

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene  
-Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. H. Karch-

## **Vergleich des Colilert18/Quantitray-Verfahrens mit der Standardmethode der Trinkwasserverordnung von 2001**

### **INAUGURAL - DISSERTATION**

zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Thoneick, Maurice Ulrich Johannes Leonardus  
aus Geldern  
2006

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Mathys  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Fegeler  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.06

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Karch -

Referent: Prof. Dr. W. Mathys

Korreferent: Prof. Dr. W. Fegeler

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Vergleich des Colilert18/Quantitray-Verfahrens mit der Standardmethode der  
Trinkwasserverordnung von 2001  
Maurice Thoneick

Nach der aktuellen Trinkwasserverordnung kann, alternativ zur Membranfiltration nach ISO 9308-1, das von der Firma IDEXX vertriebene Diagnostiksystem Colilert18 genutzt werden. Ziel dieser Arbeit ist die Bewertung dieses Alternativsystems in Bezug auf das vorgeschriebene Standardverfahren durch quantitativen Vergleich, stichprobenartige Bestätigung der positiven Felder im Colilert18/Quantitray nach den Kriterien der neuen TrinkwV, Beobachtung der zeitlichen Wachstumsentwicklung, Identifizierung von nicht-Zielkeimen, die eine positive Reaktion im Colilert18 ergeben und die Beurteilung des Einflusses dieser Keime auf das Colilert18-Verfahren im Vergleich zur Standardmethode. Ein weiterer Faktor in dieser Arbeit ist die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen Enterokokken und Clostridien in Oberflächenwässern. Das Untersuchungsgut wurde aus dem Münsteraner Aasee, dem Dortmund-Ems-Kanal und aus Trink- und Oberflächenwässern im Bereich Münster und Steinfurt gewonnen. Das Colilertsystem zählte signifikant mehr positive Befund an Gesamtcolilformen, jedoch bei *E.coli* keinen signifikanten Unterschied in beiden Systemen. Die folgende, stichprobenartige Nachuntersuchung des Colilert18 erbrachte eine richtig positive Rate von 71% für Coliforme und eine richtig positive Rate von 87% für *E.coli*.

*Aeromonas hydrophila* und andere Wasserkeime imitieren Gesamtcolilforme durch Gelbfärbung der Trays ohne Fluoreszenz und können so falsch positive Ergebnisse im Quantitray verursachen. Durch Untersuchungen mit Monokulturen konnte eine systembedingte Unterdrückung dieser Keime im Colilert18 nicht nachgewiesen werden. Der ideale Ablesezeitpunkt für die Trays liegt bei 20 Stunden, welches auch die maximale Bebrütungsdauer nach Herstellerangaben ist.

Ein festes Korrelat zwischen Clostridien und Enterokokken ließ sich nicht finden, obwohl ein konstantes Verhältnis innerhalb einer Probe bestand. Clostridien waren zumeist in größerer Anzahl vorhanden.

Das Colilert18/Quantitray-System liefert vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Standardmethode, bestehend aus Membranfiltration, anschließender Bebrütung auf LacTTCAgar mit Tergitol 7 und Differenzierung nach der aktuellen TrinkwV, und stellt eine zeitsparende Alternative dar.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.06

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1	Geschichte der Wasserversorgung.....	3
1.2	Mikrobiologie des Trinkwassers.....	4
1.3	Die Trinkwasserverordnung.....	8
1.4	Problemstellung.....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>14</b>
2.1	Die Probenentnahme.....	14
2.2	Die Colilert18/Quantitray – Methode.....	15
2.3	Folgende Bestätigung der positiven Felder.....	15
2.4	Die Membranfiltration .....	17
2.5	Berechnung der Anzahl von Coliformen/E.coli.....	17
2.6	Vergleich von Colilert18 und Membranfiltration.....	18
2.7	Verdünnungen.....	18
2.8	Die Koloniezahl .....	18
2.9	Identifikation von Colilert18 - positiven Keimen, außerhalb der neuen TrinkwV .....	19
2.9.1	Probenauswahl.....	19
2.9.2	Identifikation mittels des API 20 NE (Fa. Biomerieux).....	19
2.10	Versuche mit Reinkulturen.....	20
2.11	Zeitliche Entwicklung von Colilert18/Membranfiltration .....	21
2.12	Die Relation von Clostridien und Enterokokken zueinander in Oberflächen- und Eigenwässern.....	21
2.13	Der Wilcoxon-Test.....	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1	Bakterien, welche ein positives Ergebnis im Colilert18 verursachen.....	23
3.1.1	„Plesiomonas shigelloides“ .....	23
3.1.2	Aeromonas hydrophila.....	24
3.1.3	„Vibrio parahämolyticus“ .....	24
3.2	Methodenvergleich der Reinkulturen .....	25
3.3	Bestätigungsquote von im Colilert 18 nachgewiesenen Keimen .....	30
3.4	Zeitliche Veränderung von Colilert18 und Membranfiltration.....	31
3.5	Direkter Vergleich von Colilert18/Quantitray und Membranfiltration. ....	34
3.6	Enterokokken-Clostridien.....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
4.1	Schlussfolgerungen .....	51
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>53</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte der Wasserversorgung

Wasser ist Leben. Schon seit Anbeginn der Menschheit ist das Wasser für uns lebensnotwendig. Die Notwendigkeit mit Wasser zu arbeiten ist dabei immer abhängig gewesen von der Neigung des Menschen, sich fest niederzulassen und Gesellschaftsformen zu gründen. Komplizierte Bewässerungssysteme lassen sich schon 3500 Jahre v. Chr. in Mesopotamien nachweisen. Der babylonische König Hammurabi (1728 – 1686 v. Chr.) stellte die ersten Normen für die Nutzung und Wartung der Bewässerungssysteme auf. Zur Bewässerung ihrer Felder nutzte das Volk die Flüsse Euphrat und Tigris und leitete von dort aus Bewässerungswasser auf ihre Felder, um es dort ohne Drainage verdunsten zu lassen mit dem Ergebnis, dass die im Wasser gelösten Substanzen im Boden verblieben (Versalzung) und sich so über die Zeit anreicherten. Ein weiteres Beispiel aus der Geschichte der Wasserversorgung ist das von der Antike bis in die Moderne genutzte Durchflussprinzip. Von der Quelle wurde das Wasser durch die Siedlung geleitet und dann in den Fluss geführt. Die Hygiene war so gesichert, vorausgesetzt, die Bevölkerungsdichte war nicht zu hoch. Von Griechen und Römern, aber auch in Assyrien, Jerusalem, Palästina wurde dieses Prinzip mit Hilfe von Aquädukten praktiziert. Problematisch ist diese Form der Wasserversorgung jedoch bei Siedlungen, welche aufgrund geologischer Gegebenheiten in einer Senke beheimatet sind. Hier ist ein Abfluss nicht mehr möglich. Beispiele hierfür finden sich im Mittelalter, aber auch noch heute in nicht industrialisierten Ländern der 3. Welt. Die Konsequenz waren Seuchen. Die Bekämpfung von auftretenden Seuchen war vor allem im Mittelalter schwierig, da das entsprechende Hintergrundwissen nicht vorhanden war und man die Ursache für solche Epidemien nicht sehen konnte. Max v. Pettenkofer (1818-1901, Hygieniker aus München) vertrat sein Leben lang die Theorie, die Ursache der Cholera wären die „Ausdünstungen eines siechenhaften Bodens“. Das Einatmen dieser Miasmen sollte die Krankheit auslösen. Er forderte in diesem Rahmen eine Boden-sanierung und Reinigung von Kanalisation und Versitzgruben nebst einer Zufuhr von Quellwasser. Diese Maßnahmen führten dazu, dass München im 19. Jahrhundert die gesündeste Stadt Europas wurde. Gegensätzlich dazu stand die Theorie des Kontagiums, dass also etwas Lebendes und Vermehrungsfähiges die Ursache für die Erkrankung sei. Schon im Mittelalter vertrat der italienische Arzt Girolamo Fracastoro diese Meinung, doch seinen Durchbruch erlebte diese Theorie 1892 während der Choleraepidemie in Hamburg, obwohl Robert Koch den Cholerabazillus schon vorher nachweisen konnte. Er wies nach, dass der Bazillus über Wasser übertragen werden konnte und forderte den Schutz von Trinkwasser vor Kontamination. Die Synthese der Theorien von Pettenkofer (Beseitigung von örtlichen Missständen) und Koch

(mikrobiologische Komponente, Quarantäne, Desinfektion, Trinkwasseraufbereitung) legte den Grundstein für die moderne Hygiene. Durch etablierte Hygienemaßnahmen und zunehmende Lebenserwartung steigt in unserer heutigen Gesellschaftsform die Zahl der Menschen, resultierend auch in einem höherem Verbrauch an Wasser und so in einer höheren Umweltbelastung. Als Konsequenz in der Wasserwirtschaft ist ein Kreislaufsystem zur nachhaltigen Sicherung unserer Gesundheit von entscheidender Bedeutung. Wasser soll gebraucht und nicht verbraucht werden. Gelingt es, Wasser wieder völlig zu reinigen, kann es wiederverwendet werden.

## 1.2 Mikrobiologie des Trinkwassers

Trinkwasser ist im allgemeinen keimarm, aber nur selten keimfrei. Bakterien der verschiedensten Gattungen können neben Pilzen, Protozoen und Algen im Wasser vorkommen. So können über das Medium Wasser auch verschiedenste Krankheiten von milden Gastroenteriden bis zu schwerer und lebensbedrohlicher Diarrhö, Dysenterien, Hepatitis oder Typhus übertragen werden (Tabelle 1 zeigt eine Auswahl an Bakterien und deren Eigenschaften in Bezug auf Trinkwasser).

Tab. 1: Auswahl wichtiger Erreger wasserbürtiger Infektionskrankheiten

<sup>1</sup>: kurz: bis zu einer Woche, moderat: 1 Woche - 1 Monat, hoch: über 1 Monat.

<sup>2</sup>: relative Dosis, welche in 50 % der gesunden Probanden zum Krankheitsausbruch führt

Pathogen	Virulenz	Übertragung	Persistenz in Wasser <sup>1</sup>	Cl- Resistenz	Rel. Infektiöse Dosis <sup>2</sup>	Tierreservoir
<i>Campylobacter jejuni</i>	hoch	oral	moderat	niedrig	moderat	ja
<i>Path. E.coli</i>	hoch	oral	moderat	niedrig	hoch	ja
<i>Salmonella typhi</i>	hoch	oral	moderat	niedrig	hoch	nein
<i>Shigella spp</i>	hoch	oral	kurz	niedrig	moderat	nein
<i>V. cholerae</i>	hoch	oral	kurz	niedrig	hoch	nein

Gemein ist diesen Erregern, dass sie hochkontagiös sind und über die Fäkalien von Erkrankten ausgeschieden werden, die dann ins Wasser gelangen können. Typhus und Cholera sind dabei die häufigste Ursache für Trinkwasserepidemien.

Cholera ist eine akute, intestinale Infektion, verursacht durch das Bakterium *Vibrio cholerae*. Es hat eine kurze Inkubationszeit von unter 1 Tag bis zu 5 Tagen und produziert ein Enterotoxin, das einen schmerzlosen, wässrigen Durchfall verursacht, welcher schnell zu einer Dehydratation und auch zum Tode führt, wenn nicht therapiert wird. Dabei erkranken aber nicht alle Infizierten, obwohl das Bakterium 7-14 Tage in den Fäkalien nachweisbar bleibt. Bei Erkrankung verläuft sie in 90% der Fälle mild bis moderat und ist so klinisch schwierig von anderen akuten Formen der Diarrhö zu unterscheiden. 10% der Fälle verlaufen schwer mit starken Formen der Dehydratation. Cholera wird über kontaminiertes Wasser oder Nahrungsmittel übertragen. Große Ausbrüche sind meist die Folge eines verseuchten Brunnens. Nur selten wird der Keim von Person zu Person übertragen. Dabei ist *V.cholerae* ubiquitär in Brackwasser zu finden und nutzt auch den Menschen als Reservoir.

Typhus und Paratyphus wird von *Salmonella typhi* und *S. paratyphi* verursacht. Symptome sind hier mildes bis starkes Fieber, Anorexie, Kopfschmerz, Verstopfung, Diarrhö und Vergrößerung von Leber und Milz. Die Inkubationszeit beträgt hier 1-3 Wochen. Paratyphus fällt generell milder aus. Die Übertragung erfolgt auch hier fäkal-oral durch kontaminiertes Trinkwasser oder durch kontaminierte Nahrungsmittel. Selbst nach Abklingen der Symptome besteht die Gefahr, dass Keime im Wirt persistieren und er somit ein Dauerausscheider wird. Gegenwärtig wird die Zahl der an Typhus Erkrankten von der WHO auf 17 Millionen geschätzt (Stand 2005, WHO). Auch hier besteht die Therapie in einer umfassenden hygienischen Sanierung von Nahrung, sanitären Anlagen, Therapie und Quarantäne der Erkrankten. Die wichtigsten Maßnahmen sind bei Ausbruch eine gesicherte Trinkwasserversorgung, sanitäre Hygiene und Nahrungsmittelhygiene, da der Keim auch auf Nahrungsmitteln 5-10 Tage überleben kann. Eine frühzeitige Diagnostik der Verunreinigung ist unerlässlich.

Typhus und Choleraepidemien sind auch in Deutschland aufgetreten. 1831 traf die Cholera Berlin. Eine erste Ausbreitung zeigte sich an stehenden Gewässern und konzentrierte sich dann auf die Armenviertel und die Umgebung der Krankenhäuser. Es starben 1462 Menschen, etwa 0,6% der damaligen Bevölkerung Berlins. Das prominenteste Opfer war Georg Wilhelm Friedrich Hegel, der am 14.11.1831 in seiner Wohnung starb. 1836 erreichte die Cholera über Spanien, Südfrankreich und Italien ein zweites Mal Deutschland. Anfang August 1836 wurden Ausbrüche im bayerisch-österreichischen Grenzort Mittenwald bekannt, und kurz darauf traten Cholerafälle in München auf. Im April 1892 starben 6000 Menschen in Kabul an Cholera. Über Baku, Tiflis, Moskau und St. Petersburg fand die Seuche ihren Weg nach Hamburg. Am Amerikakai des Hamburger Hafens befanden sich 5000 Einwanderer, die erst eben aus Russland angekommen waren und in Baracken lebten. Mit der Flut gelangten die Fäkalien, welche in die Elbe geworfen wurden, in die 4

Km entfernte Trinkwasser-entnahmestelle, und so nahm die Epidemie am 15.09.1892 ihren Lauf. Noch im August starben täglich 430 Menschen, und erst im September klang die Epidemie ab. Insgesamt erkrankten 17000 Menschen, von denen 8605 starben. Dies war die letzte Choleraepidemie in Deutschland.

Typhus ist noch bis in die heutige Zeit in Deutschland zu finden. Ihre Ausbreitung ist aber durch die aktuellen Hygienebestimmungen und die medizinische Versorgung schnell eingedämmt. 1901 trat eine Typhusepidemie in Gelsenkirchen auf, verursacht durch ein nicht verschlossenes Stichrohr zur Ruhr. Es erkrankten 3200 Personen, von denen 350 starben. 1926 erkrankten in Hannover 2700 Menschen an Typhus und 260 starben. Die Ursache war ungenügend filtriertes Uferfiltrat beim Wasserwerk Rickling.

1949 trat eine weitere Epidemie der Seuche in Waldbröl auf, bei der 127 Anwohner erkrankten und 11 starben. 1998 verursachte *Shigella sonnei* auf einem Zeltplatz im Raum der oberen Donau eine fieberhafte Darminfektion. Durch die einfachen hygienischen Verhältnisse erkrankten 11 von 60 Personen. Die Ursachen für eine Verseuchung des Trinkwassers liegen bei einer unzureichenden Aufbereitung oder Desinfektion des Wassers, unzureichendem Hygienebewusstsein und Unterschätzung der Gefahr von Kontaminationen, Querverbindungen in Leitungsnetzen oder falscher Beseitigung von Abfällen.

Seit nun über 100 Jahren werden coliforme Bakterien und *E.coli* als Indikator für fäkale Verunreinigungen herangezogen. Die sogenannten coliformen Keime und *E.coli* gehören zur Familie der Enterobacteriaceae. Diese Familie definiert sich über folgende Eigenschaften: Gramnegative, gerade, stäbchenförmige, nichtsporenbildende, fakultativ anaerobe, teils bewegliche (begeißelte), teils unbewegliche (unbegeißelte) Bakterien, welche Glucose abbauen, eine negative Cytochromoxidasereaktion hervorrufen und Nitrat zu Nitriten unter anaeroben Bedingungen abbauen.

Coliforme werden definiert als Bakterien aus obiger genannter Familie, welche bei  $36\pm 1$  Grad Celsius Lactose unter Gasbildung vergären können. Sie gehören überwiegend den Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Klebsiella* an.

*E.coli* ist zusätzlich durch folgende Eigenschaften charakterisiert: Vergärung von Lactose, Glutaminsäuredecarboxylase-Aktivität, keine Pigmentbildung auf Nähragar bei achttägiger Bebrütung bei 20 Grad Celsius, negative Cyanid- und Citratprobe, keine Spaltung von Harnstoff und Gelatine, positive Methylrot-Reaktion und negative Voges-Proskauer Reaktion. Zusätzlich bilden die meisten Stämme Indol aus tryptophanhaltiger Bouillon und Gas bei  $44\pm 0.5$  Grad Celsius aus Glucose oder Mannit.

