

Universität für Bodenkultur Wien

University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna

Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt

Institut für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz

Univ. Prof. DI Dr. Raimund Haberl



MIKROBIOLOGISCHE QUALITÄTSKONTROLLE VON TRINKWASSER

VERGLEICH EINER ALTERNATIVMETHODE ZUR BESTIMMUNG VON ESCHERICHIA COLI UND
COLIFORMEN MIT DER HERKÖMMLICHEN UNTERSUCHUNGSTECHNIK

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Diplomingenieur

eingereicht von:
MATTHIAS STELZL

Betreuer: Univ. Prof. DI. Dr. Haberl Raimund

Mitbetreuer: Dr. Zibuschka Franziska

Matrikelnummer 9440160

22.02.2010

Vorwort

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Verfahrensvergleichsuntersuchung, die vom Institut für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz an der Universität für Bodenkultur Wien in Zusammenarbeit mit der Firma Sy-Lab unter der Leitung von Frau Dr. Franziska Zibuschka durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Validierung wurde im Labor für Mikrobiologie des Institutes für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz an der Universität für Bodenkultur Wien das Impedanzmessverfahren Bac Trac 4100 der Firma Sy-Lab mit der herkömmlichen Membranfiltertechnik nach EN ISO 9308-1 (2000) verglichen, um die Eignung des Messsystems Bac Trac 4100 zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser festzustellen.

In diesem Zusammenhang möchte ich folgenden Personen Dank sagen.

Herrn Univ. -Prof. Dipl. -Ing. Dr. Raimund Haberl als Institutsleiter und Frau Dr. Franziska Zibuschka als Leiterin des Labors für Mikrobiologie danke ich für die Überlassung dieses Themas.

Bei Frau Dr. Franziska Zibuschka bedanke ich mich im speziellen für die sehr informative Betreuung während der Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung im Labor und für die ausdauernde, gewissenhafte und hilfsbereite Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt besonderer Dank Herrn DI Gerhard Lindner, der mich bei verschiedenen Abschnitten der Arbeit im Labor mit Rat und Tat unterstützt hat. Ob es Tipps organisatorischer oder praktischer Art, Beschaffung von Labormaterial, Unterstützung beim Transport der Proben ins Labor, Hilfe bei Arbeiten im Labor selbst oder einfach nur kameradschaftlicher Beistand waren.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des mikrobiologischen Labors für Aus- und Mithilfe bei der praktischen Arbeit.

INHALT

1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung und Zielsetzungen	3
3.	Allgemeine Grundlagen	5
3.1	<i>Escherichia coli</i> und coliforme Bakterien	5
3.2	Gesetzliche Bestimmungen und Definitionen in der Trinkwasseruntersuchung	8
3.3	Indikatororganismen in der Trinkwasseruntersuchung	13
3.3.1	Die Entwicklung der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung	13
3.3.2	Das coliforme Konzept	14
3.3.3	Anforderungen an Indikatororganismen	15
3.3.4	Aspekte bei der Anwendung von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien als Indikatororganismen	16
3.3.4.1	Definition der coliformen Bakterien und normative Regelungen	17
3.3.4.2	Zeitgemäßes Krankheitsbild	18
3.3.4.3	Aussagekraft hinsichtlich viraler und parasitärer Krankheitserreger	19
3.3.4.4	Natürliche Verbreitung der coliformen Bakterien	19
3.3.4.5	Wachstum in Trinkwasserversorgungsanlagen (Nachverkeimung)	21
3.4	Methoden zur Bestimmung von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien	28
3.4.1	Herkömmliche biochemische Methoden	29
3.4.1.1	Multiple-tube fermentation Methode	29
3.4.1.2	Membranfiltration	29
3.4.2	Enzymatische Methoden	30
3.4.2.1	Defined Substrate Technology	31
3.4.2.1.1	Colilert®-18	32
3.4.2.1.2	Colisure®	33
3.4.2.2	Colifast®	34
3.4.2.3	Anwendungen des enzymatischen Analyseprinzips für die Bestimmung von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien	35
3.4.3	Molekulare Methoden	36
3.4.3.1	Immunologische Methoden	36
3.4.3.1.1	Immunfluoreszenz Untersuchung	36
3.4.3.1.2	Biosensoren	36
3.4.3.2	Nukleinsäure basierende Methoden	37
3.4.3.2.1	Polymerasekettenreaktion	37
3.4.3.2.2	In-situ-Hybridisierung	38
3.4.3.2.3	Microarray Technologie	38
3.4.4	Elektrochemische Methoden	39
3.4.4.1	Colitrack	39
3.4.4.2	Impedanzverfahren	39
4.	Material und Methoden	43
4.1	Probenentnahme und Aufbereitung	43
4.2	Membranfiltration nach EN ISO 9308-1 (2000)	43
4.3	Wachstum auf Lactose-TTC-Agar nach EN ISO 9308-1 (2000) (Standardtest)	44
4.3.1	Anzucht von Trinkwasserbakterien	46
4.3.2	Visuelle Auswertung	46
4.3.3	Anzucht von Reinkulturen	46
4.3.4	Bestätigung und Differenzierung	46

4.4	Impedanzmessung mit Bac Trac 4100	47
4.4.1	Anzucht von Trinkwasserbakterien	50
4.4.2	Messung mit Bac Trac 4100	51
4.5	Begriffsdefinitionen laut ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN ISO 16140, (2000) (Entwurf)	51
4.6	Anreicherungsversuch	53
4.6.1	Filtration mit Vakuumfiltrationseinheit	54
4.6.2	Filtration mit Druckfiltrationseinheit	54
4.6.3	Druckfiltration mit Capsulen	55
5.	Ergebnisse	59
5.1	Verfahrensvergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999)	59
5.1.1	Projektdurchführung	59
5.1.2	Nachweis von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien nach EN ISO 9308-1 (2000) und Messsystem Bac Trac 4100 im Vergleich	62
5.1.2.1	Positive Übereinstimmung (PA) am Beispiel einer Brauchwasseruntersuchung	64
5.1.2.2	Negative Übereinstimmung (NA)	66
5.1.2.3	Negativabweichung (ND) am Beispiel einer Quellwasseruntersuchung	66
5.1.2.4	Positivabweichung (PD) am Beispiel einer Quellwasseruntersuchung	67
5.1.3	Statistische Auswertung	69
5.2	Anreicherungsversuch	74
5.2.1	Projektdurchführung	74
5.2.2	Anreicherung mit Vakuumfiltration	75
5.2.3	Anreicherung mit Druckfiltriereinheit	76
5.2.4	Anreicherung mit Capsulen	77
6.	Diskussion	81
6.1	Verfahrensvergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999)	81
6.2	Anreicherungsversuch	82
6.2.1	Vergleich der Anreicherungsverfahren	82
6.2.2	Fazit Anreicherungsverfahren	84
6.3	Betrachtung der anderen Methoden zur Bestimmung von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien	86
6.3.1	Herkömmliche biochemische Methoden	86
6.3.1.1	Multiple-tube fermentation Methode	86
6.3.1.2	Membranfiltration	87
6.3.2	Enzymatische Methoden	87
6.3.3	Molekulare Methoden	88
6.3.3.1	Immunologische Methoden	88
6.3.3.2	Nukleinsäure basierende Methoden	88
6.3.4	Elektrochemische Methoden	89
7.	Zusammenfassung	91
8.	Literatur	95

Abstract

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Vergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN ISO 16140 (2000) zwischen der herkömmlichen Membranfiltertechnik nach EN ISO 9308-1 (2000) zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien und der spezifischen Messtechnik des Impedanzverfahrens (Messsystem Bac Trac 4100 der Fa. Sy-Lab) in Kombination mit dem Coliformenmedium BiMedia 165A (Fa. Sy-Lab), die vom Institut für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz an der Universität für Bodenkultur Wien in Zusammenarbeit mit der Firma Sy-Lab durchgeführt wurde. Die getestete Alternativmethode lieferte Ergebnisse, die keinen signifikanten Unterschied zur herkömmlichen Membranfiltration nach EN ISO 9308-1 (2000) aufwiesen. Weiters setzt sich diese Arbeit aufbauend auf jungen Erkenntnissen mit dem Konzept der Indikatororganismen *E. coli* und coliforme Bakterien in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser auseinander und gibt darüber hinaus einen Überblick über das Prinzip und die Funktionsweise anderer Alternativmethoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser.

The present work describes a method comparison study according to ISO / DIS 16140 (1999) and ÖNORM EN ISO 16140 (2000) between the conventional membrane filter technique according to EN ISO 9308-1 (2000) for the determination of *E. coli* and coliform bacteria and the specific impedance technology (measurement system Bac Trac 4100 of Co. Sy-Lab) utilizing the growing medium BiMedia 165A (Co. Sy-Lab) for coliform bacteria, which was carried out by the Institute for Sanitary Engineering and Water Pollution Control at the University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna in cooperation with the company Sy-Lab. The tested alternative method presented results that showed no significant difference to the conventional membrane filtration according to EN ISO 9308-1 (2000). Furthermore this work discusses the concept of the indicator organisms *E. coli* and coliform bacteria in the microbiological quality control of potable water based on recent findings and gives an overview of the principles and the operation of other alternative methods for the determination of *E. coli* and coliform bacteria in drinking water.

1. Einleitung

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts rückt die Bedrohung durch mikrobiologische Krankheitserreger wieder vermehrt ins Bewusstsein der Bevölkerung. Dies hat einerseits mit der latenten Gefahr des Einsatzes von biologischen Waffen durch Regime oder Terroristen zu tun, andererseits mit dem regelmäßigen Auftreten von Epidemien, die sich durch unsere moderne Lebensweise – im Speziellen die gestiegene (interkontinentale) Reisetätigkeit - rasch zu Pandemien ausbreiten können. Als Beispiel wäre die Ausbreitung der Krankheit Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) zu nennen, welche zu Beginn des Jahres 2003 in einer südchinesischen Provinz ihren Ursprung hatte und in einem kurzen Zeitraum, auch zu importierten Infektionen in den Ländern Vietnam, Singapore und Thailand führte, und schließlich via Hongkong die westlichen Industrieländern - allen voran Kanada, Toronto, - erreichte (siehe World Health Organization (WHO) Dokumentation; <http://www.who.int/csr/sars/en/>). Aktuell ist die sogenannte Neue Grippe auf dem Vormarsch, die im Frühjahr in Mexiko ihren Ursprung hatte und mittlerweile weltweit zu Erkrankungen führte. Die fortschrittliche mikrobiologische Diagnostik in der Medizin kann hier meist die Erreger rasch identifizieren und bildet damit die Grundlage für Medikamententwicklung und Behandlung erkrankter Personen.

Obwohl grundsätzlich das Szenario eines terroristischen Anschlages auf Wasserversorgungssysteme denkbar ist und eine Infektion durch mikrobiologische Pathogene durch den Konsum von Trinkwasser nie ganz ausgeschlossen werden kann (z. B. Notsituationen), so gilt Trinkwasser heute als sicher. Dieses Vertrauen in Trinkwasser beruht auf der langen Tradition des Trinkwassermanagement mit dem Fokus die öffentliche Gesundheit zu schützen.

Ende des 19. Jahrhunderts und Anfang des 20. Jahrhunderts eine Zeit, in der Krankheiten wie Cholera und Typhus in den sich entwickelnden Städten grassierten, wurde man sich des Übertragungsweg Trinkwasser und dessen Bedeutung für die Gesundheit bewusst und entwickelte Techniken zur Identifizierung und Zählung von Bakterien zur mikrobiologischen Beurteilung von Trinkwasser.

Seit ungefähr dieser Zeit wird die mikrobielle Sicherheit von Trinkwasser mittels Indikatororganismen bestimmt. Die Bedeutendsten sind dabei *Escherichia coli* und coliforme Bakterien. Diese Indikatororganismen geben durch ihre Anwesenheit bzw. Abwesenheit Aufschluss über eine mögliche fäkale Belastung des Trinkwassers. Anstatt Trinkwasser auf das Vorhandensein der Vielzahl der möglichen enthaltenen Krankheitserreger zu untersuchen, die meist auch nur mit sehr aufwendigen Verfahren zu identifizieren sind, wird Trinkwasser routinemäßig hinsichtlich der vergleichsweise einfach zu detektierenden Indikatororganismen – als Indiz für die potentielle Anwesenheit von Pathogenen – untersucht.

Die Relevanz der coliformen Bakterien als Indikatororganismen wurde schon seit ihrer Einführung immer wieder hinterfragt. Je nach betrachteter Definition der coliformen Bakterien umfasst diese Gruppe unterschiedliche Gattungen, was die Interpretation von Coliformenereignissen in Trinkwasser zusätzlich erschwert, sodass in jüngster Zeit den coliformen Bakterien nur mehr ein abgestufter indikativer Wert zuerkannt wird.

Noch heute stellt bei der Versorgung mit Trinkwasser die routinemäßige Beurteilung von mikrobiologischen Kontaminationen anhand von Indikatororganismen eine der wichtigsten Aufgaben dar, um eine Infektion des Konsumenten mit Krankheitserregern auszuschließen. Die dazu derzeit eingesetzten Untersuchungstechniken für den Nachweis von Mikroorganismen in Trinkwasser sind in den nationalen und internationalen Standards festgeschrieben und beruhen im Wesentlichen noch immer auf den vor mehr als 120 Jahren etablierten Kulturverfahren mit den bekannten Nachteilen der langen Analysezeiten und des hohen Arbeitsaufwandes. Der Einsatz neuer verbesserter

Analysesysteme ist – anders als in der Medizin - durch die gesetzlichen Regelungen erschwert.

Diese langen Nachweiszeiten der gesetzlich vorgeschriebenen mikrobiologischen Untersuchungsmethoden sind sowohl aus hygienischer als auch wirtschaftlicher Sicht zu überdenken. Die mehrtägigen Wartezeiten auf Befunde erschweren die Möglichkeit auf eine mikrobielle Belastung rasch zum Schutz des Konsumenten reagieren zu können und stellen auch bei der Kontrolle von Bau-, Sanierungs- und Desinfektionsmaßnahmen, bei der Überprüfung der Funktionstüchtigkeit von Aufbereitungsanlagen, bei Neuverlegung von Leitungen und insbesondere im Zusammenhang mit Notsituationen wie technischen Defekten oder Rohrbrüchen einen erheblichen Kostenfaktor dar. Zudem sind die herkömmlichen Standardverfahren auch mit großem Material- und Arbeitsaufwand verbunden. Daher besteht international das aktuelle Anliegen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser genaue, schnelle und automatisch arbeitende Untersuchungsmethoden zu entwickeln (ZIBUSCHKA, 2002).

