kit atau penghasil toksin. Penggunaan substrat khromogenik-fluorogenik juga telah dikembangkan untuk pengujian familia Enterococci (Ellner et all, 1985), Shigella sp (Massenti, Nastasi & Scarlata, 1987), Salmonella sp (Aquirre et all, 1990) dan lain-lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Aquirre PM et all, 1990: Rapid fluorescence method for screening Salmonella sp from enteric differential agars. *J. Clin. Microbiol.* 28:148-149.
- Covert TC et all, 1989: Evaluation of the Autoanalysis Colilert® test for detection and enumeration of total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2443.
- Dahlen G & Linde A, 1973: Screening plate method for detection of bacterial galacturonidase. *Appl. Microbiol.* 26:863-866.
- Dalton MT, Haldane DJM & McDonald J, 1989: Rapid identification of *Candida albicans* using 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-galactosaminide. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 521-523.

- Edberg SC, Allen MJ & Smith, DB, 1991: Defined substrate technology method for rapid and simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from water: Collaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 74:526.
- Edberg SC & Kontrick CM, 1986: Comparison of α -glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 24: 368-371.
- Edberg SC, Ludwig F & Smith DB, 1991: The Colilert® system for total coliforms and *Escherichia coli*. American Water Works Research Foundation, Denver, Colorado.
- Ellner et al, 1985: Preliminary evaluation of a rapid colorimetric method for the presumptive identification of a group A streptococci and enterococci. J. Clin. Microbiol. 22:880-881.
- Frampton EW, Restaino, L & Blaszkowski N, 1988: Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronide (X-GLUC) in a 24-hour direct plating method for *Escherichia coli*. J. Food Prot. 51:402-404.
- Gianmanco G & Pignato S, 1984: Detection of aminopeptidases in Enterobiaceae by three simple chromogenic tests. Ann. Microbiol. (Paris) Sect. B 135:341-346.
- Greenberg AE, Clesceri LS & Eaton AD, 1992: Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation, Washington DC.
- Killian M & Bulow P, 1979: Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84:245-251.

- Manafi M & Kneifel W, 1989: A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliform and *E coli* in water. Zbl. Hyg. 189:225-234.
- Manafi M & Kneifel W, 1991: Fluorogenic and chromogenic substrates – A promising tool in microbiology. Acta Microbiol. Hung. 38(3-4): 293-304.
- Manafi M, Kneifel W & Bascomb S, 1991: Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Reviews 55(3):335-348.
- Massenti MF, Nastasi A & Scarlata G, 1987: A new chromogenic test for the detection of urokinase in the genus *Shigella*. Microbiologica 10:331-333.
- Merck, 1996: Microbiology Manual. Merck. KgaA Darmstadt.
- Ossmer, 1993: Simultaneous detection of total coliforms and *E coli* – Fluorocult® LMX Broth. International Symposium Food microbiology and Hygiene in Rhine.
- Ossmer R, 1993: Simultaneous detection of total coliforms and *E coli* with Chromocult® Coliform Agar. Health-related Water Microbiology Symposium in Spain.