Coliforme sind fakultativ humanpathogen und können neben intra- und extraintestinalen Infektionen Durchfallerkrankungen verursachen, was in ihrer Fähigkeit zur Endotoxinbildung begründet ist. Dazu gehören zum Beispiel enteropathogene *E.coli*

(EPEC), enterotoxinbildende *E.coli* (ETEC), enteroinvasive *E.coli* (EIEC) und enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC).

Enterokokken sind gegenüber *E.coli* oder Coliformen resistenter gegen Chlorung. Enterokokken werden als grampositive, meist paarweise angeordnete Streptokokken definiert, welche sich noch bei einem pH von 9,6 in Kochsalzlösung vermehren können. Sie sind gegenüber Umwelteinflüssen und Gallensalzen weitestgehend unempfindlich. Sie gehören zur Lancefield-Serogruppe D, und man unterscheidet *Enterococcus faecalis*, -*faecium*, -*durans* und -*casseliflavus*. Bei kohlenhydratreicher Ernährung machen sie 50% der normalen Darmflora aus. Sie werden über die Faeces ausgeschieden und können so als Indikator für fäkale Kontamination dienen. In den menschlichen Ausscheidungen kommen sie in deutlich geringerer Anzahl vor als *E.coli*, bei tierischen Fäkalien kann dies umgekehrt sein.

Bei *Clostridium* handelt es sich um anaerobe, sporenbildende, in der Regel grampositive Stäbchenbakterien, die Sulfit reduzieren können. Clostridium lebt ubiquitär im Erdboden, kommt aber auch im Darm als normale Darmflora vor. Die wichtigsten humanpathogenen Keime sind in dieser Gruppe *C. tetani* als Erreger der Tetanus, *C. botulinum* als Erreger des Botulismus, *C.perfringens* als Erreger des Gasbrandes und *C.difficile* als Erreger der pseudomembranösen Kolitis. Neben *E.coli* ist dies die älteste Keimart, welche zur Beurteilung der Trinkwasserqualität herangezogen wird. Die Sporen sind sehr widerstandsfähig und überstehen im Allgemeinen auch die Trinkwasserchlorung. Ferner sind sie regelmäßiger Bestandteil der menschlichen und tierischen Faeces. Im menschlichen Stuhl kann mit einer Menge von 10.000 – 100.000 Clostridien /g gerechnet werden. Die Konzentration liegt dann im Mittel 2-4 log Stufen unter denen von *E.coli*. Der Keim kommt nicht im Grundwasser vor.

Die frühzeitige Erkennung von Verunreinigungen im Wasser ist eine wichtige Aufgabe zur Prävention von Erkrankungen, welche über den Wasserweg übertragen werden. Der Nachweis der spezifischen Krankheitserreger gestaltet sich oft schwierig. Gelangt ein Erreger über die Fäkalien ins Wasser, so wird er erst einmal mehr oder weniger stark verdünnt. Wasser stellt kein gutes Nährmedium dar, weil das Substratangebot und die physikochemischen Gegebenheiten (Temperatur, chemische Belastung, mikro-bielle Besiedlung, Trübung, etc.) nicht das Optimum für den Erreger darstellen. Folglich lässt sich bei Ausbruch einer Epidemie der Erreger oft nur indirekt über Blut, Stuhlproben oder Antikörpertiter ermitteln. Aus diesem Grunde zielt die mikrobielle Diagnostik des Trinkwassers nicht auf den direkten Nachweis von spezifischen, schwierig nachzuweisenden Erregern, sondern auf die Frage, ob eine Wasserprobe fäkal verunreinigt ist oder nicht. Dies geschieht über Markerkeime aus der Gruppe der oben genannten coliformen Keime, da sie einfach nachzuweisen sind. *E.coli* ist als meistens harmloser

Darminbewohner eindeutig fäkalen Ursprungs. Die Gattungen *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* und *Serratia* können auch in der Umwelt vorkommen und sind somit nicht ein unbedingter Beweis für eine fäkale Verunreinigung. Sie können wohl Mängel in der Aufbereitung und im Verteilungsnetz anzeigen. Coliforme Bakterien können bei vorhandenen Nährstoffen und einer Temperatur von über 15° C im Verteilungsnetz wachsen und finden sich auch in Biofilmen, in denen sie geschützt vor Chlorung lange Zeit überdauern können und dann sporadisch im freien Wasser auftreten.

### 1.3 Die Trinkwasserverordnung

Zu Beginn der Verwendung von *E.coli* als Indikator für fäkale Verunreinigung legte man sehr viel Wert auf eine genaue Differenzierung dieses Keimes. Es folgte sodann eine Zeit, in der es schon genügte, dass ein Fuchsinglanz auf Endoagar auftrat, um *E.coli* zu bestätigen. Nach 1945 entwickelte man dann die IMViC-Reihe (4 Untersuchungen zur Klassifizierung von *E.coli* und Coliformen, benannt nach ihren Anfangsbuchstaben), bestehend aus Indolbildung aus Tryptophan, Methylrotprobe, der Voges-Proskauerreaktion (Nachweis von Acethylmethylcarbinol, das bei Zuckerabbau gebildet wird), und Verwertung von Citrat als Kohlenstoffquelle. Die Trinkwasserverordnung von 1975 legte dann fest, dass nur Indolbildung, Glucosespaltung bei 44°C und negative Citratverwertung zur Differenzierung von *E.coli* von Bedeutung sind.

Bei Coliformen Keimen ist das maßgebliche Kriterium die Lactosespaltung zu Gas und Säure. Die Bezeichnung Coliforme ist nur in der Trinkwasserhygiene gebräuchlich. Im klinisch-mikrobiologischen Sinn ist die Bezeichnung obsolet.

Die alte Trinkwasserverordnung von 1990 (s. Tabelle 2) verlangte für *E.coli* nun den Nachweis von:

1. Säure- und Gasbildung aus Laktose bei 36 Grad C
2. negative Oxidasereaktion
3. positive Indolbildung
4. Glucose oder Mannitspaltung bei 44 Grad C zu Säure und Gas
5. fehlende Citratverwertung.

Coliforme Bakterien wurden differenziert als gramnegative, sporenlöse Stäbchen mit:

1. Säure- Gasbildung aus Laktose bei 36 Grad C
2. negative Oxidasereaktion
3. negativer (oder positiver ) Indolbildung
4. positiver (oder negativer ) Citratverwertung

Tab 2. Differenzierungsmerkmale für *E.coli* und Coliforme Bakterien nach der Trinkwasserverordnung von 1995.

	Befund <i>E.coli</i>	Befund coliforme Keime
Oxidase Reaktion	-	-
Indolbildung	+	-(+) <sup>1</sup>
Citratverwertung	-	+(-) <sup>2</sup>
Lactosevergärung (36±1 °C) Säurebildung + Gasbildung	+	+
D-Glucosespaltung (Gas)	+ (24+-4)h	-(+) <sup>3</sup>
Oder Mannitspaltung (44 °C)	+	-(+) <sup>3</sup>
<sup>1</sup> : positive Reaktion möglich <sup>2</sup> : negative Reaktion möglich <sup>3</sup> : positive Reaktion möglich, jedoch nur bei Indol neg. Reaktion		

Die Trinkwasserverordnung von 2001 (Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch) stellt eine Novellierung der alten TrinkwV dar. Sie ist nun seit Januar 2003 in Kraft. Nach der neuen Trinkwasserverordnung von 2001 ist eine Differenzierung von Coliformen und *E.coli* über die Faktoren Indolbildung, Lactosefermentation und Cytochromoxidasereaktion nach Tabelle 3 möglich. Lactosefermentation wird hier nicht mehr nach Säurebildung und Gasbildung spezifiziert, sondern nur noch über Säurebildung. Coliforme werden in der Novellierung zusätzlich über „Besitz des Enzyms  $\beta$ -D-Galactosidase“ und *E.coli* dazu noch über Besitz des für *E.coli* typischen Enzyms  $\beta$ -D-Glucuronidase definiert.

Tab 3: Aktuellen Differenzierungsmerkmale für Coliformen und *E.coli* gemäß der Trinkwasserverordnung 2001.

	Coliforme	<i>E.coli</i>
Oxidase-reaktion	-	-
Indolreaktion bei 44 °C	-	+
Lactosespaltung (Säurebildung)	+	+

*E. coli* ist dabei der wichtigste Parameter. Die Konsequenz der neuen Differenzierung ist ein höheres Nachweisspektrum für Gesamtcoliforme und *E.coli* gegenüber der TrinkwV 1995, welches in vermehrten positiven Befunden resultiert.

Die Diagnostik im Rahmen der Trinkwasserverordnung stellt keine exakte bakteriologische Klassifikation dar, zu der etwa 25-30 unterschiedliche Tests nötig wären. Zugunsten von Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit ist die aktuelle Diagnostik ein informatives Verfahren, das es ermöglicht, rechtzeitige Maßnahmen zu Sanierung einer Verschmutzung zu ergreifen. Bei positivem Testergebnis ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Bakterien fäkalen Ursprungs sind. Es wird gefordert: „Wasser für den menschlichen Gebrauch muss frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein“ (§4 Abs.1 der novellierten Trinkwasserverordnung).

Die Auswahl der Parameter und die Festsetzung von Grenzwerten gehorchen den folgenden Ansprüchen:

- gesundheitlicher Schutz des Konsumenten;
- Schutz von Ansprüchen an die ästhetische Qualität von Trinkwasser;
- Verwendbarkeit bestimmter Materialien, Aufbereitungsmittel oder -verfahren;
- Schutz technischer Einrichtungen im Gesamtsystem der Trinkwassergewinnung;
- Bewahrung und Weiterentwicklung traditioneller Analysemethoden;
- Sichere Desinfektion des Trinkwassers.

Tab. 4: Mikrobiologische Parameter und Grenzwerte der TrinkwV 2001

Parameter	Grenzwert nach TrinkwV 2001
<i>E.coli</i>	0/ 100ml
Coliforme	0/ 100 ml
Clostridien	0 / 100ml
Enterokokken	0 / 100ml

Tab 5: In der TrinkwV 2001 vorgegebene Verfahren zur Untersuchung mikrobiologischer Parameter

Lfd. Nr.	Parameter	Verfahren
1	Escherichia coli (E. coli)	ISO 9308-1
		mit Colilert®-18/Quanti-Tray®
2	Enterokokken	ISO 7899-2
3	Coliforme Bakterien	ISO 9308-1
		mit Colilert®-18/Quanti-Tray®

Die Überschreitung von Grenzwerten führt bei den verschiedenen Keimen zu unterschiedlichen Konsequenzen:

- Positive Befunde für *E.coli* stellen einen akuten Behandlungsbedarf nach §9 Abs. 4 und Abs. 5 der TrinkwV dar.
- Eine Ausnahmeregelung im Falle eines positiven Befundes für Coliforme stellt der §9 (5) dar. Der Grenzwert kann mittelfristig für 30 Tage überschritten werden, so fern das Gesundheitsamt bestätigt, dass es sich um keine Gesundheitsgefährdung für betroffene Verbraucher handelt und die eingeleiteten Sanierungsmassnahmen ein Wiederherstellen der Trinkwasserqualität gewährleisten.

Die Standardmethode nach europäischer Trinkwasser-Norm (EUDWD ISO 9308-1) und nach der Trinkwasserverordnung von 2001 umfasst die Membranfiltration, Inkubation auf einem Tergitol TTC-Agar und die Untersuchung der Bakterien nach Säurebildung bei Lactoseverstoffwechslung, Indolbildung und Reaktion auf Cytochromoxidase (s. Tab.3). Nach der neuen Trinkwasserverordnung ist dieses Verfahren nicht bindend, stellt jedoch die Referenz dar, d.h. eine Ausweichmethode muss gleiche oder bessere Daten liefern.

§ 15 der neuen Trinkwasserverordnung besagt:

„(1) Bei der Untersuchung nach §14 sind die in der Anlage 5 bezeichneten Untersuchungsverfahren anzuwenden. Andere als die in Anlage 5 Nr. 1 bezeichneten Untersuchungsverfahren können angewendet werden, wenn das Umweltbundesamt allgemein festgestellt hat, dass die mit ihnen erzielten Ergebnisse im Sinne der allgemein anerkannten Regeln der Technik mindestens gleichwertig sind wie die mit den vorgegebenen Verfahren ermittelten Ergebnisse und nachdem sie vom Umweltbundesamt in einer Liste alternativer Verfahren im Bundesgesundheitsamt veröffentlicht worden sind.“

Die Verfahren zur Analyse sind standardisiert und in Tabelle 5 aufgeführt.

Ein anderer Ansatz zur Diagnostik von Mikroorganismen als nach ISO 9308-1 liegt in der Aktivität von  $\beta$ -D-Glukuronidase für *E.coli* und  $\beta$ -D-Galaktosidase für Coliforme inklusive *E.coli* (Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996)). Die sogenannte definierte

Substrat Technologie (Edberg et al, 1991) ist nun schon in den USA zur gängigen Methode geworden und ließ auch in den Vereinigten Königreichen vergleichbare Ergebnisse zur Referenzmethode ermitteln (Cowburn, J.K., Goodall, T., Fricker, E.J., Walter, K.S. und Fricker.C.R. (1994), EUDWD ISO 9308-1). Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte eine europaweite Validierung, welche die definierte Substrat Technologie des Colilert18 der Firma IDEXX als gleichwertiges Verfahren deklarierte (Fricker, C.R., Seppo I. Niemela und John v.Lee (2000)). Die beiden Keimarten können so ohne Zusatztests nach der genannten Zeit quantifiziert werden. Um die enzymatische Aktivität der Zielorganismen nun zu messen, setzt man ONPG und MUG (s.u.) ein. Dabei dienen diese Substanzen direkt als Nahrungs- und als Indikatorsubstrat. Coliforme inklusive *E.coli* besitzen das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase, das von ONPG (Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) ortho-Nitrophenol abspaltet. Ortho-Nitrophenol produziert nun einen Farbumschlag nach gelb. *E.coli* wiederum besitzt zusätzlich das Enzym  $\beta$ -D-Glukuronidase, welches MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glukuronid) in 4-Methylumbelliferon und  $\beta$ -D-Glukuronid hydrolysiert. Ersteres verursacht nun eine Fluoreszenz. Pro umgesetztem Substratmolekül entsteht ein chromophores Molekül, so dass die Intensität der Verfärbung direkt mit der Bakterienanzahl korreliert. Es muss ein gewisser Grad der Verfärbung erreicht werden, welcher durch einen Komparator vorgegeben wird. Durch Zugabe dieser Substrate kann nun in einem Quantitray nach 18+2 stündiger Bebrütung durch Zählung der gelben und/oder fluoreszierenden Vertiefung nach einem statistischen Modell die wahrscheinlichste Anzahl (MPN) der vorhandenen Keime errechnet werden.

#### **1.4 Problemstellung**

Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich des Colilert18–Systems der Firma IDEXX gemessen an den Rahmenbedingungen in Münster, mit der Standardmethode nach der neuen Trinkwasserverordnung 2001 (EUDWD ISO 9308-1). Im einzelnen umfasst diese Arbeit folgende Punkte:

1. Quantitativer Vergleich zwischen Membranfiltration und Colilert 18 /Quantitray,
2. Stichprobenartige Bestätigung der positiven Vertiefungen im Quantitray in Anlehnung an die neue Trinkwasserverordnung,
3. Beobachtung der Ergebnisentwicklung beim Colilert18/Quantitray-System im Zeitraum von 15-24 (stündlich) Stunden und im Vergleich dazu Beobachtung der Standardmethode nach der TrinkwV im Zeitraum von 16-40 (2-stündlich) Stunden,
4. Identifizierung von Keimen, welche ebenfalls durch  $\beta$ -D-Galaktosidase oder  $\beta$ -D-Glukuronidase Aktivität im Colilert18 ein positives Ergebnis bewirken,

5. Untersuchung des Einflusses der ermittelten Keime auf das Ergebnis im Colilert18/Quantitray im Vergleich zu der Standardmethode und Keimzahl,
6. Untersuchungen zur Korrelation des Auftretens von Enterokokken und Clostridien in Oberflächenwässern.

## 2 Material und Methode

Proben zur Validierung des Colilert18/Quantitray Systems wurden aus verschiedenen Quellen im Raum Münster entnommen. So wurde das Untersuchungsgut aus dem Aasee, dem Dortmund–Ems-Kanal, aus Nachkontrollen von Trinkwasseranlagen gewonnen oder aus Reinkulturen zusammengestellt. Die Proben besaßen ein Volumen von 2 Litern für die Nachkontrollen und 5 Litern für Aasee- und Kanalproben und wurden in mehreren Ansätzen parallel bearbeitet. Die Proben wurden parallel mit der Standardmethode nach der neuen TrinkwV (2001), der definierten Substrat Methode Colilert18 der Firma IDEXX und auf die Keimzahl untersucht.