In Anbetracht der Nachteile der herkömmlichen Verfahren und den steigenden Ansprüchen der Trinkwasserversorger an Schnelligkeit, Praxistauglichkeit, Automatisierung und Spezifität der Bestimmungsmethoden bietet sich für deren permanente Weiterentwicklung ein breites Forschungsfeld. Das in dieser Arbeit im Rahmen eines Methodenvergleichs vorgestellte spezifische Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 mag die geforderten Verbesserungen in dem Bereich der routinemäßigen mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser erbringen. Auch das Prinzip bzw. die Funktionsweise anderer Alternativmethoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser wird im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzungen

Die spezifische Messtechnik des Impedanzverfahrens wird seit einigen Jahren erfolgreich für die Gütekontrolle von Lebensmitteln (Milch und Milchprodukte, usw.) eingesetzt. Für das Lebensmittel Trinkwasser, das naturgemäß eine im Vergleich sehr geringe Anzahl von Mikroorganismen enthält, soll im Rahmen des Impulsprogramm Wasser (IPW) das spezifische Impedanzmesssystem Bac Trac 4100, eine Entwicklung der Firma Sy-Lab mit Sitz in Purkersdorf bei Wien, in Zusammenarbeit mehrere auf dem Gebiet der mikrobiologischen Analyse tätigen Institute an die Erfordernisse der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser anzupassen.

Vom Institut für Siedlungswasserbau, Industriewirtschaft und Gewässerschutz der Universität für Bodenkultur Wien soll das Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 auf seine Eignung zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser geprüft werden. Das Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem spezifischen Nährmedium BiMedia 165A, ebenfalls eine Entwicklung der Firma Sy-Lab, erlaubt die zur Beurteilung einer fäkalen Kontamination von Trinkwasser bedeutenden Indikatororganismen *E. coli* und coliforme Bakterien nachzuweisen.

Auf Grundlage der zum Zeitpunkt der Untersuchung gültigen ISO/DIS 16140 (1999) „Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln Arbeitsvorschriften für die Validierung alternativer Verfahren“ wird eine Vergleichsuntersuchung durchgeführt. Eine repräsentative Anzahl von Proben soll sowohl mittels des Impedanzverfahrens als auch mittels der für Trinkwasseruntersuchungen allgemein anerkannten Methode der Membranfiltration nach ÖNORM EN ISO 9308-1 (2000) „Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien Teil 1: Membranfiltration“ auf mikrobiologische Belastungen mit *E. coli* und coliformen Bakterien untersucht werden, um die grundsätzliche Eignung des Messsystem Bac Trac 4100 kombiniert mit dem spezifischen Coliformenmedium BiMedia 165A im Bereich der routinemäßigen Güteüberwachung von Trinkwasser festzustellen.

Neben der Genauigkeit des Impedanzverfahrens ist die Frage der Sensitivität des Verfahrens von speziellem Interesse. Trinkwasser ist naturgemäß nur gering mit Keimen belastet, wodurch sich jedoch keine signifikante Häufung von falsch – negativen Ergebnissen ableiten darf.

Weiters ist die durch das Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 erzielbare Verkürzung der Untersuchungsdauer von besonderer Bedeutung, da die standardisierten und gesetzlich festgelegten Verfahren zur Trinkwasseranalyse sehr zeitaufwendig sind und Ergebnisse erst nach mehreren Tagen vorliegen. Es ist zu erwarten, dass aufgrund des Analyseprinzips des Messsystems Bac Trac 4100 belastete Proben wesentlich schneller erkannt werden. Durch Anreicherung größerer Volumina (Vermehrung der Bakterienzahl) kann dieser Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren noch gesteigert werden. Abzuschätzen ist hier der zeitliche Mehraufwand durch die Probenanreicherung – in Abhängigkeit der Anreicherungsmethode und der Probenvolumina - im Verhältnis zu den daraus resultierenden Messzeitverkürzungen.

Durch die zirka dreimonatige Untersuchungsdauer werden Erfahrungen mit dem Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 im allgemein Laborbetrieb gesammelt. Probenaufbereitung, automatische Steuerung des Messvorganges, sowie automatische Datenspeicherung und Datenauswertung durch das Messsystem Bac Trac 4100 versprechen wesentliche Vereinfachungen in der routinemäßigen mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser.

Der Einsatz von *E. coli* und coliformen Bakterien als Indikator zur Beurteilung einer fäkalen Belastung von Trinkwasser hat im Zusammenspiel mit geeigneten Desinfektionsmaßnahmen die hygienische Qualität von Trinkwasser verbessert und zu einer deutlichen Abnahme von wasserbedingten Krankheiten in der Bevölkerung seit ihrer

Einführung vor mehr als 120 Jahren geführt. In jüngerer Zeit wird allerdings der indikative Wert der coliformen Bakterien hinterfragt. Die festgestellten Eigenschaften der coliformen Bakterien, die zu dieser Entwicklung geführt haben, werden dargestellt und diskutiert. Hierbei wird speziell auf das Problem der Nachverkeimung eingegangen. Die Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers beim Durchgang durch das Leitungsnetz ist im Moment eines der größten Probleme für die Wasserversorger.

In den letzten Jahrzehnten gab es auf dem Gebiet der mikrobiologischen Analyse zahlreiche Neuerungen. Das hat dazu geführt, dass eine Vielzahl neuer Methoden und Verfahren auch auf dem Gebiet der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien angewandt werden. Diese Alternativmethoden beruhen auf unterschiedlichen Analyseprinzipien (enzymatisch, molekularbiologisch, elektrochemisch,...) und können ebenso wie das Impedanzverfahren die mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser beschleunigen und vereinfachen. In der gegenständlichen Arbeit wird ein Überblick über das Prinzip und die Funktionsweise solcher alternativer Methoden und ein Ausblick über ihre gegenwärtige und mögliche Anwendung in der Trinkwasseranalyse gegeben.

3. Allgemeine Grundlagen

3.1 *Escherichia coli* und coliforme Bakterien

Escherichia coli (im Folgenden *E. coli*) ist nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt und gehört wohl zu den am meisten untersuchten Organismen der Welt. Es kommt natürlicherweise in der Darmflora des Menschen und allgemein der Warmblüter vor. *E. coli* ist zwar nicht das am zahlenmäßig häufigsten vorkommende Bakterium der menschlichen Darmflora, kann jedoch einige Zeit außerhalb des Verdauungstraktes überleben und ist relativ einfach nachzuweisen. Nicht nur aus diesen Gründen eignet sich *E. coli* als Indikatorbakterium für den Nachweis einer fäkalen Belastung von Trinkwasser (siehe Kapitel 3.3).

E. coli ist phänotypisch ein gram-negatives, fakultativ anerobes und peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium (siehe Abbildung 1). Nach der dieser Untersuchung zugrundeliegenden Norm EN ISO 9308-1 (2000) für den Nachweis und die Zählung von *E. coli* und coliformen Bakterien werden folgende Eigenschaften für *E. coli* definiert. *E. coli* sind demnach lactose-positive Bakterien, die unter aeroben Bedingungen auf einem selektiven und differentialdiagnostischen Laktose-Kulturmedium innerhalb von 21 ± 3 h bei $36 \pm 2^\circ\text{C}$ unter Bildung von Säure Kolonien bilden, sowie weiters oxidase-negativ sind und zusätzlich innerhalb von 21 ± 3 h bei $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ Indol aus Tryptophan bilden.

In jüngster Zeit gewinnen zunehmend Überlegungen an Bedeutung, die *E. coli* anhand der Enzyme β -Galaktosidase und β -Glukuronidase definieren. Der kombinierte Nachweis von β -Galaktosidase und β -Glukuronidase ist hoch spezifisch und selektiv für *E. coli* und weitaus zuverlässiger als Tests auf Laktosefermentation und Gasbildung (SARTORY et al., 2007). Mittlerweile sind auf dem Markt Entwicklungen verfügbar, die auf diesem enzymatischen Ansatz beruhen und entscheidende Verbesserungen auf dem Gebiet der routinemäßigen Qualitätskontrolle von Trinkwasser versprechen (siehe Kapitel 3.4.2).

Die Abbildung 1 zeigt linkerhand eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* sowie rechts daneben eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines *E. coli* kurz vor der Teilung. Die Stäbchenform und die über die gesamte Zelloberfläche verteilte peritriche Begeißelung (elektronenmikroskopische Aufnahme) sind zu erkennen.

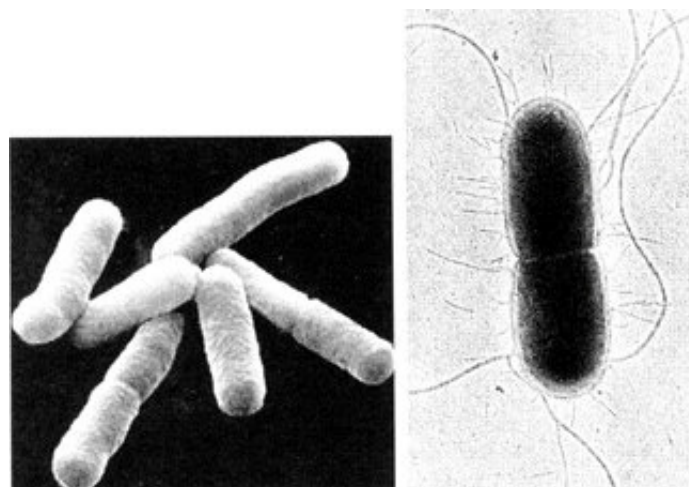


Abbildung 1: Links rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* und rechts elektronenmikroskopische Aufnahme eines *E. coli* kurz vor der Teilung, Quelle: wissenschaft online (2009)

Die coliformen Bakterien stellen eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien dar, die taxonomisch zum Teil sehr unterschiedlich sind und durch mehrere gemeinsame Stoffwechseleigenschaften zusammengefasst werden. Coliforme Bakterien bewohnen anders als *E. coli* nicht ausschließlich die Darmflora der Warmblüter, sondern weisen auch Vertreter auf, deren natürlicher Lebensraum Böden und Oberflächengewässer sind (siehe Tabelle 1). Dieser Umstand ist beim Nachweis von Coliformen in Trinkwasser zu bedenken (siehe Kapitel 3.3 und 3.3.4).

Phänotypisch sind coliforme Bakterien gram-negative, unbewegliche oder durch peritriche Begeißelung bewegliche, nicht-sporenbildende, cytochromoxidase-negative Stäbchenbakterien, die Laktose aerob und anaerob abbauen können. Die Definition der coliformen Bakterien ist jedoch nicht exakt festgelegt und basiert auf allgemeinen biochemischen Eigenschaften, die nur durch die jeweilige Untersuchungsmethode charakterisiert sind. Die im Laufe der Zeit an neue Erkenntnisse angepassten Definitionen und neu entwickelten Nachweismethoden haben dazu geführt, dass sich auch die zur Gruppe der Coliformen zählenden Gattungen änderten (siehe Tabelle 1).

In frühen Zeiten bildete hauptsächlich die Gasbildung bei der Fermentation von Laktose in einer Nährbouillon die Grundlage der Definition der coliformen Bakterien. Gewisse Definitionen berücksichtigten auch die Säurebildung bei der Laktosevergärung. Wird Gasbildung und Säurebildung bei der Vergärung von Laktose gemeinsam berücksichtigt so fallen unter den Begriff der Coliformen die Gattungen *Escherichia*, *Enterobakter*, *Klebsiella* und *Citrobakter*. Eine weitere Definitionsmodifikation ergibt sich durch die Durchführung der Laktosefermentation bei einer Inkubationstemperatur von 44,5°C (siehe Fäkalcoliforme in Kapitel 3.3.4.4).

Besonders der Nachweis der Gasbildung als Merkmal von *E. coli* und coliformen Bakterien wurde bald in Frage gestellt. Dennoch wurde dieser Test ein so fester Bestandteil der Definition von *E. coli* und Coliformen, dass die in den 1950er Jahren eingeführten Membranfiltrationsverfahren (siehe Kapitel 3.4.1.2) die Gasbildung in Laktose-Pepton-Wasser als zusätzlichen Bestätigungsschritt beinhalteten, was aber das Vorliegen der Ergebnisse um weitere 24 Stunden verzögerte. Als die Stoffwechselwege der Laktose-Fermentation besser erforscht waren, erkannte man mehr und mehr, dass das Merkmal Gasbildung von geringer hygienischer Bedeutung war (SARTORY et al., 2007). WAITE (1991; zit. bei SARTORY et al., 2007) stellte in einem Review-Artikel zur Verwendung von Coliformen als Indikator überhaupt fest, dass „niemand jemals einen Zusammenhang zwischen Gasbildung und fäkalem Ursprung nachgewiesen habe“.

Das Kriterium der Gasbildung bei der Laktosefermentation ist jedoch bis heute ein so fester Bestandteil in der Wassermikrobiologie, dass dieses Merkmal noch bei einigen internationalen Bestimmungsmethoden wie z. B. der Multiple-tube fermentation Methode (siehe Kapitel 3.4.1.1) nach ISO 9308-2 (1990) angewendet wird. In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Norm EN ISO 9308-1 (2000) findet sich dieses Kriterium allerdings nicht mehr. Coliforme Bakterien sind gemäß genannter Norm definiert als laktose-positive Bakterien, die unter aeroben Bedingungen auf einem selektiven differentialdiagnostischen Lactose-Kulturmedium innerhalb von 21 ± 3 h bei $36 \pm 2^\circ\text{C}$ unter Bildung von Säure Kolonien bilden. Nach dieser Definition erweitert sich der Begriff der Coliformen um die Gattungen *Yersinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Pantoea* und *Kluyver*.