Benutzte Reagenzien:

- Lactose TTC-Agar (Heipha 166e)
- Endo-Agar
- Caso Agar (Heipha 307e)
- Oxidase Teststreifen (Biotest 934260)
- Kovacz-Reagenz (Eigenherstellung)
- DEV-Tryptophan Boullion (Eigenherstellung)
- DEV-Agar (Eigenherstellung)
- Membranfilter 0.45µm, Cellulose-Mischester, steril (Millipore MZHAWG 1 01)
- Colilert18/ Quantitray (IDEXX)
- M-CP Agar (Heipha 189e)
- Slanetz-Bartley-Agar (Heipha 2192e)
- Galle-Äskulin-Azid-Agar (Heipha 167e)

### 2.1 Die Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte nach standardisierten Verfahren entsprechend der DIN und wurde vorzugsweise in der Küche oder an einem anderen häufig genutzten Wasseranschluss vorgenommen. Eine Differenzierung zwischen heiß und kalt musste möglich sein. Als erstes wurden eventuell vorhandene Dichtringe, Perlatoren oder Wasserspareinrichtungen entfernt und anschließend der Zapfhahn mehrere Male geöffnet und geschlossen. Dann wurde der Hahn mit einem Gaskartuschenbrenner abgeflammt und das Wasser bis zur Temperaturkonstanz (Messung mit geeichtem Digitalthermometer) laufen gelassen. Das Wasser wurde in sterile 1–2 Liter Glas-gefäße, welche mit Aluminiumfolie am Stopfen gesichert waren, abgefüllt, wobei beachtet wurde, dass das letzte sechstel des Glases leer blieb. Temperatur und sensorische Eindrücke des Wassers

(Trübung, Geruch) wurden sofort notiert. Die Entnahme der Oberflächenwässer aus Aasee und Dortmund-Ems-Kanal erfolgte mit einem Verlängerungsstab und die Abfüllung geschah auch hier in entsprechende sterile Glasgefäße. Bei der Entnahme wurde generell darauf geachtet, dass der Glasstopfen nur außen an der Alufolie berührt wurde und es zu keiner Kontamination durch den Entnehmer kam. Die Dokumentation erfolgte auf einem standardisierten Probenentnahmeprotokoll und die Verwertung der Probe erfolgte innerhalb von 4 Stunden.

## **2.2 Die Colilert18/Quantitray – Methode**

Der Ansatz des Colilert18 erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Das Untersuchungsgut wurde je nach Beschaffungsort entsprechend mit sterilem Leitungswasser verdünnt. Das Probengefäß wurde an der Öffnung zuerst mit einem Bunsenbrenner abgeflammt, dann wurde die Probe in ein von der Firma IDEXX hergestelltes, steriles, mit Entschäumer vorbehandeltes, 100ml Gefäß gegeben und zuletzt das handelsübliche Substrat (ONPG/MUG) der Firma IDEXX hinzugegeben. Die Weiterverarbeitung der hergestellten Lösung erfolgte erst nach mehrmaligem Schütteln und erst dann, wenn sich das Pulver völlig aufgelöst hatte. Die so hergestellte Lösung wurde in ein steriles Quantitray mit 51 Vertiefungen gegeben, anschließend verschweißt und  $19 \pm 1$  Stunden bei  $37 \pm 0.5$  Grad Celsius im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Auszählung der gelben Felder als Indikator für totale Coliforme und die Umrechnung auf die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) anhand der beigelegten Tabelle. Anschließend wurden unter Lichtausschluss die fluoreszierenden Felder mit einer UV-Lampe bei einer Lichtwellenlänge von 366nm sichtbar gemacht, ausgezählt und das Ergebnis in MPN übertragen. Die Ergebnisse wurden für *E.coli* notiert. Als Referenz für Gelbfärbung und Fluoreszenz lag ein von der Firma IDEXX gestellter Komparator vor.

## **2.3 Folgende Bestätigung der positiven Felder**

Hinzukommend wurden im Colilert18-System noch 121 nicht fluoreszierende und 23 fluoreszierende Felder nachuntersucht. Es wurden jeweils alle positiven Segmente eines Quantitrays angestochen. Dies erfolgte, indem die Rückseite des Quantitrays mit 70% Isopropanol wischdesinfiziert und dann mit einer sterilen Inokulations-Einmalnadel (1mm) angestochen wurde. Ein Endoagar stand als Selektivmedium hier zur Verfügung und wurde mittels 3-Ösenausstriches beimpft und dann für  $21 \pm 3$  Stunden bei  $36 \pm 0.5$  Grad Celsius bebrütet. Die so gewonnenen Kulturen wurden dann auf Caso-Agar, Lactose-Röhrchen und Trypton-Tryptophan-Bouillon überimpft, für weitere  $21 \pm 3$  Stunden bei  $36 \pm 0.5$  Grad C (Caso, Lactose) und bei 44 Grad C (Tryptophan) im Wasserbad bebrütet (in Anlehnung an

die TrinkwV). Der nächste Schritt umfasste dann die Cytochromoxidasereaktion, durchgeführt anhand der Caso-Platte entweder mittels eines Oxidastreifens, auf welchen Kulturen aufgebracht wurden oder durch eine Lösung in der Bruchampulle, die auf die Keime aufgeträufelt wurde. Nach 30 Sekunden wurde eine eventuell auftretende Blaufärbung als oxidase-positiv notiert. Die Lactoseröhrchen wurden auf Farbumschlag von lila nach gelb untersucht. Ein positiver Befund wurde als lactosepositiv notiert. Ferner gab man zu der Trypton-Tryptophan-Bouillon einen Tropfen Kovacz-Reagenz und beobachtete, ob sofort ein kirschroter Ring auf der Oberfläche entstand. Bei positivem Befund galt dies als indol-positiv. Durch diese Maßnahmen ließ sich nun die Art des Keimes anhand folgender Tabelle 6 bestimmen.

Tab. 6 Differenzierungskriterien von Coliformen und *E.coli* nach der aktuellen Trinkwasserverordnung 2001.

	Coliforme	E.coli
Oxidasereaktion	-	-
Indolreaktion bei 44 °C	-	+
Lactosespaltung	+	+

Fiel das Ergebnis aus dem Rahmen der in der Tabelle genannten Parameter, so konnte es sich nach der neuen TrinkwV nicht um Coliforme oder *E.coli* handeln.

Die Ergebnisse wurden als Bestätigungsquote berechnet und die Bestätigungsquote errechnet sich durch folgende Formel:

$$X = y/z$$

Y: Anzahl der bestätigten Felder

Z: Anzahl der zu bestätigenden Felder

## 2.4 Die Membranfiltration

Der Ansatz der Referenzmethode nach der aktuellen TrinkwV erfolgte durch das Membranfiltrations-System der Firma Millipore unter Einhaltung des geforderten Ablaufs. Die Filter (0.45 µm.) wurden mit einer sterilen Pinzette auf ihre vorher durch einen Bunsenbrenner abgeflamten Saugelmente gelegt. Die durch Millipore hergestellten Becher, passend zu diesem System, wurden dann auf die Saugelmente gestülpt und je nach Herkunft der Probe mit einer verdünnten oder unverdünnten Lösung befüllt. Die Verdünnung erfolgte auch hier mit sterilem Leitungswasser. Die Lösung wurde dann mit Unterdruck durch die Filter gesogen und anschließend nach Entfernen der Becher mit einer sterilen Pinzette auf einen Lactose-TTC-Agar mit Tergitol7 gebracht. Die Bebrütung erfolgte für 21+3 Stunden bei 36±0.5 Grad. Die auf dem Filter entstandenen gelben/orangefarbenen Kolonien wurden dann auf Säurebildung untersucht, die sich durch einen Farbumschlag von grün nach gelb bemerkbar machte. So identifizierte Kolonien wurden entnommen und auf einen Endo-Agar überimpft, der für weitere 21+3 Stunden bebrütet wurde. Die gewonnenen Kolonien wurden nach dem oben bereits beschriebenen Verfahren weiterverarbeitet und der Keim nach der obiger Tabelle 6 differenziert und in KBE/100ml angegeben. Die ermittelten Ergebnisse von Membranfiltration und Colilert18 wurden dann verglichen.

### 2.4 Berechnung der Anzahl von Coliformen/E.coli

$$x = k/n * z$$

k: die Zahl der bestätigten, ausgewählten charakteristischen Kolonien.

n: die Zahl der zu bestätigenden ausgewählten charakteristischen Kolonien

z: die Anzahl aller charakteristischen Kolonien

## 2.5 Vergleich von Colilert18 und Membranfiltration

Zum direkten Vergleich standen 198 Proben und deren Ergebnisse zur Verfügung. Die Proben stammten aus Nachkontrollen, Aaseeproben und Kanalproben. Zur Auswertung wurden die Proben nach Entnahmedatum in Nachkontrollgruppen geordnet.

Nachkontrollgruppe:

- 1: 141 Proben aus Nachkontrollen
- 2: 7 Proben aus Nachkontrollen
- 3: 6 Proben aus Nachkontrollen
- 4: 4 Proben aus Nachkontrollen
- 5: 3 Proben aus dem Aasee
- 6: 3 Proben aus dem Aasee
- 7: 2 Proben aus dem Aasee
- 8: 4 Proben aus dem Aasee
- 9: 14 Proben aus dem Dortmund-Ems-Kanal
- 10: 7 Proben aus dem D-E-Kanal
- 11: 10 Proben aus dem D-E-Kanal.

Gruppe 1-4 bestehen demnach aus Eigenwässern, Gruppe 5-11 aus Oberflächenwässern.

## 2.6 Verdünnungen

Wie bereits beschrieben, wurden die Proben gemäß ihrer Herkunft entsprechend verdünnt. Die Aaseeproben wurden in Verdünnungen von 1:1000 oder 1:500 für Coliforme verarbeitet. Um Clostridien oder Enterokokken zu diagnostizieren, wurden 1:2, 1:5 oder 1:10 Verdünnungen angefertigt. Die Kanalproben verdünnte man für Coliforme 1:2 oder 1:5 im Colilert18 und bei Membranfiltration 1:5 oder 1:10. Clostridien und Enterokokken wurden 1:1, 1:2 oder 1:5 verarbeitet. Nachkontrollen wurden nur in Ausnahmefällen verdünnt. Im Falle von Probe Nummer M1867 erfolgte die Verdünnung bis 1:50 für Coliforme. Clostridien und Enterokokken wurden immer unverdünnt verarbeitet.

## 2.7 Die Koloniezahl

Die Koloniezahl wurde mittels eines Endoagars oder eines Plattengussverfahrens jeweils für 20 und 36 Grad Celsius ermittelt. Nach Beschriftung wurde 1ml der Probe mit einer sterilen Pipette in leere, sterile Petrischalen pipettiert und ein zuvor aufgewärmter und 15 – 20 ml verflüssigter DEV-Agar aus Eigenherstellung in die Schale gebracht. Die Temperatur des Agars wurde manuell, sensorisch überprüft und sollte handwarm sein, so dass die Temperatur die Keimzahl nicht negativ beeinflussen konnte. Es wurde die Verfestigung des Agars abgewartet und dieser dann bei  $20\pm 2$  Grad Celsius und für  $36\pm 2$  Grad Celsius für  $44\pm 4$  Stunden bebrütet. Die Zeit zwischen Agarzugabe und Bebrütungsbeginn überstieg

nie 15 Minuten. Die Auszählung erfolgte unter der Lupe (8-fach) und wurde in KBE/ml angegeben.

## **2.8 Identifikation von Colilert18 - positiven Keimen, außerhalb der neuen TrinkwV**

### **2.8.1 Probenauswahl**

Um Keime, welche nach der obigen Tabelle als nicht Coliforme oder nicht- *E. coli* identifiziert wurden, zu erkennen, wurde eine neue Probe aus dem Dortmund-Ems Kanal gezogen und im Colilert18 nach oben beschriebenen Ablauf im Quantitray untersucht. Hier wurden nun alle nicht fluoreszierenden, gelben Vertiefungen nach oben genannten aseptischen Kautelen angestochen, auf Endplatten gebracht, für 21+3 Stunden bei 36±0.5 Grad bebrütet und anhand der zu beobachtenden Morphologie in Monokulturen differenziert, die dann auf Caso –Platten inokuliert und noch einmal zu den genannten Bedingungen inkubiert wurden. Die so gewonnenen Monokulturen wurden dann der Oxidasereaktion unterzogen und sofern positiv mittels des API 20 NE der Firma Biomerieux bestimmt. Es wurden so 50 API 20 NE angesetzt, von denen 37 zu auswertbaren Ergebnissen führten. Die ermittelten biochemischen Codes und deren Bewertung durch die Software wurden tabellarisch erfasst.

### **2.8.2 Identifikation mittels des API 20 NE (Fa. Biomerieux)**

Hierzu erfolgte die Verarbeitung der Proben nach Vorgabe des Herstellers. Die Wanne wurde mit 5ml zusatzfreiem Wasser gefüllt und der API 20 NE Streifen eingelegt. Mittels einer Pipette wurden dann 2ml destilliertes Wasser in ein steriles Glasgefäß gebracht, dieses dann mit 1-4 morphologisch identischen Kolonien von der Casoplatte beimpft und nach Homogenisierung auf eine McFarland-Trübung von 0.5 eingestellt. Das so gewonnene Inokulum konnte nun mit einer sterilen 5ml Einmalspritze und Kanüle aufgezogen und die Röhrrchen mit Kaliumnitrat, Tryptophan, Glukose, Arginin, Harnstoff, Äsculin, Gelatine und PNPG gefüllt werden. Es wurde darauf geachtet, dass die Röhrrchen keinerlei Lufteinschlüsse hatten und nicht vollständig befüllt wurden, um spätere Reagenzienzusätze zu ermöglichen. 2 ml der verbliebenen Suspension wurden dann in das mitgelieferte API NaCl 0.85% Medium 2ml pipettiert, homogenisiert und wieder in eine Einmalspritze aufgezogen. Die restlichen Röhrrchen (Glukose bis Phenylacetat) wurden so befüllt, dass eine konvexe Oberfläche an der Röhrrchenöffnung entstand. Zuletzt wurden die Röhrrchen GLU, ADH, und URE mit Paraffinöl hoch abgedeckt. Die Streifen wurden bei 29±2 Grad C für 24±2 Stunden inkubiert, abgelesen, weitere 24±2h bebrütet und dann nochmals abgelesen. Die Auswertung geschah nach Maßgabe des mitgelieferten Auswertungsbogens. Die Spontanreaktionen GLU, ADH, URE, ESC, GEL, und PNPG

wurden sofort notiert. Die Kaliumnitratreaktion konnte erst nach Zugabe der Reagenzien NIT 1 + 2 anhand einer dann innerhalb von 5 Minuten einsetzenden Rosarotfärbung bewertet werden. Geschah dies, galt der Test als positiv, bei Ausbleiben der Färbung war der Test negativ. Eine eventuelle Weiterverarbeitung mit Zinn-Reagenz war zu keiner Zeit notwendig, da dieser Test immer positiv ausfiel. Die TRP-Reaktion konnte erst beurteilt werden, nachdem ein Tropfen James-Reagenz hinzugegeben wurde. Bei sofortiger Rosafärbung galt dieser Test als positiv, bei Ausbleiben der Färbung als negativ. Die Assimilationsreaktionen waren mit einem Minimalmedium beimpft, so dass hier nur ein Wachstum, bemerkbar als Trübung, auftrat, wenn die Bakterien das entsprechende Medium verstoffwechseln konnten. Das Ergebnis wurde als Zahlencode notiert und der Keim mit der Identifikationssoftware identifiziert. Teilweise konnte eine Identifikation erst nach 48 Stunden erfolgen. Um zu bestätigen, dass der Keim nun auch eine positive Reaktion im Colilert18 verursacht, wurde eine Kolonie jedes der 3 identifizierten Keime in 9ml NaCl verdünnt, 1ml zu 100ml sterilem Leitungswasser gegeben und das Colilert18 3 mal angesetzt.

## 2.9 Versuche mit Reinkulturen

Ziel dieses Arbeitsschrittes war zu untersuchen, ob es durch das Colilert18 zu einer Unterdrückung des Keimwachstums von nicht-Coliformen kommt. Zur Untersuchung wurden Reinkulturen aus der Institutskeimsammlung oder Wildstämmen, identifiziert durch das API 20NE, genutzt. Eine Kolonie eines Keimes wurde in Verdünnungsröhrchen (NaCl 9ml) gebracht und dann mittels eines Mixers so homogenisiert, dass die Kolonie nicht mehr sichtbar war. Dann wurde jeweils ein ml in ein nächstes Röhrchen pipettiert, so dass die Konzentration in Zehnerpotenzen so lange verdünnt wurde ( $10^{-1}$  -  $10^{-10}$  bzw.  $10^{-4}$  –  $10^{-12}$ ), bis man die gewünschte Konzentration erreicht hatte. Die so gewonnene Lösung wurde als Monokultur zuerst membranfiltriert, um eine günstige Keimkonzentration zu finden und ggf. dann in mehreren parallel laufenden Ansätzen weiterbearbeitet. Konkret erfolgte der Ansatz von zwei parallelen Versuchen. Im ersten Versuch wurden die Keime *A. hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* und *Vibrio parahämolyticus* in Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-10}$  jeweils in ein Quantitray auf einen Endoagar und einen Membranfilter auf Lactose TTC-Agar eingesät. Im zweiten Versuch wurde, zusätzlich zu den eben genannten Keimen, noch der institutseigene *Aeromonas hydrophila* ATCC 25622 in einer eigenen Verdünnungsreihe mituntersucht. Die Verdünnung erfolgte hier von  $10^{-4}$  bis  $10^{-12}$ . Die Ergebnisse aus Colilert18 und der Koloniezahl auf Endoplatte, sowie Colilert18 und Membranfiltration wurden miteinander in Beziehung gebracht und durch den Wilcoxon-Test für paarige Ergebnisse statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag hier bei  $p: 0,05$ .

Um die Identität des Keimes nochmals zu sichern, erfolgte nach dieser Versuchsreihe eine Rückbestätigung der Keime mittels des API 20NE.

## **2.10 Zeitliche Entwicklung von Colilert18/Membranfiltration**

Die vom Hersteller vorgeschlagene Bebrütungszeit liegt bei  $19 \pm 1$  Stunde. Um die Ergebnisse des Colilert18 und der Membranfiltration in Bezug zur Zeitachse zu untersuchen, erfolgte der Ansatz von 12 Quantitrays, wobei 2 in einem Zeitraum von 15 – 20 Stunden stündlich und nach 24 Stunden abgelesen und 10 Quantitrays nach 20 und nach 24 Stunden abgelesen wurden. Die Trays 1 - 2 und 3 - 12 entsprachen jeweils derselben Probenentnahme. Besonderes Augenmerk wurde auf die Veränderungen im Bereich von 19h auf 20h und von 20h auf 21h gelegt. Parallel dazu erfolgte der Ansatz von 3 Membranfiltern auf Lactose TTC-Agar über einen Zeitraum von 16 – 24 Stunden, die zweistündlich und dann noch nach 40 Stunden abgelesen wurden. Die Proben wurden aus dem Aasee entnommen und vor Ansatz der Trays und Membranfilter entsprechend verdünnt. Die Ergebnisse wurden dann notiert und verglichen.

## **2.11 Die Relation von Clostridien und Enterokokken zueinander in Oberflächen- und Eigenwässern**

Zusätzlich zu diesem Thema wurde noch untersucht, ob es eine Abhängigkeit bzw. ein Verhältnis zwischen der Anzahl von Clostridien und Enterokokken in Oberflächenwasser gibt. Zu diesem Zwecke wurden Aaseewasser und Kanalwasser untersucht. Die Proben wurden membranfiltriert (Clostridien 500 ml und Enterokokken 1000 ml) und anschließend für Enterokokken auf einen Slanetz-Bartley Agar (Bebrütung 44 Stunden bei  $36 \pm 0.5$  Grad) und für Clostridien auf einen 24 Stunden vorreduzierter M-CP-Agar (Bebrütung  $36 \pm 3$  Stunden bei  $44 \pm 1$  Grad) gebracht. Wurden nach dieser Zeit auf dem Slanetz-Bartley Agar kirschrote Kolonien gefunden, dann erfolgte die Weiterverarbeitung, indem der Filter auf einen auf  $44 \pm 1$  Grad vorgewärmten Galle-Aeskulin Agar aufgebracht und anschließend noch für 1 h bei selbiger Temperatur inkubiert wurde. Enterokokken können Galle-Äskulin verstoffwechseln, färben sich so von rot nach schwarz und werden anschließend ausgezählt. Der M-CP Agar wurde nach Bebrütung nach typisch gelben Kolonien untersucht. Bei positivem Befund wurde die Platte unter einem Abzug für 30 sek. mit Ammoniak bedampft. Verfärbten sich die gelben Kolonien rot, so wurden diese als Clostridien gewertet.

10 Aasee- und 17 Dortmund-Ems-Kanal-Probenansätze wurden angesetzt und auf drei Versuche verteilt (2 mal 3 Proben und einmal 4 Proben). Die Kanalproben wurden in 17 Proben auf 3 Versuchsanordnungen aufgeteilt. Versuchsanordnung 1 bestand aus 5,

Anordnung 2 bestand aus 10 Versuchen und Anordnung 3 aus 2 Versuchen. Die gewonnenen Daten werden auch tabellarisch in Tabelle 21 und 22 (Ergebnisse) wiedergegeben. Ausgezählt wurden die Keime in koloniebildenden Einheiten auf einen Liter. Zusätzlich erfolgte die Berechnung des Verhältnisses der Keimzahlen, sofern möglich, untereinander durch Division KBE Clostridien/ KBE Enterokokken und Bildung des Quotienten. Mittelwerte wurden nur gebildet, wenn Clostridien und Enterokokken innerhalb einer Probenanordnung gefunden wurden.

## 2.12 Der Wilcoxon-Test

Die Nullhypothese  $H(0)$  lautet:

$H(0)$ : Colilert 18 und Membranfiltration nach ISO 9308-1 liefern gleiche Ergebnisse.

Die Alternativhypothese  $H(1)$  lautet:

$H(1)$ : Colilert 18 und Membranfiltration nach ISO 9308-1 liefern unterschiedliche Ergebnisse.

Der Wilcoxon-Test ist ein nicht parametrischer Test für Paardifferenzen und berücksichtigt die Größe der Differenz der gemessenen Werte. Dies geschieht, indem den Absolutbeträgen der Differenzen Rangzahlen zugeordnet werden. Die kleinste Differenz bekommt die Rangzahl 1, die größte die Rangzahl  $n$ . Gleiche Rangzahlen werden summiert und durch die Anzahl der gleichen Ränge dividiert ( $n + n + \dots$  / Anzahl der Ränge). Nulldifferenzen werden nicht berücksichtigt. Danach bildet man die Summe der positiven Rangzahlen,  $R(+)$ , und die Summe der Rangzahlen der negativen Ränge,  $R(-)$ . Offenbar gilt:

$$R(+) + R(-) = n(n+1)/2.$$

Dies kann als Rechenkontrolle gelten.

$R(+)$  ist die Teststatistik, welche im Wilcoxon-Test eingesetzt wird. Die Verteilung von  $R(+)$  unter der Nullhypothese lässt sich berechnen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p=0,05$  festgelegt. Die Quantilen liegen also bei 0,025 und 0,975. Durch SPSS konnten die Grenzen des zugehörigen Verwerfungsbereichs ermittelt werden. Liegt die Prüfgröße  $R(+)$  nun innerhalb dieses Bereiches- darf die Nullhypothese nicht verworfen werden. Liegt sie aber darüber oder darunter, muss die Alternativhypothese greifen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bakterien, welche ein positives Ergebnis im Colilert18 verursachen

Es wurden drei Wasserbakterienarten, die aus Oberflächenwasserproben gewonnen wurden, neben den Gesamtcoliformen und *E.coli* auf ihr Verhalten im Colilert18 überprüft. Da das Differenzierungsergebnis von Umweltkeimen im API 20NE System nicht immer zuverlässige Ergebnisse liefert, werden die Differenzierungsergebnisse bei nicht gesicherter Diagnose in Anführungszeichen gesetzt. Sie dienen somit als Kurzbezeichnung für ein bestimmtes biochemisches Profil. Die Probenauswahl geschah nach den Kriterien wie im Kapitel „Material und Methode“ beschrieben. Die Cytochromoxidasereaktion und die Säurebildung aus Lactose ist in allen Fällen positiv.

1. „*Plesiomonas shigelloides*“,
2. *Aeromonas hydrophila*,
3. „*Vibrio parahämolyticus*“

##### 3.1.1 „*Plesiomonas shigelloides*“

Im API 20 NE konnte dieser Keim mit einer Sicherheit von 97,8 - 99,9% bei zweifelhafter bis ausgezeichneter Selektivität identifiziert werden. Die Codierungen aus dem API 20 NE werden in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Identifizierungsergebnisse des API 20 NE

Keim	API 20 NE Codierung	Befund	Befundanzahl	Lac/Oxidase/ Indolbildung
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3160754/	Ausgezeichnete Selektivität Sicherheit von 99.9 %	5	+/+/+
	3160744/	Sehr gutes Ergebnis Sicherheit 99.9%	3	+/+/+
	7360344/	Zweifelhaftes Ergebnis	1	+/+/+
	7160744/	Ausgezeichnetes Ergebnis Sicherheit 99.9%	4	+/+/+
	7160754/	Ausgezeichnetes Ergebnis Sicherheit 99.9%	3	+/+/+
	7560744/	Sicherheit 97.8%	1	+/+/+

Dieser Keim verursachte eine Gelbfärbung ohne Fluoreszenz im Colilert 18 und imitiert so Gesamtcoliforme.

### 3.1.2 *Aeromonas hydrophila*

*Aeromonas hydrophila* konnte mit einer Sicherheit von 47 – 99,9 % bei zweifelhafter, geringer, guter und sehr guter Selektivität identifiziert werden. Tabelle 8 zeigt die Codierungen aus dem API 20 NE und deren Bewertung.

Tab. 8 Identifizierungsergebnisse des API 20 NE

Keim	API 20 NE Codierung	Befund	Befundanzahl	Lac/Oxidase/ Indolbildung
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5567744	Gutes Ergebnis Sicherheit 98,8 %	4	+/+/-
	5467744	Geringe Selektivität Sicherheit 96,5%	1	+/+/-
	7567744	Sehr gutes Ergebnis	1	+/+/+
	5467704	Geringe Selektivität Sicherheit 96,6%	1	+/+/-
	5567747	Geringe Selektivität Sicherheit 81,7%	1	+/+/-
	7167744	A. hydrophila 63,3% V. parahämolyticus 22%	1	+/+/+
	7477545	Geringe Selektivität Sicherheit 87,8%	1	+/+/+
	7367745	Geringe Selektivität Sicherheit 47,1%	1	+/+/+
	3167746	Unakzeptierbares Ergebnis	1	+/+/+

*Aeromonas hydrophila* kann ebenfalls eine Gelbfärbung im Quantitray erzeugen und so falsch-positive Befunde verursachen.

### 3.1.3 „*Vibrio parahämolyticus*“

Akzeptierbare bis zweifelhafte Ergebnisse mit 49 – 88,1 % Sicherheit kamen durch das API 20 NE zustande. Tabelle 9 zeigt die API 20 NE Codierungen und deren Befund.

Tab. 9 Identifizierungsergebnisse des API 20 NE

Keim	API 20 NE Codierung	Befund	Befundanzahl	Lac/Oxidase/ Indolbildung
<i>Vibrio parahämolyticus</i>	5467744	Zweifelhaftes Ergebnis	3	+/-/-
	5427744	Zweifelhaftes Ergebnis Sicherheit 65%	1	+/-/-
	5467704	Geringe Selektivität Sicherheit 96,5%	1	+/-/-
	3067744	Zweifelhaftes Ergebnis Sicherheit 88,1%	1	+/-/+
	5026744	Akzeptierbares Ergebnis V.Parahämolyticus 49% V. alginolyticus 41%	1	+/-/-
	3067746	Unakzeptierbares Ergebnis	1	+/-/+

Auch dieses Bakterium verursachte eine Gelbfärbung ohne Fluoreszenz und besitzt somit  $\beta$ -D-Galactosidase- Aktivität.

### 3.2 Methodenvergleich der Reinkulturen

Das Verhalten von *Aeromonas hydrophila*, „*Plesiomonas shigelloides*“ und „*Vibrio parahämolyticus*“ in den Diagnostiksystemen Colilert18, Membranfiltration sowie Bebrütung auf Lactose TTC Agar und dem Inokulat auf Endoagar und deren Verhältnis zueinander wird in folgenden Tabellen verdeutlicht.

Tab.10 Asymptotische Signifikanzen für den Methodenvergleich der Reinkulturen

Versuch/Keim	Koloniezahl/Endo - Colilert	Membranfiltration- Colilert18
1/ „ <i>P.shigelloides</i> »	,317	,028
1/ <i>A.hydrophila</i> Wildstamm	1,00	1,00
1/ „ <i>V.parahämolyticus</i> “	,715	,465
2/ <i>A.hydrophila</i> ATCC 25622	,008	,008
2/ <i>A.hydrophila</i> Wildstamm	,138	,007
2/ „ <i>P.shigelloides</i> “	,046	,750
2/ „ <i>V.parahämolyticus</i> “	,026	,715

Im ersten Versuch zeigte „*Plesiomonas shigelloides*“ ein signifikant höheres Wachstum im Colilert18 als bei der Membranfiltration. Die Koloniezahl auf der Endoplatte und die Keimzahlen im Colilert18 zeigten aber keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 10).

Der zweite Versuch hingegen zeigte ein umgekehrtes Bild. Hier lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich Koloniezahl auf Endoagar und Colilert18 nachweisen. In diesem Falle war die Koloniezahl/Endoagar signifikant erhöht, zwischen Membranfilter und Colilert18 zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die genauen Zahlen sind in Tabelle 11 für den ersten Versuch mit „*P. shigelloides*“ und in Tabelle 12 für den zweiten Versuch mit diesem Keim nachfolgend aufgeführt. Die ersten 3 Verdünnungen im 2. Versuch konnten statistisch nicht berücksichtigt werden, da die Verdünnungen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  auf der Endoplatte nicht auswertbar waren. Die asymptotischen Signifikanzen beziehen sich nur auf die übrigen Verdünnungsstufen.

Tab.11: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen „*P.shigelloides*“ beim Colilert18 und der Membranfiltration und Berbrütung auf LacTTCaAgar, sowie der KBE auf Endoagar.

„ <i>P.shigelloides</i> “		Versuch 1	
Verdünnung	Colilert18	Membranf/LacTTCaAgar	Koloniezahl/Endoagar
$10^{-1}$	>200,5 MPN	>200 KBE/100ml	>200 KBE/100ml
$10^{-2}$	>200,5	>200	>200
$10^{-3}$	>200,5	>200	>200
$10^{-4}$	>200,5	7	>200
$10^{-5}$	>200,5	>200	>200
$10^{-6}$	>200,5	56	>200
$10^{-7}$	>200,5	50	>200
$10^{-8}$	>200,5	13	>200
$10^{-9}$	>200,5	42	>200
$10^{-10}$	165,2	4	>200

Tab.12: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen „*P.shigelloides*“ beim Colilert18 und der Membranfiltration und Berbrütung auf LacTTC- Agar, sowie der KBE auf Endoagar.

„ <i>P.shigelloides</i> “		Versuch2	
Verdünnung	Colilert18	Membranf/LacTTCAgar	Koloniezahl/Endo
10 <sup>-4</sup>	0 MPN	80 KBE/100ml	n.auswertbar
10 <sup>-5</sup>	0	10	n.auswertbar
10 <sup>-6</sup>	0	1	n.auswertbar
10 <sup>-7</sup>	1	0	2 KBE/100ml
10 <sup>-8</sup>	0	0	3
10 <sup>-9</sup>	13,7	0	13
10 <sup>-10</sup>	0	0	9
10 <sup>-11</sup>	0	0	2
10 <sup>-12</sup>	1	0	4

*Aeromonas hydrophila* zeigte im ersten Versuch als Wildstamm ein gleich starkes Wachstum auf allen 3 Nährmedien und es gab somit keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Inokulat auf der Endoplatte und Colilert18 einerseits und dem Membranfilter auf Lactose TTC-Agar und Colilert18 andererseits (s. Tab. 10, 13 ). Im 2. Versuch war das Wachstum des Wildstammes auf dem Membranfilter signifikant geringer als im Colilert18/Quantitray. Der Vergleich von Koloniezahl/Endoagar und Colilert18/Quantitray ließ aber keinen signifikanten, statistischen Unterschied erkennen (s. Tab. 10,14). In der zweiten Versuchsreihe konnte auch das Wachstumsverhalten des institutseigenen *Aeromonas hydrophila*-Stammes ATCC 25622 untersucht werden. Signifikante Unterschiede zeigten sich sowohl zwischen Colilert18 und Membran-filter/LacTTCAgar und Colilert18 und der Einsaat auf Endoagar. Es konnte in keiner Verdünnung im Colilert18 /Quantitray ein Wachstum dieses Keimes beobachtet werden (s.Tab 15).

Tab.13: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen *Aeromonas hydrophila*/Wildstamm beim Colilert18 und der Membranfiltration und Berbrütung auf LacTTCAgar,sowie der KBE/100ml auf Endoagar.

<i>A. hydrophila</i> (Wildst.)		Versuch1	
Verdünnung	Colilert18	Membranf./LacTTCAgar	Koloniezahl
10 <sup>-1</sup>	>200 MPN	>200 KBE/100ml	>200 KBE/100ml
10 <sup>-2</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-3</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-4</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-5</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-6</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-7</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-8</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-9</sup>	>200	>200	>200
10 <sup>-10</sup>	>200	>200	>200

Tab. 14: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen *Aeromonas hydrophila*/Wildstamm beim Colilert18 und der Membranfiltration und Berbrütung auf LacTTCAgar, sowie der KBE/100ml auf Endoagar.

<i>A. hydrophila</i> (Wildst.)		Versuch2	
Verdünnung	Colilert18	Membranf./LacTTCAgar	Koloniezahl/Endo
10 <sup>-4</sup>	>200,5 MPN	0 KBE/100ml	>>200KBE/100ml
10 <sup>-5</sup>	>200,5	0	>>200
10 <sup>-6</sup>	>200,5	0	>>200
10 <sup>-7</sup>	>200,5	0	>200
10 <sup>-8</sup>	>200,5	0	140
10 <sup>-9</sup>	129,8	0	136
10 <sup>-10</sup>	129,8	104	116
10 <sup>-11</sup>	118,4	72	82
10 <sup>-12</sup>	47,8	43	47

Tab.15 Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen *Aeromonas hydrophila*/ATCC 25622 beim Colilert18 und der Membranfiltration und Bebrütung auf LacTTCAgar,sowie der KBE/100ml auf Endoagar.