Analog der jungen Definition von *E. coli* mittels der Enzyme β -Galaktosidase und β -Glukuronidase lassen sich die coliformen Bakterien ebenfalls durch das Enzym β -Galaktosidase definieren, das von der Mehrzahl der Coliformen gebildet wird. Diese „vereinfachende“ Definition erweitert das Spektrum der coliformen Bakterien um die Gattungen *Cedecea*, *Ewingella*, *Moellerella*, *Leclercia*, *Rahnella* und *Yokenella*. Das Enzym β -Galaktosidase ist allerdings wesentlich für die Laktosevergärung und es wird dadurch die in Wirklichkeit heterogenere – weitere Gattungen umfassende - Gruppe der Coliformen umfassender beschreiben als es mit den herkömmlichen

Laktosefermentationsmethoden bisher möglich war. In jüngster Zeit sind basierend auf diesem enzymatischen Ansatz kommerzielle Produkte entwickelt worden, die Vereinfachungen für die auf dem Gebiet der routinemäßigen Trinkwasseranalyse tätigen Laboratorien versprechen (siehe Kapitel 3.4.2).

Bei einem Vergleich der entsprechenden Definitionen für *E. coli* und coliformen Bakterien ist ersichtlich, dass es sich bei *E. coli* um ein coliformes Bakterium handelt, allerdings umgekehrt nicht jedes coliforme Bakterium zur Gattung *Escherichia* zu zählen ist.

In Tabelle 1 sind in Abhängigkeit der im Laufe der Zeit verbesserten Diagnostik in der Mikrobiologie und der damit in Zusammenhang stehenden Definitionen die Änderungen der unter den Begriff der Coliformen fallenden Gattungen zusammengefasst. Die natürliche Verbreitung der enthaltenen Gattungen ist durch entsprechende Markierung veranschaulicht.

Vor 1994: biol. Abbau von Laktose in Gas und Säure innerhalb von 24 – 48 Stunden bei $36 \pm 2^\circ\text{C}$, thermotolerante oder fäkalcoliforme bei $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$	Seit 1994: Definition von Coliformen wurde zu Säurebildung von Laktose geändert.	Enzymbasierte Definition: Neuerdings werden Bakterien, die das β -Galactosidase Gen enthalten, zur Gruppe der coliformen Bakterien gezählt.
<i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> * <i>Entereobacter</i> * <i>Citrobacter</i> *	<i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> * <i>Entereobacter</i> * <i>Citrobacter</i> * <i>Yersinia</i> * <i>Serratia</i> * <i>Hafnia</i> * <u><i>Pantoea</i></u> * <u><i>Kluyvera</i></u> *	<i>Escherichia</i> <i>Klebsiella</i> * <i>Entereobacter</i> * <i>Citrobacter</i> * <i>Yersinia</i> * <i>Serratia</i> * <i>Hafnia</i> * <u><i>Pantoea</i></u> * <u><i>Kluyvera</i></u> * <u><i>Cedecea</i></u> * <u><i>Ewingella</i></u> * <u><i>Moellerella</i></u> * <u><i>Leclercia</i></u> * <u><i>Rahnella</i></u> * <u><i>Yokenella</i></u> *

Tabelle 1: Mitglieder der coliformen Bakterien in Abhängigkeit sich entwickelnder Definitionen und verbesserter mikrobiologischer Diagnostik (KREIG, 1984, TOPLEY, 1997, EWING, 1982, BALLOWS, 1992; zit. bei UNI Wien, 2009); die natürliche Verbreitung der enthaltenen Gattungen ist durch entsprechende Markierung dargestellt:

hochgestelltes Sternchen*: Coliforme, die in der Umwelt und in Fäkalien vorkommen.

unterstrichen und hochgestelltes Sternchen*: Coliforme, die als primär in der Umwelt vorkommend angesehen werden.

Allgemein gehören *E. coli* und coliforme Bakterien zu der Familie der Enterobacteriaceae (griech. „enteron“: Darm) und speziell *E. coli* ist eines der bedeutendsten Indikatororganismen bei hygienischen Untersuchungen von Trinkwasser (siehe Kapitel 3.3) und generell Lebensmitteln.

E. coli und coliforme Bakterien zeichnen sich durch gutes Wachstum auf Glucose- oder Lactose-Pepton-Nährböden aus. In der Regel verwendet man Lactosemedien, um im Vorhinein selektive Bedingungen herzustellen, unter denen möglichst wenige andere Bakterien wachsen. Im ersten Schritt der Laktosefermentation erfolgt die Spaltung des Moleküls in Glukose und Galaktose mittels des Enzyms β -Galaktosidase. Dieses Enzym können wie bereits erwähnt sowohl *E. coli* als auch die coliformen Bakterien bilden, jedoch die meisten Boden- und Wasserbakterien nicht. Diese gewisse selektive Wirkung der Lactose-Pepton-Nährmedien wird bei manchen Nachweismethoden ausgenützt (siehe u.a. Kapitel 4.3 und 4.4.1). Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips stellen die enzymatischen Methoden (siehe Kapitel 3.4.2) dar, die das Enzym β -Galaktosidase im Falle der coliformen Bakterien und die Enzyme β -Galaktosidase und β -Glukuronidase im Falle von *E. coli* bei der Identifikation mit Hilfe chromogener oder fluorogener Substrate nachweisen.

3.2 Gesetzliche Bestimmungen und Definitionen in der Trinkwasseruntersuchung

Die Grundlage für die Qualitätskontrolle für Trinkwasser in Europa bildet die Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, die im Dezember 1998 in Kraft trat. Sie regelt die wesentlichen Rahmenbedingungen und Qualitätsstandards für Untersuchungen von Wasser für den menschlichen Gebrauch europaweit. Eine wesentliche Intention dieser Rechtsvorschrift ist es, angesichts der Bedeutung die Wasser für den menschlichen Gebrauch auf die Gesundheit hat, Gemeinschaftsstandards für grundlegende und vorbeugende gesundheitsbezogene Qualitätsparameter für Wasser festzulegen, [...], um die dauerhafte Nutzung von Wasser für den menschlichen Gebrauch sicherzustellen. Damit ergibt sich als Ziel dieser Richtlinie, die menschliche Gesundheit vor den nachteiligen Einflüssen, die sich aus der Verunreinigung von für den menschlichen Gebrauch bestimmten Wasser ergeben, durch Gewährleistung seiner Genusstauglichkeit und Reinheit zu schützen.

Im Sinne der gegenständlichen Richtlinie ist Wasser für den menschlichen Gebrauch als alles Wasser definiert, sei es im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, das zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen oder anderen häuslichen Zwecken bestimmt ist, und zwar ungeachtet seiner Herkunft und ungeachtet dessen, ob es aus einem Verteilungsnetz, in Tankfahrzeugen, in Flaschen oder anderen Behältern bereitgestellt wird. Weiters gelten die Bestimmungen dieser Richtlinie auch für alles Wasser, das in einem Lebensmittelbetrieb für die Herstellung, Behandlung, Konservierung oder zum Inverkehrbringen von für den menschlichen Gebrauch bestimmten Erzeugnissen oder Substanzen verwendet wird, [...]. Aus dieser Definition ist klar ersichtlich, dass an Wasser, das für verschiedenste menschliche Zwecke - wie beispielsweise das Waschen von Kleidung - genutzt werden kann, dieselben Anforderungen gestellt werden wie für Trinkwasser.

Die Richtlinie 98/83/EG des Rates gibt in ihrem Anhang I mikrobiologische und chemische Parameter bzw. Indikatorparameter für die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch an. Die entsprechenden Parameterwerte sind als Mindeststandards aufzufassen und dürfen nicht weniger streng in den nationalen Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten Eingang finden. Die Tabelle 2 stellt die

mikrobiologischen Parameter und deren Parameterwerte nach Richtlinie 98/83/EG des Rates zusammen.

Parameter	Parameterwert [Anzahl/100ml]	Parameterwert für Wasser das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen für den Verkauf angeboten wird
Escherichia coli (E.Coli)	0	0/250 ml
Enterokokken	0	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	-	0/250 ml
Koloniezahl bei 22°C	-	100/ml
Koloniezahl bei 37°C	-	20/ml

Tabelle 2: Mikrobiologische Parameter und Parameterwerte nach der Richtlinie 98/83/EG des Rates

In Tabelle 3 sind die mikrobiologischen Indikatorparameter und deren Indikatorparameterwerte nach Richtlinie 98/83/EG des Rates zusammengefasst.

Indikatorparameter	Indikatorparameterwert [Anzahl/100ml]	Indikatorparameterwert bei Wasser das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen abgefüllt ist
Coliforme Bakterien	0	0/250 ml
Clostridium perfringens ¹	0	-
Koloniezahl bei 22°C	Ohne anormale Veränderung	-

Tabelle 3: Mikrobiologische Indikatorparameter und Indikatorparameterwerte nach der Richtlinie 98/83/EG des Rates

Anmerkung ¹: Dieser Parameter braucht nur bestimmt werden, wenn das Wasser von Oberflächengewässer stammt oder beeinflusst ist

Der Anhang II der Richtlinie 98/83/EG des Rates regelt die Überwachung von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Darin ist der Umfang von routinemäßigen und umfassenden Kontrollen sowie deren Mindesthäufigkeit der Probenahme in Abhängigkeit der Menge des in einem Versorgungsgebiet abgegeben oder produziert Wassers tabelliert. In Anhang III der Richtlinie 98/83/EG des Rates sind für die zu untersuchenden - insbesondere der mikrobiologischen - Parameter, sofern ein entsprechendes Analyseverfahren spezifiziert ist, CEN/ISO-Verfahren als Referenzfunktion angegeben.

Für die chemischen Parameter sind für das verwendete Analyseverfahren spezifische Verfahrenskennwerte angegeben.

Ein weiterer wesentlicher Punkt einer qualitativen Trinkwasserüberwachung ist der Ort der Probennahme. In der Richtlinie 98/83/EG ist dies in Artikel 6 „Stelle der Einhaltung“ geregelt. Dort heißt es, dass die Parameterwerte einzuhalten sind:

- a) bei Wasser, das aus einem Verteilungsnetz stammt, am Austritt aus denjenigen Zapfstellen auf Grundstücken oder in Gebäuden und Einrichtungen, die normalerweise der Entnahme von Wasser für den menschlichen Gebrauch dienen;
- b) bei Wasser aus Tankfahrzeugen an der Entnahmestelle von Tankfahrzeugen;
- c) bei Wasser, das in Flaschen oder andere Behältnisse abgefüllt und zum Verkauf bestimmt ist, am Punkt der Abfüllung;
- d) bei in einem Lebensmittelbetrieb verwendetem Wasser an der Stelle der Verwendung des Wassers im Betrieb.

Vereinfachend kann die Probennahmestelle einer Trinkwasseruntersuchung mit dem Schlagwort „point of use“ umschrieben werden.

In Österreich ist die Richtlinie 98/83/EG des Rates durch die Verordnung des Bundesministers für soziale Sicherheit und Generationen über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (2001) - kurz Trinkwasserverordnung - (BGBl II Nr.304/2001) und durch die Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen, mit der die Trinkwasserverordnung geändert wird (2006) (BGBl II Nr.254/2006) in nationales Recht umgesetzt. Gemäß dieser Trinkwasserverordnung muss Wasser geeignet sein, ohne Gefährdung der menschlichen Gesundheit getrunken oder verwendet zu werden. Wie auch in der Richtlinie 98/83/EG des Rates ist das gegeben, wenn es

- 1. Mikroorganismen, Parasiten und Stoffe jedweder Art nicht in einer Anzahl oder Konzentration enthält, die eine potentielle Gefährdung der menschlichen Gesundheit darstellen und
- 2. den [...] festgelegten Mindestanforderungen [...] entspricht.

Die österreichische Trinkwasserverordnung ist im Allgemeinen strenger ausgelegt als die Richtlinie 98/83/EG des Rates. Bezüglich der mikrobiologischen Parameter wird nicht desinfiziertes und desinfiziertes Wasser unterschieden. Die Untersuchung desinfizierten Wassers soll der Überprüfung der Wirksamkeit einer Desinfektionsmaßnahme dienen und bezieht die Parameterwerte auf ein größeres Untersuchungsvolumen (250 ml). Zusätzlich sind die mikrobiologischen Parameter um den Parameter *Pseudomonas aeruginosa* erweitert. In Tabelle 4 sind die mikrobiologischen Parameter und Parameterwerte der österreichischen Trinkwasserverordnung zusammengefasst.

Parameter	Parameterwert [Anzahl/100 ml] nicht desinfiziertes Wasser	Parameterwert [Anzahl/250 ml] desinfiziertes Wasser, unmittelbar nach Abschluss der Desinfektion	Parameterwert [Anzahl/Volumseinheit] für Wasser das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen in Verkehr gebracht wird, gilt am Punkt der Abfüllung
Escherichia coli	0	0	0/250 ml
Enterokokken	0	0	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0/250 ml
koloniebildende Einheiten bei 22°C	-	-	100/ml
koloniebildende Einheiten bei 37°C	-	-	20/ml

Tabelle 4: Mikrobiologische Parameter und Parameterwerte nach der österreichischen Trinkwasserverordnung für nicht desinfiziertes Wasser, desinfiziertes Wasser und für Wasser, das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen in Verkehr gebracht wird

Die koloniebildenden Einheiten (KBE), coliforme Bakterien und Clostridium perfringens gelten nach der österreichischen Trinkwasserverordnung für nicht desinfiziertes und desinfiziertes Wasser als mikrobiologische Indikatorparameter. Für die koloniebildenden Einheiten werden – anders als in der Richtlinie 98/83/EG des Rates, wo nur anormale Veränderungen von Relevanz sind – Indikatorparameterwerte und ein zusätzlicher Temperaturbereich angegeben. In Bezug auf die coliformen Bakterien und Clostridium perfringens ist anzumerken, dass diese erst seit dem Inkrafttreten der Änderung der Trinkwasserverordnung am 6. Juli 2006 (BGBl. II Nr. 254/2006) zu den mikrobiologischen Indikatorparameter gerechnet werden, davor zählten sie zu den mikrobiologischen Parametern (siehe Kapitel 3.3 und 3.3.4). Die mikrobiologischen Indikatorparameter und Indikatorparameterwerte nach der österreichischen Trinkwasserverordnung sind in Tabelle 5 angegeben.

Die chemischen Parameter der österreichischen Trinkwasserverordnung sind in Einklang mit der Richtlinie 98/83/EG des Rates. Lediglich die Parameterwerte für Nitrit und Trihalomethane insgesamt sind strenger ausgelegt.