<i>A.hydrophila</i> (ATCC 25622)			
Verdünnung	Colilert 18	Membranf/LacTTCAgar	Koloniezahl/Endo
10 <sup>-4</sup>	0 MPN	>200 KBE/100ml	>200 KBE/100ml
10 <sup>-5</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-6</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-7</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-8</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-9</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-10</sup>	0	>200	>200
10 <sup>-11</sup>	0	156	140
10 <sup>-12</sup>	0	90	82

„*Vibrio parahämolyticus*“ wuchs im ersten Versuch gleichmäßig und ohne signifikanten Unterschied auf allen 3 Medien (s. Tab. 16).

Tab. 16: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen mit „*Vibrio parahämolyticus*“ beim Colilert18 und der Membranfiltration und Bebrütung auf LacTTCAgar ,sowie der KBE/100ml auf Endoagar.

„ <i>V.parahämolyticus</i> “		Versuch1	
Verdünnung	Colilert 18	Membranf/LacTTCAgar	Koloniezahl/Endo
10 <sup>-1</sup>	>200,5 MPN	>200 KBE/100ml	>200 KBE/100ml
10 <sup>-2</sup>	>200,5	>200	>200
10 <sup>-3</sup>	>200,5	>200	>200
10 <sup>-4</sup>	>200,5	>200	>200
10 <sup>-5</sup>	>200,5	>200	>200
10 <sup>-6</sup>	>200,5	>200	>200
10 <sup>-7</sup>	162,2	152	>200
10 <sup>-8</sup>	36,4	54	35
10 <sup>-9</sup>	38,4	36	33
10 <sup>-10</sup>	50,4	8	30

Die 2. Versuchsdurchführung mit „ *Vibrio parahämolyticus*“ zeigt ein differenzierteres Bild. Colilert18 und die Bebrütung des Membranfilters auf einem Lactose TTC-Agar sind ohne signifikanten Unterschied. Der Keim wuchs jedoch signifikant besser im Colilert18/Quantitray als nach Inokulation auf Endoagar (s. Tab. 17).

Tab. 17: Vergleich positiver Resultate von Verdünnungen von „ *Vibrio parahämolyticus*“ im Colilert18 und der Membranfiltration und Bebrütung auf LacTTCAgar, sowie der KBE/100ml auf Endoagar.

V.parahämolyticus	Versuch 2		
Verdünnung	Colilert 18	Membranf/LacTTCAgar	Koloniezahl/Endo
10 <sup>-4</sup>	>200,5 MPN	>200 KBE/100ml	0 KBE/100ml
10 <sup>-5</sup>	109,1	120	0
10 <sup>-6</sup>	109,1	60	0
10 <sup>-7</sup>	28	31	33
10 <sup>-8</sup>	2	4	5
10 <sup>-9</sup>	0	0	3
10 <sup>-10</sup>	0	0	3
10 <sup>-11</sup>	0	0	1
10 <sup>-12</sup>	0	0	1

### 3.3 Bestätigungsquote von im Colilert 18 nachgewiesenen Keimen

Coliforme und *E.coli* wurden nach den im Kapitel „Material und Methode“ vorgestellten Verfahren auf die Sicherheit der richtig positiven Befunde im Colilert18 gemäß der Differenzierungsmerkmale der Trinkwasserverordnung 2001 untersucht. Es zeigte sich, dass die Keime, welche aus gelben, nicht fluoreszierenden Segmenten des Quantitray extrahiert wurden, zu 71% als Coliforme bestätigt werden konnten. Keime, welche aus gelben, fluoreszierenden Feldern aus dem Tray entnommen wurden, konnten zu 87 % als *E.coli* bestätigt werden (s. Tab. 18). *E.coli* konnte also mit einer höheren Sicherheit als Gesamtcoliforme durch die Kriterien Lactosespaltung, Oxidasereaktion und Indolbildung bestimmt werden.

Tab. 18: Darstellung der Anzahl an vermuteten E.coli und Coliforme im Colilert18 und der Anzahl an bestätigten Keimen durch die Oxidasereaktion, Lactosespaltung und Indolbildung gemäß TrinkwV 2003.

	pos. Befunde(z)		bestätigte Befunde(y)	
	<u>Colif.</u>	<u>E.coli</u>	<u>Colif.</u>	<u>E.coli</u>
	20	0	12	0
	3	0	2	0
	15	0	12	0
	20	0	13	0
	0	1	0	1
	26	0	13	0
	4	0	4	0
	1	0	1	0
	32	7	29	7
	0	15	0	12
Summe	121	23	86	20
Bestätigungsquote (y/z)			0,71	0,87

Wenn Proben aus dem Colilert nicht als *E. coli* oder Coliforme bestätigt wurden, so lag dies häufig daran, dass sie bei der Weiterverarbeitung Lactose nicht verstoffwechselten und dieses Differenzierungsmerkmal somit negativ ausfiel.

### 3.4 Zeitliche Veränderung von Colilert18 und Membranfiltration

Die ideale Bebrütungszeit liegt laut Hersteller bei  $19 \pm 1$  Stunden. Eine Untersuchung erfolgte gemäß den Angaben im Kapitel „Material und Methode“. Die Veränderungen in Anzahl von gelben Segmenten sind in folgender Tabelle 19 dargestellt. Die durchschnittliche Zunahme der Anzahl an gelben Segmenten der 12 Quantitrays betrug von 19h auf 20h 3,42 Segmente. Von 20h auf 21h betrug die durchschnittliche Differenz 1 Segment.

Tab 19: Zunahme der Anzahl der gelben Segmente im Quantitray über einen Zeitraum von 15h – 24h.

Colilert	Felder/h							
Coliforme	Bebrütungszeit							
Nr.	15h	16h	17h	18h	19h	20h	21h	24h
1	1	1	1	2	2	2	2	2
2	3	3	3	3	3	4	4	4
3					34	40	41	
4					34	39	43	
5					38	42	42	
6					42	46	46	
7					40	43	44	
8					22	25	28	
9					28	31	32	
10					22	26	26	
11					24	28	29	
12					20	24	25	
Durchschnittliche Differenz						3,42	1	0

Tab 20. Zunahme der Anzahl an gelben, fluoreszierenden Segmente im Colilert18 über einen Zeitraum von 15h- 24h.

E.coli	Felder/t							
	Bebrütungszeit							
	15h	16h	17h	18h	19h	20h	21h	24h
1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	1	1	1	1	2	2
3					6	6	6	
4					7	7	7	
5					11	12	12	
6					9	10	10	
7					7	7	8	
8					6	6	6	
9					1	1	1	
10					2	2	2	
11					4	4	4	
12					2	2	2	
Durchschnittliche Differenz						+0,16	0,16	0

Fluoreszierende und gelbe Segmente als Indikator für einen positiven *E.coli*- Befund nahmen in ihrer Anzahl deutlich weniger zu. Sowohl beim Schritt von 19h auf 20h und beim 20h auf 21h stieg deren Zahl um 0,16 Segmente. Zwei Proben wurden noch bei 24 Stunden abgelesen. Es ließen sich hier keine Veränderungen in der Anzahl der gelben und gelben/fluoreszierenden Segmenten mehr verzeichnen (Tab. 19, 20).

Das Keimwachstum wurde noch auf Membranfiltern, welche auf einem Lactose TTC-Agar mit Tergitol 7 bebrütet wurde, beobachtet. Das Wasser entstammte der Probe aus Tabelle 19, 20, Nummer 1 und 2. Von 18 auf 20 Stunden veränderte sich die Anzahl von KBE /100ml um durchschnittlich 0,34. Im Zeitraum von 20-22 Stunden veränderte sich die Anzahl im Mittel um 1 KBE. Dann blieb bis nach 24 Stunden ein weiteres Wachstum aus. Die Anzahl der Kolonien blieb konstant. Nach 40 Stunden stieg die Zahl der Kolonien noch einmal um durchschnittlich 2,34 KBE/100ml (Tab. 21).

Tab. 21 Zunahme der Anzahl an gelben, koloniebildenden Einheiten auf Membranfiltern über einen Zeitraum von 16h – 40h.

Membranfilter						
gesamt Colif.	KBE/100ml					
	t(h)					
Nr.	16h	18h	20h	22h	24h	40h
1	3	3	3	4	4	7
2	2	2	3	4	4	6
3	2	2	2	3	3	5
d.Veränderung		0	0,34	1	0	2,34

### 3.5 Direkter Vergleich von Colilert18/Quantitray und Membranfiltration.

Es wurden 198 Proben, die bei erster Analyse positiv auf *E.coli* und/oder Gesamtcoliforme befundet wurden, miteinander verglichen. Es ließen sich bei der statistischen Auswertung der Daten hiervon 90,9%/ 180 Werte direkt miteinander vergleichen. 9%/18 Werte konnten nicht verwertet werden, da entweder das Ergebnis aus dem Colilert18/Quantitray oder aus der Membranfiltration mit anschließender Differenzierung nach der aktuellen Trinkwasserverordnung von 2001 (ISO 9308-1) nicht valide (s. u.) war. Die statistische Analyse erfolgte durch den Wilcoxon-Test /SPSS. Diese Werte wurden in der Gesamtheit und nach Wasserquelle ausgewertet. Die Gesamtauswertung zeigt Unterschiede für *E.coli* und Gesamt-Coliforme. Für den Vergleich von *E.coli* ergaben sich zwischen den Methoden keine signifikanten Unterschiede für  $p=0,05$ , wie die folgende Tabelle 22 zeigt; Gesamtcoliforme wurden aber signifikant mehr im Colilert18 nachgewiesen.

Tab. 22 Asymptotische Signifikanzen für den Methodenvergleich aller Proben

	Coliforme Colilert-ISO 9308-1	E.coli Colilert-ISO 9308-1
Asymp.Sig. (2-tailed)	,000015	,399

Der nächste Schritt beinhaltete die genaue Auswertung der Nachkontrollgruppen 1-11, wie in „Material und Methode“ angegeben. Der Wilcoxon-Test deklarierte Werte, welche mit „nicht auswertbar“ angegeben waren, als invalide, so dass manche Quellen bis zu einer einzigen validen Probe zusammenschumpften und nicht ausgewertet werden konnten. Dies traf auf die Gruppen 5 und 8 zu. Als nicht auswertbar galten Membranfilter, welche ein

zu starkes Wachstum aufwiesen, so dass eine Auszählung nicht möglich war. Nachfolgende Tabelle 23 zeigt die asymptotischen Signifikanzen für die Nachkontrollgruppen.

Tab. 23: Asymptotische Signifikanzen für den Methodenvergleich der einzelnen Nachkontrollgruppen

Nachkontrollgruppe	Coliforme Colilert18-ISO 9308-1	E.coli Colilert18-ISO 9308-1
1 asym.Sig	,051	,866
2	,593	1,0
3	,109	1,0
4	,068	,715
6	,655	1,0
7	,317	1,0
9	,345	,042
10	,715	,144
11	,005	,838

Nachkontrollgruppe 1,2,3,4,6,7,10 wiesen keine signifikante Unterschiede sowohl für *E.coli* als auch bei Gesamcoliformen auf. Gruppe 9 hingegen zeigte signifikante Unterschiede beim Nachweis von *E.coli*. Colilert18 konnte hier mehr Keime nachweisen. Gesamcoliforme waren in ihrer Anzahl ohne signifikanten Unterschied in den beiden zu testenden Methoden. Die 11. Nachkontrollgruppe ließ ein umgekehrtes Bild erkennen. Gesamcoliforme wurden signifikant mehr im Colilert18 nachgewiesen, wogegen es keine solche Unterschiede im Wachstum des *E.coli* gab. Nachkontrollgruppe 9 und 11 wurden aus dem Dortmund-Ems-Kanal entnommen.

Nachfolgende Tabelle 24 beinhaltet die genaue statistische Auswertung bezüglich der Mittelwerte, Standard Deviation, der Minima und Maxima und die validen und invaliden Werte.

Tab. 24 Statistische Auswertung der Nachkontrollen.

Quelle	Membranfiltration Coliforme	Colilert18 Coliforme	Membranfiltration E.coli	Colilert18 E.coli
Gesamt.:				
N valid	183	195	183	195
Missing	15	3	15	3
Mean	206,02 KBE/100ml	479,36 MPN	91,27 KBE/100ml	139,38 MPN
Std.Dev.	1078,18 KBE/100ml	2651,86	679,46 KBE/100ml	792,27 MPN
Min.	,00 KBE/100ml	MPN	,00 KBE/100ml	,00 MPN
Max.	11500 KBE/100ml	,00 MPN 22650 MPN	8500 KBE/100ml	6200 MPN
1.				
N valid	141	141	141	141
Missing	0	0	0	0
Mean	19,1489 KBE/100ml	19,297 MPN	4,269 KBE/100ml	1,77 MPN
Std.Dev.	106,99 KBE/100ml	,101,372	42,395 KBE/100ml	17,02 MPN
Min.	,00 KBE/100ml	MPN	,00 KBE/100ml	,00 MPN
Max.	1000 KBE/100ml	,00 MPN 1000 MPN	500 KBE/100ml	200,5 MPN
2.				
N valid	7	7	7	7
Missing	0	0	0	0
Mean	1,71	4,76	0	0
Std.Dev.	3,4	8,7	0	0
Min.	,00	,00	0	0
Max.	9	23,8	0	0
3.				
N valid	3	3	3	3
Missing	0	0	0	0
Mean	70	135	6,67	7,73
Std.Dev.	17,32	32,88	11,55	5,43
Min.	50	100,8	,00	2
Max.	80	166,2	20	12,8
4.				
N valid	4,00	4	4	4
Missing	0	0	0	0
Mean	52,5	97,25	17,5	7,1
Std.Dev.	18,93	14,6	23,63	6,3
Min.	40	85,8	0	0
Max.	80	118,2	50	15
5				
N valid	3	1	3	1
Missing	0	2	0	2
Mean	3000	3440	1333,33	1500
Std.Dev.	1000		1154,7	
Min.	2000	3440	0	1500
Max.	4000	3440	2000	1500

6	valid	3	2	3	2
	Missing	0	1	0	1
	Mean	4000	2550	1000	1500
	Std.Dev.	2000	777,82	1000	707,11
	Min.	2000	2000	0	1000
	Max.	6000	3100	2000	2000
7	N valid	2	2	2	2
	Missing	0	0	0	0
	Mean	250	0	0	0
	Std.Dev.	353,55	0	0	0
	Min.	0	0	0	0
	Max.	500	0	0	0
8	N valid	1	4	1	4
	Missing	3	0	3	0
	Mean	11500	18387	8500	5412,5
	Std.Dev.		2975		596,34
	Min.	11500	16200	8500	4950
	Max.	11500	22650	8500	6200
9	N valid	5	14	5	14
	Missing	9	0	9	0
	Mean	116	149,59	0	14,96
	Std.Dev.	31,7	24,64	0	7,47
	Min.	85	112	0	5
	Max.	155	203	0	32
10	N valid	4	7	3	7
	Missing	3	0	4	0
	Mean	90	106,27	15	24,94
	Std.Dev.	14,14	16,84	10	5,11
	Min.	80	79,8	0	18,9
	Max.		131,4	20	32
11	N valid	10	10	10	10
	Missing	0	0	0	0
	Mean	63,00	499,72	45	34,36
	Std.Dev.	37,13	150	46,49	7,22
	Min.	20	295	0	25,6
	Max.	150	802	150	48

Wie man nun erkennt, kommen die asymptotischen Signifikanzen von 1,0 bei Gruppe 2 und 7 dadurch zustande, dass bei beiden Verfahren, Membranfiltration nach ISO 9308-1 und Colilert18, keine Keime gefunden wurden. Die hohen Zahlen in Gruppe 5,6,8 kommen durch entsprechende Verdünnungen zustande, welche für das Ergebnis wieder umgerechnet wurden. Nachkontrollgruppe 9 und 10 wurden durch invalide Werte stark dezimiert.

Von den 180 untersuchten validen Proben aus Colilert18 und Membranfiltration zählten 111 Proben / 61,67% gleiche Bakterienzahlen bei Coliformen. 69 Proben / 38,33 % zeigten unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich der beiden untersuchten Nachweisverfahren. Untersucht man nun, wie sich die abweichenden Ergebnisse zwischen der Colilert – Methode und der Membranfiltration nach ISO 9308-1 verhalten, so zeigt sich ein Bild gemäß Tabelle 19 und Tabelle 20. 4 Differenzierungen wurden ausgewertet:

1. Anzahl der Keime größer bei Membranfiltration nach ISO 9308-1 als im Colilert18 und außerhalb des 95% Konfidenzintervalls der most probable number (MPN).
2. Anzahl der Keime größer bei Membranfiltration nach ISO 9308-1 als im Colilert18, aber innerhalb des 95% Konfidenzintervalls.
3. Anzahl der Keime im Colilert-Verfahren größer als bei Membranfiltration nach ISO 9308-1, und der Wert der Membranfiltration ist außerhalb des 95% Konfidenzintervalls der most probable number.
4. Anzahl der Keime im Colilertverfahren größer als bei Membranfiltration und der Wert der Membranfiltration nach ISO 9308-1 ist innerhalb des 95% Konfidenzintervalls.

Das Konfidenzintervall bezieht sich auf das statistische Modell des Colilert18 zur Berechnung der wahrscheinlichsten Anzahl an Keimen (MPN). Es zeigte sich, dass Coliforme von 180 Proben sechs mal / zu 3,33% in höherer Keimzahl in der ISO 9308-1 Methode und außerhalb des Konfidenzlimits der MPN zu finden waren. 12 mal / in 6,67% konnten höhere Keimzahlen bei Membranfiltration nach ISO 9308-1 gefunden werden, welche innerhalb des Konfidenzintervalls lagen. Colilert18 fand 51 mal / zu 28,33% eine höhere Anzahl an Coliformen, als sie bei Membranfiltration nachgewiesen werden konnten, davon waren 12 / 6,67% Ergebnisse so, dass das Resultat durch Membranfiltration gleichzeitig im Konfidenzintervall lag.

Tab.26 Differenzierung der Proben (Colilert18-ISO 9308-1) mit ungleicher Keimzahl bei Gesamtcoliformen

Probenanzahl	ISO 9308-1 > Colilert (außerhalb Konfidenz- intervall)	ISO 9308-1 > Colilert (innerhalb Konfidenz- intervall.)	Colilert > ISO 9308-1 (außerhalb Konfidenz- intervall)	Colilert > ISO 9308-1 (innerhalb Konfidenz- intervall)
180/ 100%	6 / 3,33%	12 / 6,67%	39 / 21,67 %	12 / 6,67%

*E. coli* wurde in 144 Proben / zu 80% in gleichen Keimzahlen durch beide Verfahren nachgewiesen. 36 Proben / 20% zeigten unterschiedliche Werte und die Differenzierung erfolgte nach obigem Schema. In 10 Fällen / 5,56% konnten durch die Membranfiltration mehr Keime nachgewiesen werden, ohne dass die Keimzahl im 95%-Konfidenzintervall des Colilert-Systems lag. In 4 Fällen/ 2,22% lag die Anzahl der *E.coli* bei der Standardmethode über der Anzahl dieses Keimes bei der Colilert18 Methode, jedoch lagen die Zahlen im Konfidenzintervall der Methode von IDEXX. Die Colilert18-Methode zählte in 16 Fällen / 8,89% höhere Werte außerhalb des Konfidenzintervalls. 6 Proben / 3,33% lagen ebenfalls bei höheren Zahlen für *E.coli* im Colilert18. Der Referenzwert bei Membranfiltration nach ISO 9308-1 lag aber im Toleranzbereich (Tab. 27).

Tab. 27 Differenzierung der Proben (Colilert18/ISO 9308-1) mit ungleicher Keimzahl bei *E.coli*.

Probenanzahl	ISO 9308-1 >Colilert18 (außerhalb Konfidenz- intervall)	ISO 9308-1 >Colilert18 (innerhalb Konfidenz- intervall)	Colilert > ISO 9308-1 (außerhalb Konfidenz- intervall)	Colilert > ISO 9308-1 (innerhalb Konfidenz- intervall)
180 / 100%	10 / 5,56%	4 / 2,22%	16 / 8,89%	6 / 3,33%

### 3.6 Enterokokken-Clostridien

Ziel dieses Arbeitspunktes war die Feststellung eines festen Korrelats zwischen Anzahl Enterokokken und Anzahl Clostridien.

Tab. 28. Koloniezahlen von Enterokokken und Clostridien (Aaseeproben)

Versuchsnr.	Clostridien(KBE/l)	Enterokokken(KBE/l)	KBE C./ KBE E.
1	0	85	-
1	0	80	-
1	0	80	-
2	400	20	20:1
2	350	10	35:1
<b>Mittelwert</b>	<b>375</b>	<b>15</b>	<b>25:1</b>
2	400	0	-
2	280	0	-
3	60	10	6:1
3	64	10	6,4:1
3	60	9	6,6:1
<b>Mittelwert</b>	<b>61,3</b>	<b>9,6</b>	<b>6,38:1</b>

Es ergab sich ein sehr unterschiedliches Bild bei Vergleich der Versuchsnummern untereinander, dabei war das Verhältnis innerhalb einer Versuchsanordnung homogen. Versuchsanordnung 1 zeigte das Auftreten von Enterokokken ohne den Nachweis von Clostridien. Nr.2 und Nr.3 zählten jedoch deutlich mehr Clostridien. Während die Relation zwischen Clostridien und Enterokokken in Versuchsnummer 2 unterschiedlich ist und im Mittel 25:1 betrug, hat die Relation innerhalb der Versuchsnummer 3 keine bedeutenden Unterschiede und betrug im Mittel 6,38:1. Die Verhältnisse waren hier sehr ähnlich und hatten ein Spektrum von 6: 1 bis 6,6: 1.

Die 17 Dortmund-Ems-Kanal-Proben sind in Tabelle 29 dargestellt. Wie in Tabelle 28 wurde auch hier die Anzahl Clostridien und Enterokokken zueinander in Beziehung gesetzt. Mittelwerte wurden für die Durchführungen 1,2 und 3 gebildet, wenn Enterokokken und Clostridien gefunden wurden. Das Verhältnis zwischen Clostridien und Enterokokken reicht in Versuchsnummer 1 von 2:1 bis 5:1 und erreicht ein Mittel von 3,14:1. Versuchsnummer 2 ist in diesem Parameter ausgeglichener und reicht von 1:1 bis 3,75: 1 und lag im Mittel bei 1,08:1. Hier wurden Clostridien und Enterokokken fast in gleicher Anzahl gefunden.

Auffällig ist der Rückgang der KBE bei Durchführung Nr.2 von Clostridien und der gleichzeitige Anstieg der Enterokokkenzahlen.

Versuchsdurchgang 3 zählte keine Enterokokken.

Tab.29 Vergleich der Koloniezahlen von Clostridien/Enterokokken (Kanalproben)

Versuchsnr.	Clostridien(KBE/l)	Enterokokken(KBE/l)	KBE C. / KBE E.
1	14	7	2:1
1	16	6	2,6:1
1	30	6	5:1
1	20	4	5:1
1	30	12	2,5:1
<b>Mittelwert</b>	<b>22</b>	<b>7</b>	<b>3,14:1</b>
2	15	4	3,75:1
2	17	30	1:1,8
2	18	15	1,2:1
2	16	16	1:1
2	12	16	1,3:1
2	18	18	1:1
2	16	10	1,6:1
2	15	14	1,07:1
2	15	13	1,1:1
2	20	13	1,5:1
<b>Mittelwert</b>	<b>16,2</b>	<b>14,9</b>	<b>1,08:1</b>
3	0	0	-
3	3	0	-
<b>Mittelwert</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	-

Im Mittel wurden in jedem Durchgang mehr Clostridien als Enterokokken gefunden. Es zeigte sich keine feste Verhältnismäßigkeit im Auftreten von Clostridien und Enterokokken. Innerhalb eines Versuchs war der Quotient von KBE Clostridien und KBE Enterokokken jedoch ähnlich.

## 4 Diskussion

Für die Untersuchung von Trinkwasser auf *Escherichia coli* und Coliforme Bakterien sind in der TrinkwV 2001 Untersuchungsmethoden zwingend vorgegeben. Neben der ISO 9308-1 können nach einer durch das Umweltbundesamt durchgeführten Gleichwertigkeitsbewertung auch andere Verfahren angewendet werden. Zur Zeit ist das einzige zugelassene Alternativverfahren das von der Firma IDEXX vertriebene Diagnostiksystem Colilert18/Quantitray.

Die alte Trinkwasserverordnung von 1990 verlangte für *E. coli* nun den Nachweis von:

- Säure- und Gasbildung aus Laktose bei 36 Grad C
- negative Oxidasereaktion
- positive Indolbildung
- Glucose- oder Mannitspaltung bei 44 Grad C zu Säure und Gas
- fehlende Citratverwertung

Coliforme Bakterien wurden differenziert als gramnegative, sporenlose Stäbchen mit

- Säure- und Gasbildung aus Laktose bei 36 Grad C
- negativer Oxidasereaktion
- negativer (oder positiver ) Indolbildung
- positiver (oder negativer ) Citratverwertung

Die aktuelle Standard-Methode nach europäischer Trinkwasser-Norm (EUDWD ISO 9308-1) und nach der Trinkwasserverordnung von 2003 umfasst die Membranfiltration, Inkubation auf einem nicht selektiven Tergitol TTC-Agar und die Untersuchung der Bakterien auf Säurebildung bei Lactoseverstoffwechslung, Indolbildung aus Tryptophanbouillon bei 44 °C und Prüfung auf das Vorhandensein von Cytochromoxidase (s. Tabelle 30). Lactosefermentation wird hier nicht mehr nach Säurebildung und Gasbildung spezifiziert, sondern nur noch nach Säurebildung. Coliforme werden in der Novellierung zusätzlich über „Besitz des Enzyms  $\beta$ -D-Galaktosidase“ und *E.coli* dazu noch über Besitz des für *E.coli* typischen Enzyms  $\beta$ -D-Galactosidase definiert.

Tab. 30: Aktuelle Differenzierungsmerkmale für Coliforme und *E.coli* gemäß der Trinkwasserverordnung 2001.

	Coliforme	E.coli
Oxidasereaktion	-	-
Indolreaktion bei 44 °C	-	+
Lactosespaltung (Säurebildung)	+	+

Anhand dieser Parameter wird ermittelt, ob es sich um *E.coli*, Coliforme oder keines von beiden handelt.

Obwohl die Standard-Methode sehr nützlich ist, hat sie viele Unzulänglichkeiten. So ist die Produktion von Indol aus Tryptophan nicht exklusiv den *E. coli* zuzurechnen. Klebsiellen (*K. oxytoca*) können zum Teil ebenfalls Indol produzieren, während manche *E.coli*-Stämme dies nicht können. Außerdem ist es manchen *E.coli*-Stämmen nicht möglich, bei einer erhöhten Temperatur von 44 Grad Celsius zu wachsen, welches zusätzlich den Test verfälschen kann. Als Beispiel sei hier *E.coli* 0157:H7 genannt, welcher hämorrhagische Colitis verursacht und bei diesen Temperaturen nur schwach oder gar nicht wächst. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass nur 85% der vermuteten *E.coli* Kolonien von Frischwasser auf dem Membranfilter (mTEC-Agar) wirklich *E.coli*-Stämme sind (Dufour, A.P. Strickland, E.R. und Cabelli, V.,1981). Beim Nachweis von Coliformen stellen sich ebenfalls Probleme dar. Bei Untersuchungen in London fehlten bei etwa 10% der gesamtisolierten Coliformen in der Themserregion das Enzym Lactosepermease, welches für die Verwertung für Lactose verantwortlich ist (Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996)), was eine negative Lactose-fermentation zur Folge hätte. Nach heutiger Klassifikation würde es sich somit nicht um Coliforme handeln. Es wird auch von fäkalen Bakterien berichtet, welche in frischem Wasser bzw. Meerwasser schnell ihre Fähigkeit verlieren, sichtbare Kolonien zu formen, jedoch ihre metabolischen Eigenschaften beibehalten (Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Rozak, D.B., Huq, S.A. und Palmer, L.M. (1985); Grimes, D.J. und Colwell, R.R. (1986); Barcina, I., Gonzales, J.M., Irriberry, J., und Egea, L. (1989); Davies, C.M., Apte, S.C. und Peterson, S.M. (1995); Garcia-Lara, J., Martinez, J., Vilamu, M. und Vives-Rego, J. (1993); Pommepuy, M., Fiksal, L., Gourmelon, M., Melikechi, H., Caprais, M.P., Cormier, M., und Colwell, R.R. (1996)). Diese subletal gestressten Bakterien sind aber unter Umständen trotzdem in der Lage, Krankheiten zu verursachen Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Rozak, D.B., Huq, S.A. und Palmer, L.M. (1985); Grimes, D.J. und Colwell, R.R. (1986)). Weiterhin ist die Membranfiltration problematisch bei stark verunreinigtem Wasser, welches den Filter schnell verstopft, und bei starkem Hintergrundwachstum, da die Keime sich hier gegenseitig beeinflussen und das Ergebnis verfälschen können. Bei 80 KBE/100ml ist das Maximum erreicht, bei dem Coliforme oder *E.coli* erkannt und isoliert werden können (Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996)). Das Colilert18-System hingegen bedient sich der enzymatischen Verstoffwechslung von ONPG (Orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) durch Gesamtcoliforme und MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -G-glucuronid) durch *E.coli* und bewirkt einen Farbumschlag nach gelb für ONPG und eine Fluoreszenz (MUG), woraus eine Differenzierung der obig genannten Keime ermöglicht wird. In unseren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur Gesamtcoliforme aus der

Familie der Enterobacteriaceae und *E.coli* zu positiven Ergebnissen im Colilert-Verfahren führen.

Die Ergebnisse aus dem Methodenvergleich der Reinkulturen *A.hydrophila* Wildstamm, *A.hydrophila* ATCC 25622, *Plesiomonas shigelloides* und *Vibrio parahämolyticus* zeigten im Vergleich von Membranfiltration mit Colilert18 einerseits und Koloniezahlbestimmung mit Colilert18 andererseits, dass entweder bei beiden Vergleichen keine signifikanten Unterschiede oder zumindest einer der beiden zu keinem signifikanten Unterschied führte. Nicht-coliforme Keime ließen sich in unserer Versuchsreihe somit nicht im Colilert18-System unterdrücken, mit Ausnahme von ATCC 25622, und führten so zu falsch-positiven Ergebnissen. Es muss jedoch nochmals betont werden, dass es sich bei den Versuchen um Monokulturen handelte. Hier wird eine Variabilität in den enzymatischen Eigenschaften von *A. hydrophila* Stämmen deutlich. ATCC 25622 besitzt keine  $\beta$ -D-Galactosidaseaktivität. In der Literatur wird beschrieben, dass *Aeromonas hydrophila* (Landre, J.P., Gavriel, A.A. und Lamb, A.J. (1998); Davies, C.M., Apte, S.C. und Peterson, S.M. (1995); Tryland I. und Fiksdal, L. (1998)) und *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* (Davies, C.M., Apte, S.C. und Peterson, S.M. (1995)), *Pseudomonadaceae*, *Staphylokokken* (Van Poucke, S.O. und Nelis, H.J. (1997)), *Neisseriaceae*, einzelne gram-positive Bakterien, Protozoen und Pilze  $\beta$ -D-Galaktosidase besitzen und somit in der Lage wären, eine falsch-positive Coliformen-Reaktion im Colilert18/Quantitray-System zu bewirken. Gleiches gilt für andere Mitglieder der *Enterobacteriaceae*, wie Salmonellen (Feng, P.C.S., und P.A. Hartman (1982); LeMinor, L. (1979)), *Shigellen*, einzelne *Yersinia* (Robinson, B.J. (1984)), *Citrobacter*, *Edwardia* und *Hafnia* Stämme, welche  $\beta$ -D-Glukuronidase besitzen, eine Fluoreszenz durch Spaltung von MUG verursachen und so eine falsch-positive *E.coli*-Reaktion hervorrufen können. Dabei ist das Auftreten von falschen Ergebnissen offenbar abhängig von der Anzahl der Nicht-Ziel Bakterien in Relation zu den Zielkeimen und deren enzymatischen Aktivität von  $\beta$ -D-Gal und  $\beta$ -D-Glu, welche je nach Situation variieren kann (Tryland I. und Fiksdal, L. (1998)). Die Aktivität von  $\beta$ -D-Gal und  $\beta$ -D-Glu ist bei *E.coli* und Coliformen ebenfalls nicht stabil, sondern umgekehrt proportional zu deren Anzahl (George, I., Petit, M. und Servais, P. (2000)). Es wird außerdem berichtet, dass bis zu 34% von *E.coli* in menschlichen Fäces (Chang, G.W., Brill, J. und Lum, R. (1989)) und bis zu 10% in der Umwelt keine  $\beta$ -D-Glu-aktivität besitzen (Shadix, L.C. und Rice, E.W. (1991)) und somit MUG nicht verstoffwechseln. Andere Quellen berichten jedoch, dass 98% - 99% aller *E.coli*-Stämme das Enzym  $\beta$ -D-Glu besitzen (Kilian, M. und Bulow, P. (1976); Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004)). Beachtenswert ist, dass der enterohämorrhagische *E.coli* 0157:H7 negative Ergebnisse bei dem MUG-Substrat liefert (Feng, P., und Lampel, K.A.(1994)).

Die enzymatische Aktivität von *E.coli* war bei 44,5 Grad C am höchsten (Tryland I. und Fiksdal, L. (1998)), bei gleichzeitiger Abnahme der enzymatischen Aktivität von Nicht-Zielkeimen. Es ist aber anzumerken, dass manchen *E.coli*- Stämmen die Fähigkeit  $\beta$ -Galactosidase zu bilden verloren geht, wenn sie bei 44,5 Grad C bebrütet werden (Alonso, J.A., Soriano, A, Amoros, I. und Ferrus, M.A. (1998)). *A.hydrophila* hingegen steigert seine Aktivität, bleibt jedoch weit hinter der von *E.coli* zurück. Tryland und Fiksdal, Edberg folgern daraus, dass Nicht-Zielkeime nur durch hohe Keimzahlen (für *Aeromonas*  $\geq 20.000$  Bakterien /ml, *Pseudomonas*  $\geq 50.000$ /ml ) das Ergebnis beeinflussen und die optimale Bebrütungstemperatur für richtig positive Ergebnisse bei enzymatischen Tests für *E.coli* 44,5 Grad C ist. Edberg folgert zudem, dass in hohen Bakterienkonzentrationen von Nicht-Ziel Bakterien das Colilertsystem als Enzymassay wirkt und deshalb nicht als Bestätigungsreaktion für Keime von anderen Medien genutzt werden sollte. Interessanterweise erscheinen also ONPG-positive Noncoliforme im Colilerttest negativ, da dieses System deren Metabolismus nicht unterstützt (Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1988)), es sei denn, sie träten in den obig erwähnten hohen Konzentrationen auf. Landre fand hingegen in seiner Studie 1998, dass *Aeromonas spp.* schon in sehr geringen Konzentrationen zu positiven Befunden im Colilert18 führt, was auch unseren Beobachtungen entspricht.