Bezüglich der Überwachung wird in der österreichischen Trinkwasserverordnung ebenfalls in routinemäßige und umfassende Kontrollen unterschieden. Ein Vergleich mit der Richtlinie 98/83/EG des Rates zeigt, dass das Set der zu analysierenden Parameter der routinemäßigen Kontrollen umfangreicher ist und bei den umfassenden Kontrollen in Standard- und Volluntersuchung unterschieden wird. Weiters ist in Anhang II Teil B der österreichischen Trinkwasserverordnung für die jeweilige Kontrollenart die Mindesthäufigkeit der Probennahmen in Abhängigkeit der Menge des abgegebenen Wassers tabelliert. Die für die Analyse der Parameter spezifizierten Verfahren und Verfahrenskennwerte der Trinkwasserverordnung unterscheiden sich nicht von den europäischen Vorgaben.

Indikatorparameter	Indikator= parameterwert nicht desinfiziertes Wasser	Indikator= parameterwert desinfiziertes Wasser, unmittelbar nach Abschluss der Desinfektion	Indikatorparameterwert für Wasser das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen in Verkehr gebracht wird, gilt am Punkt der Abfüllung
koloniebildende Einheiten bei 22°C	100 [Anzahl/ml]	10 [Anzahl/ml]	-
koloniebildende Einheiten bei 37°C	20 [Anzahl/ml]	10 [Anzahl/ml]	-
coliforme Bakterien	0 [Anzahl/100 ml]	0 [Anzahl/250 ml]	0 [Anzahl/250 ml]
<i>Clostridium perfringens</i> ¹	0 [Anzahl/100 ml]	0 [Anzahl/250 ml]	0 [Anzahl/250 ml]

Tabelle 5: Mikrobiologische Indikatorparameter und Indikatorparameterwerte nach der österreichischen Trinkwasserverordnung für nicht desinfiziertes Wasser, desinfiziertes Wasser und für Wasser, das in Flaschen oder sonstigen Behältnissen in Verkehr gebracht wird
Anmerkung ¹: Dieser Parameter braucht nur bestimmt werden, wenn das Wasser von Oberflächengewässer stammt oder beeinflusst ist.

Die österreichische Trinkwasserverordnung ist in Bezug auf die Einhaltung der festgelegten Mindestanforderungen von Wasser für den menschlichen Gebrauch gleichlautend wie die Richtlinie 98/83/EG des Rates (siehe oben). Es gilt für die Probennahmestelle vereinfachend der Punkt der Verwendung.

Wie das Beispiel Österreich zeigt, empfiehlt es sich bei europäischen Trinkwasseruntersuchungen neben der einheitlichen Richtlinie 98/83/EG des Rates auch die jeweilig nationalen Bestimmungen zu beachten, da diese dem Subsidiaritätsprinzip unterliegen. Beispielsweise haben auch „die Niederlanden generell strengere Standards gesetzt als es die europäisch Richtlinie erfordert“ (WAITE, 1997) und Frankreich hat zusätzliche numerische Standards für eine Reihe von Organismen (Pathogene wie *Salmonella*, *Enterovirus*,...).

In Hinsicht auf die hygienische Bedeutung von *E. coli* und coliforme Bakterien bei Trinkwasseruntersuchungen herrscht international weitestgehend Einigkeit, dass Trinkwasser von einwandfreier Qualität unter anderem frei von *E. coli* sein muss. Der indikative Wert der coliforme Bakterien wird in jüngster Zeit differenzierter betrachtet (siehe Kapitel 3.3 und 3.3.4). Dies soll Tabelle 6 veranschaulichen, die eine Zusammenstellung der Bestimmungen ausgewählter Regelwerke in Bezug auf *E. coli* und coliforme Bakterien in Trinkwasser enthält.

Land	<i>E. coli</i> [Anzahl/100 ml]	Coliforme Bakterien [Anzahl/100 ml]
Australien	0	(0)
Deutschland	0	0
Europäische Union	0	(0)
Kanada	0	0
Österreich	0	(0)
Schweiz	0	k. A.
USA	0	0
WHO	0	(0)

Tabelle 6: Zusammenstellung einiger gültiger Regelwerke; die festgelegten Grenzwerte für *E. coli* und coliformen Bakterien sind allgemein 0 Zellen/100 ml.

3.3 Indikatororganismen in der Trinkwasseruntersuchung

Indikatororganismen geben im Rahmen mikrobiologischer Trinkwasseruntersuchungen durch ihre Anwesenheit bzw. Abwesenheit Aufschluss über die mikrobiologische Qualität des Trinkwassers. Es werden die in der Regel einfach nachzuweisenden Indikatororganismen gleichsam stellvertretend für pathogene Mikroorganismen bestimmt. Die Identifizierung der Krankheitserreger selbst wird primär nur dann angewandt, wenn in einem konkreten Fall die Ursache einer Epidemie abzuklären ist bzw. ein besonderer Verdacht vorliegt. Das Prinzip der Trinkwasseruntersuchung mittels Indikatororganismen wird am Beispiel der Indikatororganismen *E. coli* und coliformer Bakterien in Kapitel 3.3 erläutert.

3.3.1 Die Entwicklung der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung

Der Beginn des Industriezeitalters führte zu der Entstehung der ersten großen Ballungszentren. Mit dieser Entwicklung einhergehend grassierten in den Städten vermehrt Seuchen wie z.B. Cholera und Typhus, die von kontaminiertem Trinkwasser verursacht werden. Als Antwort auf derartige wasserbedingten Krankheiten wurden die Ursachen erforscht, Konzepte zur Minimierung der Infektionsgefahr formuliert sowie adäquate Methoden zur Analyse der Mikroorganismen entwickelt. Diese historischen Anstrengungen führten zu einer deutlichen Abnahme wasserbedingten Krankheiten (siehe Kapitel 3.3.4) und stellen noch bis heute die Basis der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung dar. Zunehmend werden aber Entwicklungen der modernen mikrobiologischen Analytik an die Bedürfnisse der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung (siehe Kapitel 3.4) angepasst.

WAITE (1997) gibt in einem Artikel einen geschichtlichen Abriss über die Entstehung und Entwicklung der mikrobiologischen Trinkwasseruntersuchung mittels der Indikatororganismen *E. coli* und coliformer Bakterien, der nachfolgend zusammengefasst wiedergegeben wird. Einige der in Kapitel 3.3.4 behandelten Kritikpunkte am coliformen Konzept ergeben sich aus dem geschichtlichen Kontext, der hier zur Verständlichkeit kurz dargestellt wird.

Vor rund 130 Jahren nahm mit der Feststellung von KOCH (1877; zit. bei WAITE, 1997), dass Bakterien die Ursache für zu mindest einige Krankheiten seien könnten und seiner Entwicklung eines festen Mediums für die Isolation von Bakterienreinkulturen (KOCH, 1881; zit. bei WAITE, 1997), die Bakteriologie als angewandte Wissenschaft ihren Anfang. Daraufhin wurde begonnen Wasser mittels Bakterienzählung zu untersuchen, doch wurde bald erkannt, dass die einfache Schätzung der allgemeinen Bakterien eines Wassers nicht gut mit der Wahrscheinlichkeit von menschlichen Infektionen übereinstimmt. Vielmehr würde eine fäkale Verunreinigung des Wassers durch Organismen abgebildet werden, die in Ausscheidungen zu finden sind.

In diese Zeit fallen auch Theodor ESCHERICH (1885) Untersuchungen von Organismen in den Fäkalien von Neugeborenen und Säuglingen. Er beschrieb etliche Organismen in den Fäkalien von Säuglingen unter anderen ein freibewegliches Stäbchenbakterium, das er Bakterium coli nannte. Weitergehende Untersuchungen anderer zeigten, dass Bakt. coli allgemein in menschlichen Fäkalien zu finden ist.

SCHARDINGER (1892; zit. bei WAITE, 1997) schlug aufgrund der Untersuchungsergebnisse - dass Bact. coli immer in Fäkalien enthalten sind und bis zu dieser Zeit noch nirgendwo anders als in Fäkalien nachgewiesen wurden - vor, dass die Anwesenheit von Bact. coli in Wasser als Indikator für eine fäkale Kontamination des Wassers genommen werden kann und folglich die mögliche Anwesenheit von anderen pathogenen Organismen anzeigt. Damit war das Prinzip der Indikatororganismen in der Trinkwasseruntersuchung festgelegt.

Fortan wurde Bact. coli bei Trinkwasseruntersuchungen als Indikator für die potentielle Anwesenheit von pathogenen Darmbakterien angewandt. Als Kriterium zur Bestimmung von Bact. coli (siehe Kapitel 3.1) wurde ihre Eigenschaft der Gasproduktion bei der Laktosevergärung ausgenutzt. Man erkannte jedoch schon bald, dass Bact. coli nicht eine einzelne Art sondern eine Gruppe von ähnlichen Organismen ist, von denen nicht alle unbedingt mit einer fäkalen Kontamination in Verbindung stehen.

Mit dem Fortschritt in der Taxonomie und der Methodologie wurde von Bakteriologen *E. coli* schließlich als jene Spezies benannt, welche ausschließlich einen fäkalen Ursprung hat und somit das oben beschriebene Indikatorprinzip am besten erfüllt. Anstelle Trinkwasseruntersuchungen an diese Erkenntnisse anzupassen, wurde vielmehr aus praktischen als aus wissenschaftlichen Gründen die bisherige Vorgangsweise beibehalten und *E. coli* nunmehr als ergänzenden Parameter verwendet. Der festgestellten Heterogenität von Bact. coli wurde fortan durch die Verwendung des Begriffs coliforme Bakterien Rechnung getragen.

3.3.2 Das coliforme Konzept

Das Prinzip der mikrobiologischen Trinkwasseranalyse wird in diesem Kapitel am Beispiel von *E. coli* kurz dargestellt werden, da bis jetzt der Widerspruch besteht, dass die in Kapitel 3.1 beschriebenen Indikatororganismen, *E. coli* und coliforme Bakterien, im allgemeinen keine Gesundheitsbedrohung für den Menschen darstellen, jedoch nach den internationalen Standards nicht in hygienisch einwandfreiem Trinkwasser vorhanden sein dürfen.

E. coli als normaler und harmloser Bestandteil der menschlichen Darmflora stellt durch seine Anwesenheit im Trinkwasser grundsätzlich noch keine gesundheitliche Gefahr für den Menschen dar. Den Darm bewohnen aber auch eine Reihe von Krankheits- bzw. Seuchenerreger, die von akut Kranken, Rekonvaleszenten und „Dauerausscheidern“ mit dem Kot ausgeschieden werden und gemeinsam mit *E. coli* ins Trinkwasser gelangen können. Für den Nachweis eines speziellen Krankheits- bzw. Seuchenerreger ist die Anwendung einer spezifischen Untersuchungsmethode erforderlich. Demnach würde eine lückenlose mikrobiologische Qualitätskontrolle einer Trinkwasserprobe hinsichtlich jedes nur erdenklichen Krankheitserregers eine Vielzahl von speziellen mitunter aufwendigen Untersuchungsverfahren erfordern. In Anbetracht dessen, dass selten eine pathogene Kontamination vorliegen sollte, bedient man sich in der Trinkwasseranalyse unter anderen des Bakteriums *E. coli* als Indikatororganismus. Anstelle der Krankheitserreger selbst wird *E. coli* mit vergleichsweise relativ einfachen Mitteln nachgewiesen. Der Nachweis von *E. coli* deutet demnach auf eine Verseuchung der Trinkwasserprobe mit Darminhalt und Darmbakterien hin, unter denen auch Krankheits- bzw. Seuchenerreger sein können. Auf gleiche Weise wie *E. coli* ins Trinkwasser gelangt ist, können auch humanpathogene Mikroorganismen in das Trinkwasser gelangt sein und dieses somit belasten. Aus diesem Grund legen internationale und nationale Normen im Bereich der Trinkwasserqualität fest, dass 100 ml Trinkwasser frei von *E. coli* sein muss (siehe Tabelle 6).

Die Verwendung von coliformen Bakterien als Indikatororganismen in der mikrobiologischen Trinkwasseranalyse basiert ebenfalls auf dem oben beschriebenen Prinzip. Bei der Interpretation des indikativen Wertes einiger Coliformer ist jedoch differenzierter vorzugehen. Die Anwesenheit von coliformen Bakterien muss nicht zwingend auf eine fäkale Belastung der Wasserprobe zurückzuführen sein, da wie in Kapitel 3.1 erwähnt die Coliformen in der Umwelt weit verbreitet sind. Lediglich *E. coli* ist immer auf einen rein fäkalen Ursprung zurückzuführen (siehe Tabelle 1). Der abgestufte indikative Wert der coliformen Bakterien besteht daher primär darin, auf eine länger zurückliegende fäkale Verunreinigung oder auf eine Einschwemmung aus belasteten Oberflächengewässern hinzuweisen. Damit zeigen sie Fehler in der Wasseraufbereitung und Verteilung an. Die Identifizierung isolierter Stämme kann allerdings manchmal einen Hinweis auf deren Ursprung liefern und somit die Ursache der Kontamination der Probe klären.

Der bedingte indikative Wert der coliformen Bakterien spiegelt sich in der Gegebenheit wider, dass die Coliformen in einigen Normen bzgl. der Trinkwasserqualität nur als mikrobiologischer Indikatorparameter oder überhaupt kein Beurteilungskriterium darstellen. Die Weltgesundheitsorganisation WHO (2004) sieht die coliforme Bakterien „zum Indizieren fäkaler Erreger als nicht geeignet“ jedoch als „Indikator für die Wirksamkeit von Aufbereitungsmaßnahmen und für das eventuelle Auftreten von Biofilmen“.

In Österreich werden die coliformen Bakterien in den am 6. Juli 2006 in Kraft getretenen Änderung der Trinkwasserverordnung (BGBl. II Nr. 254/2006) nicht mehr wie vormals als mikrobiologische Parameter sondern nun mehr als mikrobiologische Indikatorparameter beurteilt (siehe Kapitel 3.2). Dadurch wurde der unexakten Aussagekraft der coliformen Bakterien Rechnung getragen.

3.3.3 Anforderungen an Indikatororganismen

Die Intention SCHARDINGERS (1892; zit. bei WAITE, 1997) (siehe Kapitel 3.3.1), Wasser auf Grundlage von Indikatororganismen zu untersuchen, die einen Anhaltspunkt für die mögliche Anwesenheit von Darmpathogenen geben sollen, enthält implizit die wesentlichsten Anforderungen an geeignete Organismen. Aus Schardingers Prinzip leiten sich folgenden Eigenschaften für Indikatororganismen ab:

- Sie sollen idealerweise ausschließlich in menschlichen Fäkalien vorkommen.
- Es soll sich um außerhalb des Verdauungstraktes - in der Natur bzw. Wasser - beständige Organismen handeln.