Die definierte Substrat Technologie (Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B., Kriz, N.J. (1990)) ist nun schon in den USA zur gängigen Methode geworden und ließ auch in den Vereinigten Königreichen vergleichbare Ergebnisse zur Referenzmethode ermitteln (Cowburn, J.K., Goodall, T., Fricker, E.J., Walter, K.S. und Fricker, C.R. (1994); EUDWD ISO 9308-1). Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte eine europaweite Validierung, welche die definierte Substrat Technologie des Colilert18 der Firma IDEXX als gleichwertiges Verfahren deklarierte (Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003)). Die beiden Keimarten können so ohne Zusatztests nach der genannten Zeit quantifiziert werden.

Coliforme konnten von uns zu 71 % richtig positiv bestätigt werden. *E.coli* bestätigte sich in 87% der untersuchten Fälle. Die Bestätigungsreaktion entsprach dem Arbeitsablauf nach Referenzmethode der aktuellen Trinkwasserverordnung. Im Vergleich mit in der Literatur angegebenen Bestätigungsquoten für *E.coli* ist unser Ergebnis vergleichbar (Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004) ; Venkateswaran, K., Kurusu, T., Satake, M. und Shinoda, S. (1996); Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003); Tab. 31). Coliforme bleiben in unserer Studie mit 71 % richtig positiven Bestätigungen hinter den Ergebnissen in der Literatur zurück. Vermutlich ist die tatsächliche Anzahl von *E.coli* und Coliformen aber höher. Das Colilertsystem erkennt Bakterien anhand ihrer enzymatischen Aktivität, auch wenn sie keine Kolonien bilden oder subletal gestresst sind (Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1989)). Die Intensität der Färbung fällt dann aber geringer aus. 10% aller

*E.coli*-Stämme fehlt das Enzym Lactosepermease (Fricker, J. und Fricker, C. (1994)), was dazu führt, dass Tests, die auf der Lactoseverstoffwechslung basieren, diesen Keim nicht nachweisen und es somit zu einem falsch-negativen Ergebnis führt. Außerdem wächst eine Reihe von *E.coli*-Stämmen nur anaerob und bilden kein Gas, wenn sie in einer Lactoselösung bebrütet werden (Eccles, J.P., Serle, R. und Dennis, P.J. (2004)). Eccles schätzt eine Differenzierung von *E.coli* durch diese Reaktion als nicht vertrauenswürdig ein. Die Bestätigung durch Membranfiltration und die darauffolgende Differenzierung ist durch Säurebildung weit mehr subjektiv, da die Farben nicht sehr kräftig ausfallen können und eine weitere Bebrütung von 2-4 Stunden keinen zusätzlichen Nutzen bringt (Edberg S.C., Allen M.J., Smith D.B. (1988, 1989)). Die enzymatische Reaktion ist ferner in der Lage, inaktive bzw. traumatisierte Bakterien zu erfassen, welche nicht mehr auf einem Membranfilter wachsen (Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1988)) .

Das Colilert18 produziert für *E.coli* vergleichbare bzw. höhere ( Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003)) oder niedrigere oder falsch-positive Resultate ( Schets et al, 2001) in Bezug auf die Referenzmethodik. Neben diesem Faktum stellt Schets und seine Gruppe (2002) noch dar, dass coliforme Bakterien, nur wenn sie die Enzyme  $\beta$ -Galactosidpermease und  $\beta$ -Galactosidase besitzen, charakteristische Kolonien auf Lac TTC-Agar bilden. Fehlt ihnen nun das Enzym  $\beta$ -Galactosidpermease, so werden keine entsprechenden Kolonien mehr gebildet, es sei denn, die Lactosekonzentration ist sehr hoch. Konsequenz könnte sein, dass sie nicht auf einem Membranfilter erkannt werden. Trotzdem kann von diesen Keimen ONPG noch verwertet werden, so dass ein positiver Befund im Colilert18 zu finden ist. Mehrere Studien haben außerdem dargestellt, dass in Frischwasser enthaltene Bakterien ihre Fähigkeit Kolonien zu bilden verlieren können, aber gleichzeitig metabolisch aktiv bleiben und somit weiterhin Krankheiten erregen können (Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Rozak, D.B., Huq, S.A.und Palmer, L.M. (1985); Grimes, D.J. und Colwell, R.R. (1986); Barcina, I., Gonzales, J.M., Iriberry, J., und Egea, L. (1989); Garcia-Lara, J., Martinez, J., Vilamu, M. und Vives-Rego, J. (1993); Davies, C.M., Apte, S.C. und Peterson, S.M. (1995); Pommepuy, M., Fiksal, L., Gourmelon, M., Melikechi, H., Caprais, M.P., Cormier, M., und Colwell, R.R. (1996)). George, I., Petit, M. und Servais, P. (2000) prüften dies, indem sie *E.coli* in steriles Wasser gaben und dann verglichen, wie sich die Keimzahl auf einer Platte und die GLUase-Aktivität zueinander verhielten. Es zeigte sich, dass die enzymatische Aktivität gleich blieb, aber die Anzahl der Kolonien gleichzeitig zurückging. Gerade in wenig mit Coliformen kontaminierten, natürlichen Wässern sind diese Effekte zu finden, da Nahrungsangebot und Wassertrübung hier geringer sind.

Die Auswertung der Daten in unserer Studie erbrachte, dass in 28,33% der Gesamtproben mehr Gesamtcoliforme durch das Colilertsystem gefunden wurden als durch die

Referenzmethode. Im umgekehrten Fall ( Membranfiltration > Colilert18) traf dies nur auf 9,99% der Fälle zu. Chao ermittelte eine falsch–negativ Rate für Gesamtcoliforme von 6,3 % und für *E.coli* von 3,5 % und eine falsch – positiv Rate von 7,4 % ( *E.coli*) und 9,7% (Coliforme) (Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004)). Schets und seine Gruppe (2001) kamen zu einem etwas differenzierteren Ergebnis. Er bestätigte die Ergebnisse von Fricker und Chao bezüglich Coliformen, ermittelte aber für *E.coli* eine Rate von 11% falsch-negativen Ergebnissen. Hier forderte er eine Bestätigungsreaktion für *E.coli* im Colilert-Verfahren. Dieses Ergebnis wurde schon vorher von ihm beobachtet. 1991 konnten Schets und Haavelaar 14 % falsch-negative Ergebnisse beobachten. Die  $\beta$ -D-Glukuronidasereaktion ist, nach diesen Ergebnissen zu urteilen, nicht geeignet zur *E.coli* – Diagnostik. Die Indolreaktion hingegen erscheint ihm geeigneter, da hier nur 2 – 4 % falsch-negative Ergebnisse auftreten Schets, F.M. und Havelaar, A.H. (1991); Schets, F.M., Medema, G.J. und Havelaar, A.H. (1993)). Schets benutzte jedoch die Membranfiltration, anschließende Bestätigung durch Bebrütung auf LTTC37Agar und LTTC44Agar und Differenzierung durch Gas- und Indolbildung. Chao hingegen bestätigte die Keime im Colilert18 durch das API 20E (Biomerieux), welches eine validere Erkenntnis liefert (Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004)). Pisciotta ermittelte falsch-positive Raten von 27,3% für *E.coli*, welche ebenfalls im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Chao stehen (Pisciotta, J., Damon F. Rath, Paul A. Stanek, D., Michael Flanery, und Valerie J. Harwood (2002)). *E. coli* konnte in 24 Fällen in größeren Zahlen durch das Colilert18 nachgewiesen werden. 18 Versuche zeigten hier das umgekehrte Bild. Die Zahlen beziehen sich auf 198 untersuchte Proben. Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse erscheinen die Zahlen insofern plausibel, als dass die Colilertmethodik häufiger die entsprechenden Markerkeime in höheren Zahlen gefunden hat. Dabei ist bei Beurteilung aller Versuche diese Beobachtung nicht signifikant für *E.coli*, wohl aber für Gesamtcoliforme.

Zur Untersuchung des idealen Ablesezeitpunktes wurde das Wachstum auf Colilert und Membranfilter in definierten Abständen kontrolliert. Die Anzahl der gelben Felder nahm gerade beim Zeitschritt von 20 zu 21 Stunden im Durchschnitt um 3,42 Felder zu, jedoch anschließend nicht mehr. *E.coli* blieb während der Kontrolle von 19h – 20h – 21h beinahe konstant. Die fluoreszierenden Felder vermehrten sich um 0,16 Felder im Schnitt.

Die vom Hersteller angegebene Bebrütungstemperatur von  $19\pm 1$  Stunde sollte nach den vorliegenden Daten somit voll ausgenutzt werden.

Auf dem Membranfilter wuchsen bis 22 Stunden nach Inokulation die Kolonien gleichmäßig im Schnitt um 0,34 – 1 KBE/100ml. Nach 24 Stunden war kein zusätzliches Wachstum mehr zu verzeichnen, und erst nach 40 Stunden stieg die Anzahl der gelben Kolonien wieder um 2,34 KBE an. Die Anzahl der verdächtigen KBE bleibt also nicht konstant,

Tab.31 zeigt eine Übersicht über Betätigungsquotienten von Colilert und Bebrütung auf einem Lac-TTC agar mit Tergitol in der Literatur.

Studie	Methode	Bestätigungsquote/ Mittelwert	Bereich der Bestätigungsquote
Chao, Chao und Chao 2004	Colilert/ Coliforme	0,82	
	Colilert/ E.coli	0,90	
Niemela, Lee, Fricker 2003	Colilert/ Coliforme	0,83	0,53 – 1,0
	Tergitol TTC/ Coliforme	0,76	0,21 – 1,0
	Colilert/ E.coli	0,91	0,56 – 1,0
	Tergitol TTC/ E.coli	0,59	0,18 – 1,0
Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996)	Colilert/ Coliforme	1,0	
	Tergitol TTC/ Coliforme	0,71	
	Colilert/ E.coli	1,0	
	Tergitol TTC/ E.coli	0,7	
Schets,Nobel, Mooji-man, Engels, Brouwer, (2002)	Colilert/ Coliforme	0,53	
	Tergitol TTC/ Coliforme	0,80	
	Colilert/ E.coli	0,96	
	Tergitol TTC/ E.coli	0,58 bei 37 Grad C 0,82 bei 44 Grad C	
Eckner et al. 1998	Colilert/ Coliforme	,1 – 1	
	Colilert/ E.coli	1	
Venkateswaran, K., Kurusu, T., Satake, M. und Shinoda, S. (1996)	Colilert/ Coliforme	0,98	
	Colilert/ E.coli	0,83	
Unsere Studie	Colilert/ Coliforme	0,71	0,5 – 1,0
	Colilert/ E.coli	0,87	0,8 – 1,0

sondern verändert sich noch, nachdem die vorgeschriebene Zeit im Brutschrank von 21+3 Stunden vorüber ist.

Die Beurteilung der Vergleichbarkeit von Membranfiltrationsmethodik und dem Colilert18 – System ergab, dass durch Colilert18 signifikant mehr Gesamtcoliforme nachgewiesen werden konnten als durch die Referenzmethode, während *E.coli* im Nachweis keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen. Die Ergebnisgruppen sind jedoch nicht gleichwertig in ihrem Evidenzgrad, da einige durch invalide Werte stark dezimiert wurden. Zweifellos ist Gruppe 1 mit 141 validen Werten am aussagekräftigsten. Hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Vergleichbare Ergebnisse konnten sich bei Bewertung unserer Statistik finden lassen, und es scheint so, als ob das neue enzymatische Verfahren zur Diagnostik von fäkalen Markerkeimen entsprechende Ergebnisse liefert wie die Referenzmethode Membranfiltration. Die Literatur bestätigt dies ( Alonso J.A., Soriano, A, Amoros, I. und Ferrus, M.A. (1998); Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004) ; Covert, T.C., Shadix, L.C. Haines, J.R. und Freyberg, R. (1989); Cowburn, J.K., Goodall, T., Fricker, E.J., Walter, K.S. und Fricker.C.R. (1994); Eaton, A.D., L.S. Cleresci, A.E. Grennberg und M.A.H. Franson (1995); Eccles, J.P., Serle, R. und Dennis, P.J. (2004); Eckner, K., F. (1998); Frampton, E.W., und L. Restaino (1993); Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1988); Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1989); Fricker, C.R., Cowburn,J., Goodall,T., und Fricker E.J. (1993); Fricker.J. und Fricker C. (1994); E.J. Fricker, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996); C. R. Fricker, Seppo I. Niemela und John v. Lee (2000); Geisseler, K., Manafi, M. Amoros, I. Und Alonso, J.L. 2000 ; LeMinor, L. 1979; Lewis, C.M. und Mak, J.L. 1989; Pommepuy, M., Fiksal, L., Gourmelon, M., Melikechi, H., Caprais, M.P., Cormier, M., und Colwell, R.R. 1996 ; Petzel J.P. und Hartman, P.A. 1986; Pisciotta et al. (2002); . Schets, F.M., Medema, G.J. und Havelaar, A.H. (1993); Shadix, L.C. und Rice, E.W. (1991), Simpson, J.M., Santodomingo, J.W. und Reasoner, D.J.( 2002)). Es ist anzumerken, dass nur die Studien Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004) ; Cowburn, J.K., Goodall, T., Fricker, E.J., Walter, K.S. und Fricker.C.R. (1994); Eaton, A.D., L.S. Cleresci, A.E. Grennberg und M.A.H. Franson (1995); Eccles, J.P., Serle, R. und Dennis, P.J. (2004);. Fricker, C.R., Cowburn,J., Goodall,T. und Fricker e.J. (1993); Eckner, K., F. (1998); Fricker.J. und Fricker C. (1994); Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003); ; Geisselr, K., Manafi, M. Amoros, I. und Alonso, J.L. (2000), sich direkt auf das Colilert18 Testsystem der Firma IDEXX beziehen. Die anderen Studien beziehen sich generell auf das Autoanalysis Colilertsystem bzw. den Nachweis von *E.coli* und Coliformen durch enzymatische Methoden mittels  $\beta$ -D-Glucuronidase und  $\beta$ -D-Galactosidase. Die

Colilertmethodik resultiert aber in höheren Zahlen für Gesamtcoliforme (Schets, F. M., Nobel, P.J., Moojiman, K.A., Engels, G.B., Brouwer, A. (2002), Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996), Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003), Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L , 2004).

Vorteile sind vor allem in der einfachen Inokulierbarkeit und Zeitersparnis zu sehen, da Colilert18 schon nach 18 - 20 Stunden fertig auswertbar und in der Lage ist, durch 2 Substrate sowohl Gesamtcoliforme als auch *E.coli* in einem Schritt nachzuweisen. Zusätzlich können höhere Keimzahlen durch Quantitray (<1 - >200,5 MPN ) und Quantitray 2000 (<1 – 410,6 MPN) durch die statistische Berechnung der most probable number sofort ausgezählt werden, da ein vorhandenes Hintergrundwachstum das Ergebnis nicht beeinflusst, wie dies bei der Auswertung auf einem Membranfilter der Fall ist. Keimzahlen von >80 KBE/ml zeigen hier eine derartige Beeinflussung der Keime untereinander, so dass die vorhandenen Kolonien nicht mehr differenziert werden können (Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1997), Schets, F. M., Nobel, P.J., Moojiman, K.A., Engels, G.B., Brouwer, A. (2002)), d.h. Membranfiltration und Bebrütung auf dem nicht selektiven Medium Lac TTC Agar mit Tergitol 7 ist nur zu Diagnostik von sehr sauberem Wasser geeignet. Problematisch könnte jedoch die Auswertung von stark belasteten Gewässern sein, da durch Keime, welche ebenfalls  $\beta$ -D-Glucuronidase und  $\beta$ -D-Galactosidaseaktivität besitzen, falsch-positive Ergebnisse gefunden werden (Landre, J.P., Gavriel, A.A. und Lamb, A.J. (1998), Edberg S.C., Allen M.J., Smith, D.B. (1988,1989), Tryland I. und Fiksdal, L. (1998)).

Niemela, S. I., Lee, J.V. und Fricker, C.R. zogen, nachdem sie eine internationale Vergleichsstudie in Europa im Jahre 2003 durchführten, eine Reihe von Schlussfolgerungen:

1. Um statistisch signifikante Daten zu erhalten, ist es nicht notwendig, bei Vergleich zweier Methoden, eine große Probenanzahl zu bearbeiten, sondern es reicht, so viele Zielorganismen wie möglich einer Bestätigungsreaktion zu unterziehen. Idealerweise überprüft man alle Zielorganismen.
2. Für Interlaborstudien ist eine große Anzahl an Labors nicht notwendig. Man konnte mit 5 Labors signifikante Daten finden.
3. Einzellaborvalidierungen sind nicht zu empfehlen, da signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Laboren auftreten können.
4. Es werden für künftige Studien 5 Labors an unterschiedlichen Standorten empfohlen.