DUTKA (1973) gibt ideale Kriterien für die Eignung von Organismen als perfekten Indikator folgendermaßen an:

- Sie sollten in der Probe in einer größeren Anzahl als die mutmaßlichen Pathogenen vorhanden sein.
- Sie sollten im Wasser nicht mehr wachsen oder schneller absterben als die Pathogenen.
- Sie sollten gegenüber Desinfektionsmitteln widerstandsfähiger als die Pathogenen sein.
- Sie sollten einfach identifizierbar und taxonomisch eindeutig sein.

Weiters finden sich in der Literatur noch folgende Anforderungen an Indikatororganismen:

- Sie sollten selbst keine Krankheiten verursachen.
- Sie sollten unter natürlichen Lebensbedingungen widerstandsfähiger als die Krankheitserreger sein und in größerer Zahl überleben.
- Die Anzahl der Indikatororganismen sollte in Relation zur Menge der pathogenen Mikroorganismen stehen.
- Sie sollten nur dann anwesend sein, wenn es wahrscheinlich ist, dass Krankheitserreger fäkalen Ursprungs anwesend sind.
- Sie sollten außerhalb des Intestinaltrakt nicht wachsen bzw. sich vermehren.

Es ist offensichtlich, dass kein Organismus alle diese heute an einen Indikatororganismus gestellten idealen – teilweise widersprüchlichen - Anforderungskriterien, erfüllt. Dies gilt auch für die coliformen Bakterien als Indikatororganismen in der Trinkwasseruntersuchung und ist unter anderem ein Grund für die öfters und regelmäßig geführte Diskussion über das coliforme Konzept.

3.3.4 Aspekte bei der Anwendung von *E. coli* und coliformen Bakterien als Indikatororganismen

Die Nützlichkeit von coliformen Bakterien – mit Ausnahme von *E. coli* – als Indikator für eine fäkale Belastung des Trinkwassers wird schon seit mehreren Jahren hinterfragt, da Forschungsergebnisse Schwierigkeiten bei der Interpretation von Ereignissen mit positiven Befunden von coliformen Bakterien aufzeigen. Im Folgenden wird darauf eingegangen.

3.3.4.1 Definition der coliformen Bakterien und normative Regelungen

Die für offizielle Trinkwasseruntersuchungen anzuwendenden mikrobiologischen Nachweismethoden sind als Referenzverfahren in den jeweiligen internationalen und nationalen Standards festgelegt (siehe Kapitel 3.2). Die Untersuchungsmethode charakterisiert biochemische Eigenschaften und legt implizit die Definition der coliformen Bakterien fest (siehe Kapitel 3.1). Damit bleiben die coliformen Bakterien eine künstliche Gruppe mehr aus Konvention als aus dem Gesichtspunkt, einen präzisen Indikator für eine bewiesene hygienische Signifikanz zu beschreiben. Weiters sind durch diese Standardisierung die Untersuchungsergebnisse zwar vergleichbar und justizabel, doch erschweren bzw. verzögern derartige Regelungen die Einbeziehung von Forschungsergebnissen und die Anwendung von auf diesen Forschungserkenntnissen aufbauenden verbesserten Nachweismethoden.

Zur Verdeutlichung bietet sich die in Kapitel 3.3.1 erwähnte frühzeitige Erkenntnis an, dass es sich bei den damals noch *Bact. coli* genannten Coliformen nicht um eine einzelne Art sondern eine Gruppe von ähnlichen Organismen handelt, von denen nicht alle unbedingt mit einer fäkalen Kontamination in Verbindung stehen. Dies widerspricht den Grundsätzen des Indikatorprinzips (siehe Kapitel 3.3.3). Trotzdem wurde die bisherige Vorgangsweise beibehalten und *E. coli* als ergänzender Parameter bei Trinkwasseruntersuchungen mituntersucht. Erst in jüngster Zeit wird in manchen Normen *E. coli* eine höhere indikative Aussagekraft bzgl. einer fäkalen Kontamination des Wassers als den coliformen Bakterien beigemessen.

Weiters lässt sich in diesem Zusammenhang auch das in Kapitel 3.1 behandelte Kriterium der Gasbildung bei der Fermentation von Laktose als Definition für *E. coli* und coliformen Bakterien anführen. Obwohl „niemand jemals einen Zusammenhang zwischen Gasbildung und fäkalem Ursprung nachgewiesen hat“ (WAITE, 1991), ist - auch nach Einführung der Membranfiltration in den 50-iger Jahren (Nachweis der Gasbildung erfordert einen zusätzlichen Arbeitsschritt) - dieses Definitionskriterium bis Mitte der 90-iger Jahre ein verbindlicher Bestandteil in den einschlägigen Normen geblieben. Bei dem Verfahren der Multiple-tube fermentation (siehe Kapitel 3.4.1.1) nach ISO 9308-2 (1990) ist der Nachweis der Gasbildung bis heute ein ausschlaggebendes Kriterium bei der Beurteilung der Belastung einer Probe.

In jüngster Zeit wurden die Enzyme β -Galaktosidase für coliforme Bakterien und zusätzlich β -Glukuronidase zur Differenzierung für *E. coli* identifiziert (siehe Kapitel 3.1). Es gibt Bestrebungen die Definition von *E. coli* und coliformen Bakterien hinsichtlich dieser Enzyme zu ändern. Die enzymbasierte Definition der coliformen Bakterien (das Enzym β -Galaktosidase als Merkmal für Laktoseabbau) scheint zwar die Gruppe der Coliformen genauer zu beschreiben, doch bezüglich des indikativen Wertes der coliformen Bakterien in der Praxis der Trinkwasseruntersuchung stellt diese Definition keine Verbesserung dar, da die im Vergleich zusätzlich identifizierten Gattungen primär nur in der Umwelt verbreitet sind (siehe Tabelle 1).

Es gibt auf dem Markt bereits zahlreiche Produkte, die für den Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien die Enzyme β -Galaktosidase und β -Glukuronidase nutzen (siehe Kapitel 3.4.2). Manche dieser kommerziellen Produkte werden bereits heute von Wasserversorgern in Europa, Amerika und Australien wegen ihrer Vorteile (siehe Kapitel 3.4) gerne zur Überprüfung ihrer Wasserqualität genutzt. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise Colilert®-18 (siehe Kapitel 3.4.2.1.1), ein kommerzielles Produkt, das auf dem enzymatischen Analyseprinzip beruht, zu nennen, welches in einigen europäischen Ländern als ein dem Referenzverfahren gleichwertige Untersuchungstechnik für die Bestimmung von *E. coli* und der coliformen Bakterien zugelassen ist. In vielen anderen Ländern hat dieses Nachweisverfahren jedoch (noch) nicht Eingang in die einschlägigen Normen gefunden.

Für andere ebenfalls sehr vielversprechende Bestimmungsmethoden für *E. coli* und coliforme Bakterien (siehe Kapitel 3.4.2, 3.4.3 und 3.4.4) wartet noch die aufwendige

Prozedur der Anerkennung (ISO/DIS 16140 (1999), vgl. Kapitel 4.5; Die Anerkennung der Überarbeitung der derzeit gültigen Fassung von 2003 steht kurz bevor.). Die Zukunft verspricht eine Vielzahl von Methoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien, die die routinemäßige mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser vereinfachen und beschleunigen werden. Am Horizont warten die molekularen Methoden (siehe Kapitel 3.4.3) auf den praktischen Einsatz und versprechen aufgrund der Natur ihres Analyseprinzips die Interpretationsgenauigkeit von mikrobiologischen Trinkwasseranalysen wieder zu steigern.

3.3.4.2 Zeitgemäßes Krankheitsbild

Das coliforme Konzept als Antwort auf die vor mehr als einem Jahrhundert aufgetretenen epidemischen Seuchen, wie z.B. Cholera, hat sich diesbezüglich als wirkungsvolle Beurteilungsmethode des mikrobiologischen Gefährdungspotentials des Trinkwassers bis heute erwiesen. GELDREICH (1997) hat für den Zeitraum 1940 bis 1994 die Ausbrüche von wasserbedingten Krankheiten für die USA zusammengefasst. In seiner aus verschiedenen Quellen gewonnene Zusammenstellung für den genannten Zeitraum von 54 Jahren findet sich lediglich ein Ausbruch der Cholera, der zu 17 Erkrankungsfällen ohne Todesfall führte. Noch während des späten 19. und frühen 20. Jahrhunderts war Cholera die häufige Ursache für wasserbedingte Krankheitsausbrüche (M.F. CRAUN et al., 2006).

Heute hingegen bereitet den Wasserversorgern das Ansteigen der Zahl der wasserbedingten Krankheiten, die durch parasitäre und virale Krankheitserreger hervorgerufen werden, Probleme. Beispielsweise verursachte der einzellige Parasit *Cryptosporidium*, der Fieber, Schwindel, Bauchkrämpfe, Gewichtsverlust und bei Personen mit geschwächtem Immunsystem chronischen Durchfall auslöst, 1993 in Milwaukee Wisconsin über 370 000 Erkrankungsfälle (GELDREICH, 1997). Bei einer Bevölkerung von 800 000 Einwohnern handelt es sich hierbei um einen der größten Ausbrüche verursacht durch verunreinigtes Trinkwasser. Für die häufigsten wasserbedingten Krankheitsausbrüche sind nach GELDREICHs (1997) Aufstellung die Dünndarm-Parasiten der Gattung *Giardia* verantwortlich, die Übelkeit, Bauchschmerzen und Durchfall verursachen können. Er berichtet von 84 Ausbrüchen vornämlich in Versorgungsgebieten mit abgelegenen Einzugsgebieten und Desinfektion als Basisbehandlung des Trinkwassers.

In Finnland – als Beispiel für Viren als Erreger wasserbedingter Krankheiten - wurden in den Jahren von 1998 bis 2003 im Rahmen eines intensivierten Monitoring Programms zu lebensmittelbedingten Epidemien 41 wasserbedingte Epidemien registriert, wovon 28 auf virale Krankheitserreger untersucht wurden (MAUNULA et al., 2005). Die am häufigsten gefundenen Viren, die wasserbedingte Ausbrüche von Krankheiten verursachten, waren Noroviren. Sie verursachen Gastroenteritis mit Durchfall und Erbrechen und waren für 18 der 28 auf Viren untersuchten Epidemien verantwortlich. Rotavirus verursachte eine Epidemie und bei 9 Epidemien wurden keine Viren gefunden.

Die genannten Studien lassen den Schluss zu, dass durch die mikrobiologische Trinkwasserkontrolle mittels der Indikatororganismen *E. coli* und coliformer Bakterien nicht die durch kontaminiertes Trinkwasser verursachten heutigen Krankheitsbilder vollständig abgedeckt werden (siehe Kapitel 3.3.4.3). Aufgrund der Erfolge in der Eindämmung von den zur vorigen Jahrhundertwende noch regelmäßig auftretenden epidemischen Seuchenausbrüchen haben sich *E. coli* und die coliformen Bakterien als Indikatororganismen zur Beurteilung einer potentiellen Gesundheitsgefährdung durch Trinkwasser jedoch grundsätzlich als sehr erfolgreich erwiesen.

3.3.4.3 Aussagekraft hinsichtlich viraler und parasitärer Krankheitserreger

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, sind virale und speziell parasitäre Krankheitserreger nicht unbedingt mit den coliformen Bakterien verbunden und können in coliformenfreien Trinkwasser enthalten sein. Dies sollen die nachfolgend angeführten Studien belegen.

MOORE et al. (1993) haben für die Jahre 1991 und 1992 die wasserbedingten Krankheitsausbrüche in den USA ausgewertet. Bezüglich der verursachenden Pathogene und der Korrelation mit dem Auftreten von Coliformen ergab sich folgendes Bild. Bei 30 wasserbedingten Krankheitsausbrüchen, die hinsichtlich der Anwesenheit von Coliformen geprüft wurden, waren bei 24 Ausbrüchen coliforme Bakterien nachweisbar. Bei weiterer Analyse der Daten stellen die genannten Autoren fest, dass Coliforme zwar bei 88 % der durch Bakterien, Viren oder unbekannten Krankheitserreger bedingten Ausbrüche allerdings nur bei 33 % der durch Protozoen (parasitär) verursachten Ausbrüchen nachgewiesen wurden. Die mangelnde Korrelation zwischen coliformen Bakterien und Protozoen in Trinkwasser wird mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegen Wasseraufbereitungsmaßnahmen in Verbindung gebracht.

Eine weitere Untersuchung in den USA vergleicht Wasserversorgungssystemen, die Krankheitsausbrüche zu verzeichnen hatten mit jenen bei denen keine aufgetreten waren (G.F. CRAUN et al., 1997). Hinsichtlich des Coliformenkriteriums wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Im Allgemeinen waren die gültigen Bestimmungen eingehalten.

Obwohl die zweitgenannte Studie keine Aussage hinsichtlich des verursachenden Krankheitserregers gibt, so zeigt sie doch auf, dass die Abwesenheit von coliformen Bakterien keine 100 % -ige mikrobielle Sicherheit des Trinkwassers bedeutet. Andererseits muss das Vorhandensein von Coliformen nicht unbedingt mit Krankheitserreger in Trinkwasser assoziiert sein. Aus erstgenannter Untersuchung lässt sich ableiten, dass das Indikatorkonzept mittels der coliformen Bakterien keinen umfassenden Schutz gegen das gesamte Spektrum der durch mikrobiologisch verunreinigtes Trinkwasser übertragbaren Krankheitserreger bietet. Im Detail sind coliforme Bakterien ein adäquater Indikator für eine potentielle Kontamination des Wassers mit Bakterien und Viren aber kein adäquater Indikator für protozoene Kontamination.

Es wurde schon mehrfach darauf hingewiesen, dass coliforme Bakterien nicht so sehr ein hygienisches Problem sondern eines der Effektivität der Wasseraufbereitung andeuten. So besteht gemeinhin Übereinstimmung, dass eine ordnungsgemäß operierende Wasseraufbereitung alle coliformen Bakterien inaktiviert. Allerdings bietet die Verwendung von Coliformen zur Charakterisierung der Effektivität der Wasseraufbereitung keinen ausreichenden Leistungsstandard, da diese Organismen im Behandlungsprozess (Koagulation, Sedimentation, Filtration) einfach zu binden und durch Desinfektion zu inaktivieren sind. Als Konsequenz ist die Verwendung von Coliformen, um die Einstellung des Behandlungsprozess für eine bessere Entfernung von protozoenen Pathogenen, Viren und opportunistische Pathogenen zu beurteilen, eine zu grobe Maßnahme (GELDREICH, 1997, a).

3.3.4.4 Natürliche Verbreitung der coliformen Bakterien

Wie schon mehrfach erwähnt umfassen die coliformen Bakterien auch Gattungen, die in der Umwelt beheimatet sind. Dies wurde in der geschichtlichen Entwicklung der Trinkwasseruntersuchung mittels coliformer Bakterien schon frühzeitig festgestellt (siehe Kapitel 3.3.1), doch war damals noch keine spezifische Methode zur Bestimmung bzw. Auszählung von *E. coli* entwickelt. Unter anderem aus diesem Grund wurde die Gruppe der Coliformen, heute auch als Totalcoliforme bezeichnet, als Ersatz für *E.coli* - *E.coli* als bevorzugter Indikator, da es allgemein in menschlichen und tierischen Fäkalien in hoher Anzahl vorhanden ist – als Indikator angewandt.

ALLEN und EDBERG (1997) geben beispielsweise für die Gattungen *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobakter*, *Citrobakter* und *Serratia* folgende natürliche Verbreitungsweisen an:

- *Klebsiella* – kann in Fäkalien gefunden werden und ist universell in der Umwelt vertreten
- *Escherichia* – wird immer in menschlichen oder anderen tierischen Fäkalien gefunden
- *Enterobakter* - kann in Fäkalien gefunden werden und ist universell in der Umwelt vertreten
- *Citrobakter* – Umweltursprung
- *Serratia* – Umweltursprung

Man erkennt, dass vier dieser Gattungen in der Umwelt (Wasser, Vegetation und Böden) weit verbreitet sind und nicht mit einer fäkalen Kontamination des Trinkwassers verbunden sein müssen. In solchen Fällen indizieren sie nicht unbedingt ein Gesundheitsrisiko für den Menschen.

In diesem Zusammenhang ist auch die Tabelle 1 in Kapitel 3.1 in Erinnerung zu rufen. Die coliformen Bakterien sind nicht eindeutig sondern durch die mit der jeweiligen Untersuchungsmethode bestimmten biochemischen Eigenschaften definiert. Daraus ergibt sich, dass sich die Gruppe der coliformen Bakterien in Abhängigkeit des betrachteten Merkmals aus unterschiedlichen Gattungen mit unterschiedlicher natürlicher Verbreitung zusammensetzt. Bei der jüngsten Definition der coliformen Bakterien mittels des zur Laktosefermentation notwendigen Enzyms β -Galactosidase wird die Gruppe der coliformen Bakterien zwar am umfassendsten beschrieben, doch bedingt das auch, dass diese funktionale Definition auch die meisten Gattungen nicht fäkalen Ursprungs beinhaltet. Dies ist im Sinne der Forderung, dass ein Indikatororganismus in den menschlichen Fäkalien vorkommen soll, bei der Beurteilung einer fäkalen Belastung des Trinkwassers nicht dienlich.

Um zwischen Coliformen fäkalen und nicht fäkalen Ursprungs besser differenzieren zu können, wurde eine Methode mit erhöhter Inkubationstemperatur entwickelt. Coliforme Bakterien, die in der Lage sind Laktose bei 44,5 °C vergären zu können, werden als thermotolerante Coliforme bzw. auch als Fäkalcoliforme bezeichnet. Bei diesem Test mit erhöhter Temperatur werden *Citrobakter* und *Enterobakter* oftmals ausgeschlossen, jedoch ist ein signifikanter Prozentsatz der Gattung *Klebsiella* thermotolerant (CAPLENAS und KANAREK, 1984; zit. bei ALLEN und EDBERG, 1997; EDBERG et al., 1994; zit. bei ALLEN und EDBERG, 1997). Der indikative Wert der Fäkal- bzw. thermotoleranten Coliformen ist zwar höher als jener der Totalcoliformen, doch bleibt auch bei dieser Vorgangsweise das grundsätzliche Problem der genauen Differenzierung von Gattungen mit fäkalen oder nichtfäkalen Ursprung bestehen.

Wie auch schon an anderen Stellen erwähnt, weisen die coliformen Bakterien auf Fehler in der Wasseraufbereitung und Desinfektion bzw. auf Probleme bei der Wasserverteilung hin. *E. coli* erweist sich - hier aufgrund seines ausschließlich fäkalen Ursprungs - als das unter den coliformen Bakterien am besten geeignete Indikatorbakterium. Erst in jüngster Zeit werden einige der einschlägigen Regelwerke dahingehend angepasst (siehe Kapitel 3.1, 3.2 und 3.3).

3.3.4.5 Wachstum in Trinkwasserversorgungsanlagen (Nachverkeimung)

Der Zweck von Trinkwasserversorgungsanlagen ist die Bereitstellung von sicherem Trinkwasser für die Konsumenten in Hinsicht einer ausreichenden Menge, Versorgungsdruck und Qualität. Das Management der Wasserqualität in Trinkwasserversorgungsanlagen ist dabei die herausragende Herausforderung für die Wasserversorgungsunternehmen.

So wurden, seitdem coliforme Bakterien zur hygienischen Untersuchung von Trinkwasser verwendet werden, sie auch regelmäßig in Wasserversorgungsanlagen nachgewiesen. Diese Anwesenheit von Coliformen in Versorgungsnetzen ist dabei nicht immer durch offensichtliche Fehler wie ungenügende Wasseraufbereitung bzw. mangelnde oder fehlende Desinfektion, offene Speicher, Wartungsarbeiten, Bauarbeiten zur Erweiterung des Versorgungsnetzes oder durch Ausnahmesituationen wie Rohrbrüchen erklärbar. Ihr Auftreten weist in solchen Fällen darauf hin, dass einige wenige coliforme Bakterien in die Wasserleitungen eingedrungen sind (siehe Untersuchung von CRADDOCK et al. (1997) in diesem Kapitel) und sich ihre Anzahl bei dem Durchgang des Trinkwassers durch das Leitungsnetz unter bestimmten Bedingungen vermehren kann.

Allgemein wird diese Phänomen als Nach- oder Wiederverkeimung bezeichnet, wenn es im Verlauf der Verteilung von Trinkwasser zu einer deutlich wahrnehmbaren Zunahme der Koloniezahl (durch Kultivierung erfassbare Mikroorganismen in KBE (CFU) bzw. HPC /ml) kommt, obwohl der Wert an der Einspeisungsstelle ins Leitungsnetz den gesetzlichen Anforderungen an Trinkwasser entsprochen hat. Nachverkeimung kann selbst bei einwandfreier Trinkwasserbehandlung und Desinfektion zu einer Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers, zur Entwicklung von Geruch oder Trübung sowie zu beschleunigter Korrosion der Versorgungsleitungen führen. Nachverkeimung wird stark mit Biofilmen (an festen Substraten anhaftende Mikroorganismen in einem aquatischen Umfeld) in Zusammenhang gebracht, da auf jedes im Wasser frei schwebende Bakterium bis zu 1000 in den Biofilmen festsitzende Mikroorganismen kommen.

Grundsätzlich werden in Wasserversorgungsnetzen Mikroorganismen sowohl in der Wasserphase als auch an der Oberfläche von Rohrwänden in Form eines Biofilms gefunden. Ihre mikrobielle Zusammensetzung reflektiert die Mikroflora des Rohwassers und kann grob nach Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen klassifiziert werden.

Biofilme sind dünne Layer (abgesehen von Ablagerungen), welche zur Unterstützung und zum Schutz der Mikroorganismen als Netzwerk - bestehend aus Exopolymeren von Proteinen und Polysacchariden - fest verankert sind und ein Ökosystem formen, das beständig und schwer zu entfernen ist (BLOCK, 1992). Die Biofilme können als kontinuierliche gleichmäßig verteilte Schicht ausgebildet sein, doch häufiger bilden die meist autochthonen Mikroorganismen unregelmäßige Konzentrationen aus Biomasse (Mikroorganismen, extrazelluläre polymere Matrix). Zusätzlich enthalten sie organische und anorganische Ablagerungen aus externen Quellen. In Wasserverteilungssystemen erreichen die Biofilme eine maximale Dicke von einigen Hundert Mikrometern. Durch die Gruppierung haben die Bakterien des Biofilms einen Überlebensvorteil. Einerseits verbessert sich für die Bakterien der Zugang zu den Mineralien und den organischen Nährstoffen aus den sekundären Stoffwechselprozessen der Biofilmgemeinschaft, andererseits können sie vor chemischen Desinfektionsmitteln besser geschützt sein.

Bakterien, die entweder im Versorgungsnetz bereits vorhanden waren oder die den Trinkwasseraufbereitungsmaßnahmen widerstanden haben, bilden unter bestimmten Bedingungen die Grundlage einer Nachverkeimung. Die Bedingungen, die Nachverkeimung fördern, umfassen nach MOMBA et al. (2000) folgende Faktoren und werden anschließend kurz erläutert:

- a) die angewandte Desinfektion
- b) die Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegen Desinfektion
- c) die Art und Konzentration der biologisch abbaubaren Inhaltsstoffe des behandelten Trinkwassers
- d) die Art des Rohrmaterial
- e) die Wassertemperatur

ad a) Die in der Desinfektion von Trinkwasser gängigen Desinfektionsmitteln sind, sofern sie in geeigneter Konzentration angewandt werden, effektiv zur Entfernung von Mikroorganismen. Hinsichtlich der Nachverkeimung ist es bedeutend eine geeignete Restkonzentration an Desinfektionsmittel im gesamten Versorgungsnetz aufrecht zu erhalten, um für die im Trinkwasser enthaltenen Bakterien ungünstige Überlebensbedingungen zu schaffen.

Mitunter können Desinfektionsmittel bei ungeeigneter Anwendung durch Oxidation mit Wasserinhaltsstoffen zur Bildung von einfach biologisch abbaubaren organischen Verbindungen beitragen, die von Mikroorganismen als Nahrungs- bzw. Energiequelle genutzt werden können und in weiterer Folge zur Bildung von Biofilmen in Versorgungssystemen beitragen können (siehe ad c)).

Die verschiedenen Desinfektionsmittel sind aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften zur Nachverkeimungskontrolle unterschiedlich geeignet. Die weniger reaktiven, mehr persistenten Verbindungen, wie Chloramin, halten eine höhere Restdesinfektion im Versorgungssystem aufrecht und dürften die Biofilme besser durchdringen, und so die Organismen des Biofilms besser kontrollieren als freies Chlor (van der WENDE und CHARACKLIS, 1990). MOMBA et al. (1998) hat die gängigen Desinfektionsmittel in einem Laborversuch mit teilweise behandeltem Oberflächenwasser in Bezug auf ihre Nachverkeimungseigenschaft untersucht. Dabei konnte die Restkonzentration von Wasserstoffperoxyd und Chloramin in der Versuchsanordnung für eine wesentlich längere Zeit nachgewiesen werden als die von den anderen untersuchten Desinfektionsmittel (Chlor, Ozon und (UV)). Obwohl keine untersuchte Desinfektionsmethode Adhäsion von Bakterien und die Bildung von Biofilmen an den Rohwandmaterialien verhinderte, konnte doch gezeigt werden, dass sesshafte Bakterien bei signifikanten Restkonzentrationen von Desinfektionsmittel nicht zur Nachverkeimung fähig waren und die Restkonzentrationen von Wasserstoffperoxyd und Monochloramin das Wachstum der sesshaften Bakterien limitiert haben.

Einschub: Der Einsatz von Chloramin zur Desinfektion ist in Österreich aufgrund seiner gesundheitlich nicht unbedenklichen Eigenschaften nicht erlaubt.

Die Desinfektion mit UV - Strahlung ist für Wasser mit hoher Trübung nicht vorteilhaft. Bakterien, die an Sedimenten anhaften, können von der Strahlung abgeschirmt sein, auf diese Weise die Desinfektionsmaßnahme umgehen, und sich im Leitungssystem mit den angegebenen möglichen nachteiligen Effekten festsetzen.

ad b) Im Allgemeinen sind die Mikroorganismen in der Gemeinschaft eines Biofilms weniger empfindlich gegenüber dem Einfluss von Desinfektionsmitteln als die in der Wasserphase frei schwebenden Bakterien. Zudem können Bakterien Resistenzen gegen Desinfektionsmittel entwickeln. Dies geschieht unter Bedingungen, die die Zellphysiologie beeinflussen.

Ein Vergleich der relativen Chlorsensitivität von Bakterien, die aus einem gechlorten und einem ungechlorten Trinkwasser zweier Verteilungssysteme in Californien isoliert wurden, ergab eine höher Resistenz gegen Chlor für jene Bakterien, die aus dem gechlorten Verteilungssystem stammten (RIDGWAY und OLSON, 1982). Dies weist auf eine starke Selektion für chlortolerante Mikroorganismen im gechlorten Trinkwasser hin. Die

Bakterien beider Verteilungssysteme wiesen individuelle Unterschiede in ihrer Sensitivität gegen die Desinfektion auf.

Die Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegen Desinfektionsmittel wird auch von Faktoren wie Zellaggregation, Oberflächenadhäsion (bakterienbeladene Partikeln) und durch schützende Hüllen beeinflusst, die sich bei halogenen Desinfektionsmethoden stärker auswirken.

Generell gilt, dass die Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegen Desinfektionsmaßnahmen steigt, wenn das Wasser stark verunreinigt ist.

ad c) Nachverkeimung in Trinkwasserversorgungsnetzen wird wesentlich durch die bakterielle Verwertung von biologisch abbaubare Verbindungen verursacht. Ausschlaggebend hierbei ist der Gehalt an biologisch abbaubaren organischen Kohlenstoff (BDOC – biological degradable organic carbon) bzw. assimilierbaren organischen Kohlenstoff (AOC – assimilable organic carbon). BDOC kann als jener Teil des gelösten organischen Kohlenstoffs definiert werden, welcher von Bakterien innerhalb eines Zeitraumes von einigen Tagen bis einigen Monaten metabolisiert werden kann. AOC wird als jener Teil des BDOC bestimmt, der zur Bildung neuer Zellsubstanz genutzt wird. Bei geringen BDOC-Gehalten wird das Substrat im Energiestoffwechsel der Zelle umgesetzt und es kommt zu keinem Wachstum der Biomasse. Bei Betrachtung des Biofilms wird dieser in diesem Fall als stabil bezeichnet. Bei höheren BDOC- bzw. AOC-Gehalten werden die Nährstoffe für Wachstum und Replikation genutzt.