5. Gegenüber der ISO-Referenzmethode wurden mit Colilert sowohl mehr Coliforme als auch *E.coli* gefunden, selbst wenn die gleichen Bestätigungsreaktionen wie in der ISO-Norm genutzt wurden.
6. Wurden alle Isolate einer Bestätigungsreaktion unterzogen, so konnte, im Vergleich zur ISO-Norm, Colilert signifikant höhere Bestätigungsquoten, bei vielen annähernd 100%, erzielen.
7. Die Bestätigungsquote hängt von den Kriterien ab, unter welchen die Keime definiert werden. Viele Coliforme sind aber nicht in der Lage, innerhalb 48 Stunden Lactose zu fermentieren. Vermutlich liegt die Ursache darin begründet, dass ihnen das Enzym Lactosepermease fehlt. Sie formen so eher rosa Kolonien, welche nach der Standardmethode ignoriert werden. Trotzdem besitzen sie  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Entsprechend wurden *E.coli* – Stämme isoliert, die entweder Lactose nicht fermentierten, nicht indolpositiv waren, oder nicht bei 44 Grad C wuchsen.
8. Basierend auf diesen Ergebnissen ist das Colilert als ein zumindest gleichwertiges Verfahren zum Nachweis von *E.coli* und Coliformen einzustufen.

Als letzter Punkt ist noch untersucht worden, ob sich eine eindeutigen Relation zwischen den Keimzahlen von Clostridien und Enterokokken finden ließ. Zu diesem Zwecke wurden Aaseeproben und Kanalproben getrennt ausgewertet. Clostridien wurden fast immer in höheren Zahlen gefunden. Ausnahme bildet eine Probe aus dem Aasee, bei der keine Clostridien, wohl aber Enterokokken gefunden wurden. Eine feste Relation ließ sich nicht evaluieren. Die Relationen der Keime zueinander blieben aber innerhalb eines Versuchaufbaus weitestgehend konstant.

#### 4.1 Schlussfolgerungen

1. Das Colilert18 Testsystem der Firma IDEXX ist in der Lage, vergleichbare Ergebnisse für *E.coli*, in Bezug auf die Standardmethode nach der aktuellen TrinkwV, zu liefern. Coliforme werden in signifikant höheren Zahlen gefunden.
2. Aus dem Colilert18 konnte *E.coli* zu 87% und Gesamtcoliforme zu 71% durch Differenzierung nach der TrinkwV 2003 bestätigt werden.
3. Vermutlich liefern *A.hydrophila*, *V. parahämolyticus* und *P. shigelloides* falsch positive Ergebnisse, welches durch die entsprechende Literatur unterstrichen wird. Es konnte bei Monokulturen keine Unterdrückung der Keimzahl bestätigt werden. Es scheint aber so, dass diese Unterdrückung der Nicht-Zielkeime erst bei Mischkulturen mit den gesuchten Coliformen und *E.coli* greift, obwohl dies in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

4. Die Bebrütungszeit von  $19 \pm 1$  Stunde sollte voll ausgeschöpft werden bzw. ist eine Trübung nach 18 Stunden zu finden, liegt diese aber unter der des Komparators, sollte eine weitere Bebrütung bis zum Maximum von 20 Stunden erfolgen.
5. Colilert18/Quantitray bildet eine einfache, zeitsparende, kostengünstige Alternative zur Membranfiltration.
6. In Bezug auf Enterokokken-Clostridien ließ sich keine eindeutige Relation zwischen den Keimen nachweisen, obwohl das Verhältnis der Keimzahlen innerhalb einer Probe ähnlich war.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Alonso, J.A., Soriano, A, Amoros, I. und Ferrus, M.A. (1998). Quantitative determination of *E.coli* and fecal coliforms in water using a chromogenic medium.  
J Environ Sci Health Part. A 33: 1229-1248.
2. Barcina, I., Gonzales, J.M., Irriberri, J., und Egea, L. (1989). Effect of visible light on progressive dormancy of *E.coli* during the survival process in natural fresh water.  
Appl Environ Microbiol. 55: 246-251.
3. Brabetz, W., Liebl, W. und Schleifer, K.H. (1993). Lactose permease of *E.coli* catalyses active beta galactoside transport in a gram positive bacterium.  
J Bacteriol. 175: 7488-7491.
4. Chao, K.K, Chao, C.C und Chao, W.L (2004). Evaluation of Colilert18 for detection of coliforms and *E. coli* in subtropical freshwaters.  
Appl Environ Microbiol. 70(2): 1242-1244.
5. Chang, G.W., Brill, J. und Lum, R. (1989). Proportion of  $\beta$ -glucuronidase negative *E.coli* in human fecal samples.  
Appl Environ Microbiol. 55: 335-339.
6. Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Rozak, D.B., Huq, S.A.und Palmer, L.M. (1985) . Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. Biotechnology 3: 817-820.
7. Covert, T.C., Shadix, L.C. Haines, J.R. und Freyberg, R. (1989). Evaluation of autoanalysis colilert test for enumeration and detection of total coliforms.  
Appl Environ Microbiol. 55: 2443-2447.
8. Cowburn, J.K., Goodall, T., Fricker, E.J., Walter, K.S. und Fricker.C.R. (1994). A preliminary study of the use of the Colilert for water quality monitoring.  
Lett Appl Microbiol. 19: 50-52.

9. Davies, C.M., Apte, S.C. und Peterson, S.M. (1995). Possible interference of lactose-fermenting marine vibrios in coliform  $\beta$ -d-galactosidase assays.  
J Appl Bacteriol. 78: 387-393.
10. Dufour, A.P. Strickland, E.R. und Cabelli, V. (1981). Membrane filter method for enumerating *E.coli*.  
Appl Environ Microbiol. 41(5): 1152-1158.
11. Eccles, J.P., Serle, R. und Dennis, P.J. (2004). A comparison of methods used to enumerate *E.coli* in conventionally treated sewage sludge.  
J Appl Microbiol. 96: 375-383.
12. Eckner, K.F. (1998). Comparison of membrane filtration and multiple tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *E.coli* and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden.  
Appl Environ Microbiol 64: 3079-3083.
13. Edberg S.C., Allen, M.J. und Smith, D.B. (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *E.coli* from drinking water: comparison with the Standard multiple tube fermentation method.  
Appl Environ Microbiol. 54: 1595-1601.
14. Edberg S.C., Allen, M.J. und Smith, D.B.(1989). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *E.coli* from drinking water: comparison with the Standard multiple tube fermentation method.  
Appl Environ Microbiol 55: 1003-1008.
15. Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B. und Kriz, N.J. (1990). Enumeration of total coliforms an *E.coli* from source water by the defined substrate technology.  
Appl Environ Microbiol 56: 366-369.
16. Edberg S.C, Rice, E.W., Karlin, R.J. und Allen, M.J. (2000). *E.coli*, the best biological drinking water indicator for public health protection.  
J Appl Microbiol 88: 106-116.

17. Feng, P., und Lampel, K.A.(1994). Genetic analysis of uidA gene expression in enterohemorrhagic E.coli serotype 0157:H7.  
Microbiology 140: 2101-2107.
18. Feng, P.C.S., und P.A. Hartman (1982). Fluorogenic assay for immediate confirmation of E.coli.  
Appl Environ Microbiol 43: 1320-1329.
19. Frampton, E.W. und Restaino, L (1993). Methods for *E.coli* identification in food, water and clinical samples based on  $\beta$ -d-glucuronidase detection.  
J Appl Bacteriol. 74 (3): 223-233.
20. Fricker, C.R., Cowburn, J., Goodall, T. und Fricker, E.J. (1993). Use of the Colilert-system in a large U.K. water utility.  
Proceedings of the 1993 Water Quality Technology Conference Miami pp. 525-527., American Water Works Association Denver, Colorado.
21. Fricker, J. und Fricker, C. (1994). Application of PCR to the identification of coliforms and *E.coli* in water.  
Lett Appl Microbiol. 19: 53-55.
22. Fricker, E.J, K.S. Illingworth und C.R.Fricker (1996). Use of 2 Formulations of Colilert and Quantitray for assessment of the bacteriological quality of water.  
Wat Res. 31, No 10: 2495-2499.
23. Garcia-Lara, J., Martinez, J., Vilamu, M. und Vives-Rego, J. (1993). Effect of previous growth conditions on the starvation-survival of E.coli in seawater.  
J General Microbiol. 139: 1425-1431.
25. Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I. und Alsonso, J.L. (2000). Quantitative determination of total coliform and E.coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media.  
J Appl Microbiol. 88: 280-285.
26. George, I., Petit, M. und Servais, P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwater.  
J Appl Microbiol 88: 404-413.

27. Grimes, D.J. und Colwell, R.R. (1986). Viability and virulence of *E.coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water.  
FEMS Microbiol Lett. 34: 161-165.
28. Haines, J.R., Covert, T. und Rankin, C. (1993). Evaluation of indoxyl- $\beta$ -D-glu-curonid as a chromogen in media specific for *E.coli*.  
Appl Environ Microbiol 59: 2758-2759.
29. Holt, J.G., Krieg, H.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., und Williams, S.T. (1994). Bergeys manual of determinative bacteriology.  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ISBN 0683006037.
30. Hof H., R.L. Müller, R. Dörries (2000). Mikrobiologie.  
Thieme, Stuttgart, ISBN 3131253134.
31. Kinzelman, J, Clement, N.G., Jackson, E., Gradus, S., Bagley, R. (2003). Entero-cocci of lake Michigan recreational water quality: comparison of two methodologies and their impact on public health regulatory events.  
Appl Environ Microbiol 69 (1): 92-96.
32. Kilian, M. und Bulow, P. (1976). Rapid diagnosis of enterobacteriaceae. 1. De-tection of bacterial glycosides.  
Pathologica et Microbiologica Scandinavia Section B. 84: 245-251.
39. Landre, J.P., Gavriel, A.A. und Lamb, A.J. (1998). False-positive coliform reaction mediated by *Aeromonas* in the colilert defined substrate system.  
Lett Appl Microbiol. 26 (5): 352-354.
33. LeMinor, L. (1979). Tetrathionate-reductase,  $\beta$ -glucuronidase and onpg - test in the genus *Salmonella*.  
Zentrbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt.1 Reihe A 243: 321-325.
34. Lewis, C.M. und Mak, J.L. (1989). Comparison of membrane filtration and auto-analysis colilert presence absence techniques for analysis of total coliforms and *E.coli* in drinking water samples.  
Appl Environ Microbiol 55: 3091-3094.

35. Manafi, M., Kneifel, W, und Bascomb, S. (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnosis.  
Microbiol Rev. 55 (3): 335-348.
36. MMWR 1995. Update: *Vibrio cholerae* 01 – western hemisphere, 1991-1994, and *V.cholerae* 1239 – asia.  
1994 MMWR Weekly 44(11), 215-219, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, U.S.A.
37. Misty L. Pope, Michelle Bussen, Mary Ann Feige, Lois Shadix, Sharon Gonder, Crystal Rodgers, Yildiz Chambers, Jessica Pulz, Ken Miller, Kevin Connell und Jon Standridge (2003). Assessment of the effects of holding time and temperature on *E.coli* densities in surface water samples.  
Appl Environ Microbiol. 69 (10): 6201-6207.
38. Niemela, S. I., Lee, J.V., Fricker, C.R. (2003). A comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in water with a defined substrate procedure.  
J Appl Microbiol. 95 (6): 1285-1292.
39. Pommepuy, M., Fiksal, L., Gourmelon, M., Melikechi, H., Caprais, M.P., Cormier, M., und Colwell, R.R. (1996). Effect of seawater on *E.coli*  $\beta$ -d-galactosidase activity.  
J Appl Bacteriol. 81: 174-180.
40. Pisciotta, J., Damon F. Rath, Paul A. Stanek, D. Michael Flanery, und Valerie J. Harwood (2002). Marine bacteria cause false positive results in the Colilert18 rapid identification test for *E.coli* in Florida waters.  
Appl Environ Microbiol 68: 539-544.
41. Petzel, J.P. und Hartman, P.A. (1986). A note on starch hydrolysis and  $\beta$ -d-glucuronidase activity among flavobacteria.  
J Appl Bacteriol. 61: 421-426.
42. Robinson, B.J. (1984). Fluorogenic assay for rapid detection of *E.coli* in foods.  
Appl Environ Microbiol. 48: 285-288.

43. Schets, F. M., Nobel, P.J., Moojiman, K.A., Engels, G.B., Brouwer, A. (2002). EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods.  
Lett Appl Microbiol. 34(3): 227-231.
44. Schets, F.M., Medema, G.J. und Havelaar, A.H. (1993). Comparison of Colilert with the dutch Standard enumeration Standard method for E.coli and coliforms.  
Lett Appl Microbiol. 17: 17-19.
45. Schets, F.M. und Havelaar, A.H. (1991). Comparison of indole production and  $\beta$ -D-glucuronidase activity for the detection of E.coli in a membrane filtration method.  
Lett Appl Microbiol. 13: 272-274.
46. Shadix, L.C. und Rice, E.W. (1991). Evaluation of  $\beta$ -glucuronidase assay for the detection of E.coli from environmental waters.  
Can J Mikrobiol. 37: 908-911.
47. Simpson, J.M., Santodomingo, J.W. und Reasoner, D.J.( 2002). Microbiological source tracking: state of the science.  
Environ Sc Technol. 36: 5279-5288.
48. Stelzer, W. (1985). Investigation on the detection of E.coli in water.  
Acta Hydrochim Hydrobiol. 13: 207-215.
49. Tryland, I. und Fiksdal, L. (1998): Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-Galactosidase and  $\beta$ -D-Glucuronidase- positive Bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms an E.coli.  
Appl Environ Microbiol 64(3): 1018-1023.
50. U.S. environmental protection agency 1996. 25 years of the safe drinking water act: history and trends.  
Enviromental Protection Agency, Washington, U.S.A. [www.epa.gov](http://www.epa.gov).
51. Vail, J.H., Morgan, R., Merino, C.R., Gonzales, F., Miller,R. und Ram, J L.  
Enumeration of waterborne E.coli with petrifilm plates: comparison to standard methods.  
J Environ Qual. 32: 368-373.

52. Van Poucke, S.O. und Nelis, H.J. (1997). Limitations of highly sensitive enzymatic presence-absence tests for detection of waterborne coliforms and E.coli.  
Appl Environ Microbiol 63 (2): 771-774.

53. Venkateswaran, K., Kurusu, T., Satake, M. und Shinoda, S. (1996). Comparison of commercially available kits with Standard methods for the detection of coliforms and E.coli in foods.  
Appl Environ Microbiol 62: 2236-2243.

54. Wallenfels, K., und Weil, R. (1972).  $\beta$ -Galactosidase. The Enzymes, Vol. 8. Academic Press, N.Y.

55. WHO 2004. Water related diseases.  
WHO, Geneva, [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/en/)

56. WHO 2005. Weekly epidemiological record.  
WHO Nr. 80, 31, 2005, 261-268 WHO, Genf [www.who.int/wer/2005/en/](http://www.who.int/wer/2005/en/)

57. WHO 2003. Emerging issues in water an infectious disease.  
ISBN 9241590823 WHO, Genf.

#### Zitierte Regelwerke:

58. DIN EN ISO 9308-1 (2001). Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien.  
Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

59. DIN EN ISO 6222, (1999). Quantitative Bestimmung von kultivierbaren Mikroorganismen.  
Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

60. DIN Norm 38 411 (1991). Deutsche Einheitsverfahren zur Abwasser-, Wasser - und Schlammuntersuchung. Mikrobiologische Verfahren. Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen.  
Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

61. DIN EN 26 461 (1993). Nachweis und Zählung der Sporen sulfitreduzierender Anaerobier (Clostridien). Teil 2: Membranfiltrationsverfahren.

Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin

62. DIN 38411-9 (2001) Deutsche Einheitsverfahren zur Abwasser-, Wasser- und Schlammuntersuchung. Mikrobiologische Verfahren. Teil 9: Bestimmung der ECA zum Nachweis von lactosefermentierenden Enterobacteriaceae (K9).

Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

63. DIN EN ISO 7899-1 (1999) Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken Oberflächenwassern und Abwasser. Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium.

Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

64. DIN EN ISO 7899-2 (2000). Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken. Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration.

Deutsches Institut für Normung.e.V, Berlin.

## Lebenslauf

geboren am 08.10.1976 in Geldern

Vater : Dr. Hans-Ulrich Thoneick,

Mutter : Leonie Thoneick

Schullaufbahn → 1982-86 Besuch der allgemeinen Grund-Schule, Straelen

1986-95 Besuch des Friedrich –  
Spee-Gymnasiums, Geldern

Wehrdienst → 1995- 96 Wehrdienst als Zahnarzhelfer im  
Luftwaffenunterstützungsbattalion Nord  
in Kalkar

Studium → 1996 – 2002 Studium der Zahnmedizin an  
der WWU Münster

Approbation im Dezember 2002

zahnärztl. Tätigkeit → Jan. 2003 – September 2003 Teilzeittätigkeit  
in der väterlichen Praxis

September 2003 – September 2005 Assis-  
tententätigkeit in der Klinik am Ring in Köln

März 2004 – September 2005 Teilzeittätigkeit  
in der Praxis für MKG-Chirurgie von  
Dr. habil. Orestis Hadjianghelou

Seit Oktober 2005 zahnärztliche Tätigkeit  
in London