Der Grad der Neigung zur Nachverkeimung wird daher wesentlich durch den Gehalt des Trinkwassers an biologisch abbaubaren Kohlenstoff bestimmt und spezifischer durch den assimilierbaren organischen Kohlenstoff, da dieser definitionsgemäß jenen Kohlenstoffanteil angibt, der in Biomasse umgewandelt wird. Aufgrund der geringen Nährstoffkonzentration und der mitunter hohen Durchflussrate in weiten Teilen von Wasserversorgungsnetzen (in Abhängigkeit des Wasserverbrauchs und der Entfernung vom Einspeisepunkt), tritt Bakterienwachstum vermehrt in den Biofilmen auf. Eine bakterielle Kontamination des Wassers während des Durchgangs durch das Leitungsnetz ist daher hauptsächlich durch Ablösungen von Teilen des Biofilms von der Oberfläche der Leitungsrohre bedingt (BLOCK et al., 1997) – unter jenen Bedingungen, bei denen Wachstum und Replikation in den Biofilmen möglich war (instabiler Biofilm, Desinfektionsmittel, Desinfektionsmittelkonzentration,...). Für „biologisch stabile“ Verhältnisse finden sich in der Literatur BDOC- und AOC-Angaben in der Größenordnung von max. 10 µg ac-C eq/l AOC (ZIBUSCHKA, 2003) und 0,15 mg C/l BDOC (Allgeier et al., 1996; zit. bei ZIBUSCHKA, 2003), 0,16 mg C/l BDOC (SERVAIS et al., 1987; zit. bei ZIBUSCHKA, 2003) oder 0,20 mg C/l BDOC (JORET et al., 1988; zit. bei ZIBUSCHKA, 2003). Für coliforme Bakterien berichtet JORET et al. (1991; zit. bei MOMBA et al., 2000), dass *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* und *Enterobacter cloacae* in Flusswasserproben mit [...] einen anfänglichen BDOC-Gehalt von 1,4 mg/l nachverkeimen können, aber in behandelten Wasserproben mit anfänglichen BDOC-Gehalten von 0,1 mg/l nicht zur Replikation fähig waren.

ad d) In der Wasserversorgung werden Leitungen aus unterschiedlichsten Materialien (Beton, Metall und Kunststoff) verwendet, die die Qualität des Trinkwassers in vielfältiger Weise beeinflussen. In Bezug auf die Nachverkeimungsproblematik kommt den Rohrrinnenwänden als die Oberfläche für anhaftende Mikroorganismen eine tragende Bedeutung zu. Eigenschaften wie hydrophile bzw. hydrophobe Natur der Oberfläche, Rohrrauigkeit, Korrosion, und die Fähigkeit zur Versorgung der Bakterien mit den für ein Wachstum benötigten Nährstoffen bestimmen die Bildung und Zusammensetzung von Biofilmen.

ROGERS et al. (1994) hat verschiedene Rohrmaterialien in einem zweistufigen Chemostat, das mit steril gefilterten Trinkwasser als einzige Nahrungsquelle beschickt wurde, auf ihren Einfluss auf Biofilmbildung untersucht. Die Materialien variierten in der Fähigkeit die Bildung von Biofilmen zu unterstützen. Nach der Einbringung von

natürlichem Schlamm wurden alle Materialien rasch besiedelt, wobei Nierosterstahl die niedrigste und Ethylen - Propylen und Latex die höchsten Konzentrationen an Flora aufwiesen. Bei Betrachtung der Mittelwerte über 28 Tage in KBE/cm² ergibt sich für die untersuchten Materialien folgende Reihung: Nierosterstahl < Polypropylen < PVC < Flusstahl < Polyethylen < Ethylen - Propylen < Latex. Jedes der Materialien wurde von anderen Pionierarten kolonisiert und die sich in Folge der Sukzession bildenden Biofilme variierten in Dichte, Abundanz und Morphologie. Da die Materialien unter den selben Umweltbedingungen besiedelt wurden, ergibt sich ein Einfluss des unterstützenden Materials auf die Biofilmbindung. Aus hygienischer Sicht weiters bedeutend wurde der Nachweis von *Legionella pneumophila*, Amöben und anderer Protozoen, die in den Biofilmen eingebettet waren, erbracht.

Auch in einer anderen Studie (MOMBA und MAKALA, 2004), die zementbasierte Rohrmaterialien mit Kunststoffrohren vergleicht, weisen wiederum die Kunststoffrohre das schlechtere Verhalten in Bezug auf die Formation von Biofilmen auf. Rohre aus Zement, Asbestzement, PVC, UPVC und MDPE wurden mit Oberflächenwasser in einer Versuchsanordnung auf ihre Neigung zur Nachverkeimung getestet, wobei innerhalb der Kategorien (Zement und Kunststoff) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Desinfektion mit Chlor und mit Chlor kombiniert mit Chloramin untersucht. Alle Rohrtestmaterialien, die gechlortem Wasser ausgesetzt wurden, wurden innerhalb von 20 Minuten besiedelt (heterotrophic plate count bacteria (HPC) und coliforme Bakterien). Eine Zugabe von Monochloramin in das gechlorte Wasser führte zu einer Reduktion der Bakteriendichte von weniger als 1 KBE/cm² innerhalb der nächsten zwei bis drei Tagen. Danach war sowohl für HPC als auch für die coliformen Bakterien Nachverkeimung festzustellen, wobei die Bakteriendichte des Biofilms bei den Kunststoffmaterialien ein höheres Niveau erreichte als bei den zementbasierten Materialien. Die Studie unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Desinfektion in Wasserversorgungssystemen bei der Kontrolle der Bakterien in Biofilmen. Dem Typ des Rohrmaterials kommt eine gestaltende Rolle bei der Lösung der Bildung von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen zu (MOMBA und MAKALA, 2004).

Die diversen Kunststoffrohre finden heute in Trinkwasserversorgungssysteme aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften vielfache Anwendung. Sie zeichnen sich durch Widerstandsfähigkeit gegen Chemikalien und Korrosion, Kosteneffizienz, Flexibilität sowie der Einfachheit in Handhabung, Lagerung und Installation aus. In ihrem Nachverkeimungsverhalten und damit in hygienischer Sicht scheinen sie allerdings keine Verbesserung zu den traditionellen Rohrmaterialien zu bieten.

ad e) Bakterien sind fähig in einem weiten Temperaturspektrum zu überleben und zu wachsen. Die meisten Forscher haben eine signifikant höhere mikrobielle Aktivität in Wasser mit 15°C oder höher beobachtet (DONLAN et al., 1988 und 1994, FRANSOLET et al., 1985, SMITH et al., 1989; zit. bei LeCHEVALLIER et al., 1996). LeCHEVALLIER et al. (1991) stellte in einer einjährigen Untersuchung an einer Trinkwasserversorgungsanlage in New Jersey fest, dass die meisten Ereignisse mit positiven Coliformenbefunden mit Temperaturen von über 15°C verbunden waren. Der Nachweis der coliformen Bakterien war vermutlich durch Nachverkeimung bedingt.

E. coli und andere Darmbakterien gelten als mesophil mit Wachstum in einem Bereich von 5 – 45 °C. Umgekehrt ist Temperatur biologisch ein limitierender Faktor. Im Allgemeinen begünstigen hohe Temperaturen biologische Prozesse. LeCHEVALLIER (1980, zitiert bei MOMBA, 2002) bemerkte, dass mehrere Trends und die Artendiversität [...] in Trinkwasser offensichtlich saisonal verteilt waren. So waren zum Beispiel die Artendiversität in den wärmeren Perioden höher als während der kalten Winterperioden.

Neben den mikrobiellen Prozessen beeinflusst die Temperatur eine Reihe weiterer chemischer und physikalischer Parameter in Trinkwassersystemen, die direkt oder indirekt die Nachverkeimung betreffen: Temperatur beeinflusst die Effektivität der Wasseraufbereitung, die Effizienz der Desinfektion, die mikrobielle Wachstumsrate, die

Dissipation der Desinfektionsmittel, die Korrosionsrate sowie die hydraulische Eigenschaften des Wassers und die Wassergeschwindigkeit bzw. –verweildauer im Versorgungsnetz bedingt durch größere Entnahmen während wärmeren Perioden. Aus praktischer Sicht eines Wasserversorgers gibt es wenige Möglichkeiten die Wassertemperatur zu beeinflussen.

Dieses Nachverkeimungsphänomen wäre im Falle von *E. coli* und der coliformen Bakterien problematisch, da positive Befunde kein direktes Risiko für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen und es somit zu einer falschen Beurteilung des Trinkwassers hinsichtlich seiner fäkalen Belastung führt. Das Ausmaß der coliformen Bakterien in der Probe würde in solchen Fällen nicht das wahre Ausmaß der fäkalen Belastung widerspiegeln.

BLOCK et al. (1997) haben das Verhalten für verschiedene aus der Umwelt isolierte *E. coli* Stämme untersucht. Sie zeichneten sich durch unterschiedliches Verhalten im selben Wasser aus, wobei einige Stämme signifikantes Wachstum zeigten. Für die Untersuchung wurde eine Masche eines experimentellen Leitungsnetzes einmalig mit einer konzentrierten *E. coli* Suspension injiziert und über mehrere Wochen mit behandeltem Trinkwasser beschickt. Innerhalb der ersten drei Stunden setzten sich bis zu 10 % der zugegebenen Bakterien an der Oberfläche fest. Nach einer anfänglichen Phase bei der die *E. coli* Konzentration im Wasser höher als im Biofilm der Rohrwandung war, änderte sich dieses Verhältnis 7 bis 8 Tagen nach der Kontamination. Nach ungefähr 10 Tagen kam es zu einer Inversion der Anzahl der *E. coli* in der Wasserphase und im Biofilm, was ein bevorzugtes Wachstum von *E. coli* in Biofilmen aufzeigt. Nach zirka 12 Tagen überstieg die Konzentration von *E. coli* im Biofilm den Wert der theoretischen Auswaschung aus dem Leitungsnetz. Diese Feststellung kann nur mit *E. coli* Wachstum im Biofilm verbunden sein. Die Autoren der beschriebenen Studie halten abschließend fest, dass nur ein kleiner Teil der massiv injizierten *E. coli* zum Festsetzen an der Oberfläche und zum Wachstum fähig waren. Bei Bedingungen mit niedriger Wassertemperatur und geringer Nährstoffkonzentration, wie sie im allgemeinen in Wasserversorgungsleitungen auftreten, und bei wesentlich geringerer Konzentration der *E. coli* scheint eine Kolonisation der Rohrwandungen sehr unsicher. Es wäre somit unrational, aufgrund dieser Ergebnisse *E. coli* grundsätzlich als Indikator einer fäkalen Belastung in Frage zu stellen. Das potentielle Wachstum und ein mögliches Ablösen von *E. coli* aus den Biofilmen in Wasserleitungsnetzen verhindern jedoch den Zeitpunkt der Kontamination zweifelsfrei festzustellen.

Die chemischen, physikalischen und operationalen Faktoren, die die Nachverkeimung von coliformen Bakterien bestimmen, wurden in einer Studie von Le CHEVALLIER et al. (1996) untersucht. In einem Zeitraum von 20 Monaten wurde an 31 Trinkwasserversorgungssystemen in Nordamerika insgesamt über 115 000 Proben ausgewertet, von denen 1,37 % positiv Ergebnisse für coliforme Bakterien bei einer durchschnittlichen Anzahl von 0,31 KBE/100 ml aufwiesen. Die ausgewählten Versorgungsanlagen wurden nach ihren episodischen Coliformenereignissen ausgewählt und unterscheiden sich in den Wasseraufbereitungssysteme und der Größe des Versorgungsnetzes. Alle verwendeten Oberflächenwasser, das entweder mit Chlor oder Chloramin desinfiziert wird. Die Aussagen für die für die Nachverkeimung von coliformen Bakterien bestimmenden Faktoren der genannten Studie werden nachfolgend auszugsweise beschrieben.

Wasseraufbereitung – Vier der untersuchten Versorgungssystem verwendeten ungefiltertes Oberflächenwasser. Diese Systeme hatten verhältnismäßig mehr positive Coliformenproben. Eines dieser Versorgungssysteme installierte einen Filter während der Untersuchungsphase, was zu einer dreifachen Reduktion der Ereignisse mit positiven Coliformenbefund führte. Obwohl auch einige mit Filter zur Wasseraufbereitung ausgestattete Systeme einen erhöhten Grad an coliformen Bakterien aufwiesen, wurde in den gechlorten ungefilterten Systemen ein höheres Level an Coliformenereignissen

festgestellt. Dies indiziert, dass Filtration ein bedeutender Faktor zur Vermeidung der Nachverkeimung von coliformen Bakterien ist.

CRADDOCK et al. (1997) weisen bei der Wasseraufbereitung mit Filtern auf eine Schwachstelle hin, die es *E. coli* und coliformen Bakterien ermöglicht das Barriereprinzip von Filtern zu durchbrechen. Es wurde in einer Untersuchung an vier unterschiedlichen Wasseraufbereitungsanlagen im Nordwesten von England nach der für die Wartung von Filtern notwendigen Rückspülungen eine große Anzahl an coliformen Bakterien in Proben identifiziert, die unmittelbar nach einer Filterrückspülung genommen wurden. In den auf die Filterrückspülung folgenden Stunden verringerte sich dann die Anzahl an coliformen Bakterien auf einen kleinen Bruchteil der ursprünglich detektierten. Die Untersuchung zeigt, dass unmittelbar nach einer Filterrückspülung Bakterien fähig sind das Aufbereitungssystem zu durchbrechen. Als Ursache hierfür vermuten die Autoren, dass sich der Filter kurz nach der Rückspülung nicht gesetzt hat und die Filterporen noch frei vom akkumulierten Material sind.

Temperatur – Sowohl die Frequenz der Ereignisse als auch die Dichte der coliformen Bakterien war höher wenn die Wassertemperatur über 15 °C hinausging. Es wird seitens der Autoren betont, dass die Generalisation zwischen Wassertemperatur und mikrobielle Aktivität zwischen den verschiedenen Systemen variieren kann. Wasserversorgungseinrichtungen in kalten Klimaten können erhöhte mikrobielle Aktivität auch bei kalten Wassertemperaturen wahrnehmen, da die vorhandene mikrobielle Population sich an Wachstum bei niedrigen Wassertemperaturen angepasst hat.

Restkonzentration der Desinfektionsmittel – Bezüglich der von den teilnehmenden Wasserversorgern verwendeten Desinfektionsmitteln, Chlor und Chloramin, ist die Effektivität für die coliformen Bakterien vergleichbar mit oben genannten Untersuchungen. Die Auswirkung von Chloramin auf die Nachverkeimungskontrolle wird weiters durch zwei Versorgungssysteme aufgezeigt, die ihre Desinfektion während der Untersuchungsdauer von Chlor zu Chloramin wechselten, und sich in weiterer Folge die Ereignisse von Coliformen stark reduzierten bzw. keine coliformen Bakterien mehr nachgewiesen werden konnten. Hinsichtlich der Restkonzentration der Desinfektionsmittel wurde ein U-förmiger Verlauf von Coliformenereignissen festgestellt (siehe Abbildung 2). Bei Desinfektionsmittelrestgehalten von < 0,2 und >1,0 mg an Chlor pro Liter stieg die Anzahl der Coliformenereignisse und die durchschnittliche Bakteriendichte des Trinkwassers an. Die niedrigsten Levels an coliformen Bakterien konnten bei Erhaltung von 0,5 mg Chlor pro Liter und bei 1.0 mg Chloramin pro Liter in allen Teilen des Versorgungssystems erzielt werden.

AOC – Die U-förmige Beziehung (siehe Abbildung 2) zwischen der Restkonzentration des Desinfektionsmittels und der Anzahl der coliformen Bakterien kann dadurch erklärt werden, dass Coliformenereignisse von mehreren Faktoren beeinflusst werden. Bei niedrigen Desinfektionsmittelkonzentrationen steigen die Vorfälle der Detektion von coliformen Bakterien. Alternativ steigen die Coliformenvorfälle bei hohen Nährstoffgehalten (AOC) des Trinkwassers. Diese Relation zwischen Coliformenereignissen und Desinfektionsmittelrestkonzentration und AOC-Gehalten ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Es können somit Positivergebnisse von coliformen Bakterien einerseits als zu geringe Desinfektionsmitteldosierung und andererseits mit einem hohen AOC-Gehalt interpretiert werden. Oben wurde erwähnt, dass oxidative Desinfektionsmethoden den BDOC- bzw. AOC- Gehalt des Trinkwassers erhöhen können. Die Daten der Untersuchung weisen auf einen Trend zu steigenden Ereignissen von coliformen Bakterien in gechlortem Wasser hin, dessen AOC- Gehalte größer als 100 µg/l waren. Während der Untersuchungsdauer gab es nur drei Versorgungssysteme, die keine Ereignisse mit positiven Coliformenbefunden hatten. Ihre durchschnittlichen AOC- Gehalte waren 33 µg/l, 42 µg/l und 93 µg/l. Niedrige Nährstoffgehalte alleine scheinen jedoch kein indikatorfreies Wasser zu sichern, da ein Versorgungssystem mit durchschnittlichen AOC- Gehalten von 74 µg/l eine der höchsten Raten von Coliformenereignissen aufwies.

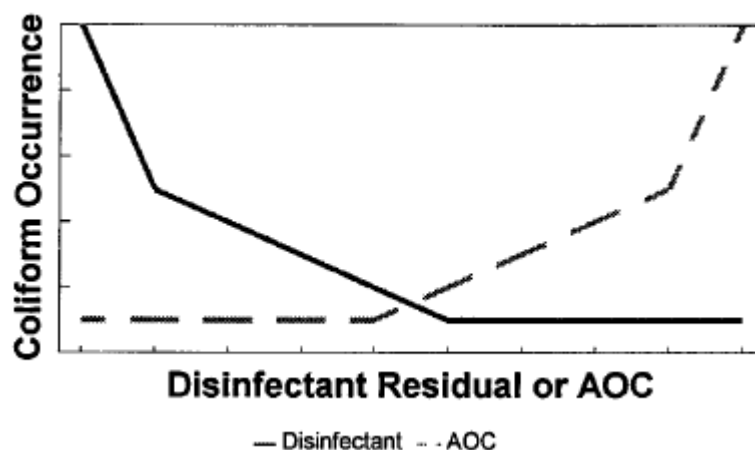


Abbildung 2: Hypothetische Beziehung zwischen Coliformenereignissen und Desinfektionsmittelrestkonzentration und AOC - Gehalten (Le CHEVALLIER et al. 1996)

Konstruktive und operationale Faktoren – Auf die Bedeutung von Filtration wurde oben eingegangen. Langsandsandfilter und biologische Filter können aufgrund ihrer mikrobiologischen Aktivität zu reduzierten AOC-Gehalten im behandelten Wasser führen. Versorgungssysteme mit einer geringen Anzahl von Speichern in Relation zur Länge des Leitungsnetzes tendieren auch zu einer geringeren Anzahl von Ereignissen mit coliformen Bakterien. Versorgungsspeicher sind notwendig, um Wasserausgleich bzw. –reserven, Löschwasser und einen geeigneten Wasserdruck zu bereiten, doch sind sie auch Stellen im Leitungsnetz, an denen Wasser stagniert, Desinfektionsmittel sich verflüchtigt und sich die Wasserqualität verschlechtern kann. Das Speichervolumen hatte keinen Einfluss auf Ereignisse mit coliformen Bakterien. Weiters beschreibt die Studie, dass die Mehrheit der Versorgungssysteme mit einer geringen Anzahl an Coliformenereignissen eine jährliche Spülung des gesamten Leitungsnetzes durchführte. Spülungen entfernen akkumulierte Sedimente aus den Leitungen, die Mikroorganismen Schutz bieten können.

Zusammenfassend stellt die Nachverkeimung in Wasserversorgungssystemen in zweifacher Hinsicht ein Problem für die Wasserversorgung dar. Einerseits führt die Nachverkeimung zu einer Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers und andererseits erschwert die Komplexität und die Zusammenhänge der die Nachverkeimung bestimmenden Faktoren entsprechende Abhilfemaßnahmen setzen zu können.

Nachverkeimung führt hinsichtlich der Trinkwasserqualität zu einer Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität und zur Entwicklung von Geruch oder Trübung. Bezüglich einer einwandfreien mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers gilt als das primäre Kriterium die Abwesenheit von *E. coli* (und coliformen Bakterien) in 100 ml Wasser. Die potentielle Fähigkeit von *E. coli* und coliformen Bakterien zum Wachstum und möglichem Ablösen aus den Biofilmen unter bestimmten Bedingungen, erschwert in diesem Zusammenhang den Zeitpunkt der anzuzeigenden fäkalen Kontamination zweifelsfrei festzustellen. Die Bildung von Biofilmen ist in hygienischer Sicht auf die mikrobiologische Population zu kontrollieren, da sie möglicherweise auch günstige Bedingungen für Krankheitserreger selbst bieten.

Die Vielfalt und Abhängigkeiten der die Nachverkeimung bestimmenden Faktoren bewirken, dass jedes Versorgungssystem individuelle Maßnahmen zur Nachverkeimungskontrolle benötigt. Vorab sollten schon bei der Planung ausschließlich Materialien für den Leitungs- und Behälterbau berücksichtigt werden, die sich einem biologischen Abbau widersetzen und auch keine organischen Nährstoffe an das Wasser abgeben. Das Versorgungsnetz ist möglichst so zu dimensionieren, dass lange

Aufenthaltszeiten des Trinkwassers in den Leitungen vermieden werden. Eine mehrbarrierige Wasseraufbereitung mit Desinfektion ist unabdingbar, um das Eindringen von Bakterien in ein Versorgungsnetz zu minimieren. Dabei kommt der Desinfektionsmaßnahme die Schlüsselfunktion zu. Als nachverkeimungskontrollierende Wartungsmaßnahme sollten regelmäßigen Spülungen ebenfalls allen Versorgungssystemen gemein sein. HPC ist in diesem Zusammenhang ein nützlicher Indikator um bakterielle Kolonisierung abzuschätzen. Ein Anstieg deutet auf bakterielle Aktivität hin, der Spülungen initiieren sollte, bevor im Leitungsnetz ein Nachverkeimungsereignis einsetzt, dass unter Umständen auch coliforme Bakterien beinhaltet. Bei Bau- und Reparaturmaßnahmen ist mit größter Sorgfalt vorzugehen, um den Eintrag von Organismen zu minimieren.

3.4 Methoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien

In diesem Kapitel werden neben den allgemein anerkannten Methoden (Standardmethoden) zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien auch solche Verfahren beschrieben, die Neuerungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Analytik repräsentieren und im Rahmen von Trinkwasseruntersuchungen eingesetzt werden können. Anlass für das Anliegen der Etablierung neuer Untersuchungstechniken ergibt sich aus den hygienischen und wirtschaftlichen Nachteilen der herkömmlichen gesetzlich vorgeschriebenen Verfahren, die wären

- mehrtägige Wartezeit auf den Befund
- hoher Kosten- und Arbeitsaufwand
- eingeschränkte analytische Empfindlichkeit
- zu spätes Erkennen von Problemen und dementsprechend verzögertes Handeln (ZIBUSCHKA, 2007).

Mit den neuen Alternativmethoden kann den genannten Kritikpunkten begegnet werden, und es kann sich durch ihre Anwendung ein verringerter Kosten-, Material- und Arbeitsaufwand, verkürzte Analysezeiten, eine höhere Spezifität, geringere antagonistische Organismenbeeinflussung oder Erleichterungen bei der Auswertung der Proben ergeben.

Weiters wurde durch die Erkenntnis, dass Desinfektionsnebenprodukte zur Bildung von karzinogenen und toxischen Substanzen im Versorgungssystem beitragen können, die Wasseraufbereitung so modifiziert, dass solche Ereignisse weitgehend ausgeschlossen werden. Dadurch wird der Sicherheitsspielraum, der zur Vermeidung einer Passage einer mikrobiologischen Kontamination erforderlich ist, gefährdet und die Notwendigkeit für eine rasche Beurteilung der Trinkwasserqualität wird noch dringender. Daher ist es speziell den Trinkwasserversorgern ein bedeutendes Anliegen schnellere und sensitivere Tests zur Verfügung zu haben, die im Idealfall ein kontinuierliches on-line-Monitoring zur Überwachung der mikrobiologischen Qualität des die Trinkwasserbehandlungsanlage verlassenden Wassers ermöglichen.

Im Allgemeinen kann zwischen kulturabhängigen und nicht kulturabhängigen Verfahren unterschieden werden. Die kulturabhängigen Verfahren nutzen die Fähigkeit von Bakterienzellen aus, sich auf oder in einem Nährmedium teilen bzw. vermehren zu können. Die nichtkulturabhängigen Verfahren, so genannte direkte Verfahren, weisen die

Bakterien entweder mikroskopisch oder durch die Detektion von repräsentativen Biomolekülen wie DNA oder RNA nach.

3.4.1 Herkömmliche biochemische Methoden

Die biochemischen Tests zur Bestimmung und Zählung von Bakterien mittels der klassischen Kultivierungsverfahren basieren auf metabolischen Reaktionen.

3.4.1.1 Multiple-tube fermentation Methode

Multiple Tube Fermentation (MTF) ist eine Methode zur Bestimmung von Coliformen, die bereits seit über 80 Jahren im Rahmen von Wasserqualitätsuntersuchungen angewandt wird. Die MTF ist von der US Environmental Protection Agency (USEPA bzw. EPA) als Standardmethode (Standard Methods 9221 E) anerkannt.

Eine Serie von Eprovetten wird mit einer geeigneten dezimalen Verdünnung der Wasserproben, die von der vermuteten Belastung des Wassers abhängt, beimpft. Die Verdünnungsreihen werden mit der entsprechenden Konzentration einer Tryptose-Laktosenährlösung bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach 24 ± 2 Stunden werden die Proben erstmalig auf Wachstum, Gasbildung oder Säurebildung untersucht. Sollte keine Gasproduktion oder Säurebildung festgestellt werden, werden die Eprovetten für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Gasproduktion wird durch Bläschenbildung in einem verkehrt in die Eprovette eingesetztes Gläschen und die Säureproduktion durch einen gelblichen Farbumschlag der Nährlösung sichtbar. Eine vermutlich positive Reaktion äußert sich nach 48 ± 3 Stunden durch Säurebildung oder Gasbildung in den Proberöhrchen. Alle Proberöhrchen mit einer vermutlich positiven Reaktion werden einem anschließenden Bestätigungstest unterzogen.

Zur Bestätigung der vermutlich positiven Reaktionen wird eine Galle- Laktosenährlösung (brilliant green lactose bile broth) verwendet. Die Proben werden wiederum bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Bildung von Gas innerhalb von 48 ± 3 Stunden bestätigt eine positive Reaktion.

Zur Abrundung der MTF - Untersuchung wird neben dem Bestätigungstest für Gesamtcoliforme eine Inkubation bei $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ mit EC Nährmedium für thermotolerante Coliforme und EC-MUG Medium für *E. coli* durchgeführt. Eine Gasproduktion innerhalb von 24 ± 2 Stunden zeigt eine positive Reaktion für Fäkalcoliforme an. Nach dem Bestätigungstest werden nach Standard Methods 9221 E weitere Kultivierungsschritte mit LES Agar oder MacConkey Agar und Gram Reagenzien durchgeführt, um das Untersuchungsergebnis weiter zu spezifizieren und komplettieren.

Das Ergebnis der MTF – Untersuchung wird in Form der wahrscheinlichen Keimzahl (most probable number (MPN)) angegeben. Diese Zahl entspricht der statistischen Schätzung der durchschnittlichen Anzahl der Coliformen in der Probe. Die MPN ermöglicht damit eine semiquantitative Auszählung von coliformen Bakterien, deren Genauigkeit von der Anzahl der Proberöhrchen, die für die Analyse verwendet werden, abhängt ist.

3.4.1.2 Membranfiltration

Die Membranfiltertechnik ist eine anerkannte und in vielen Ländern angewandte Methode zur routinemäßigen Analyse der mikrobiologischen Trinkwasserqualität. Die wesentlichen Arbeitsschritte dieser Methode gliedern sich in die Filtration der Probe durch einen sterilen

Filter mit mittleren nominalen Porendurchmesser von 0,45 μm , in die anschließende Inkubation des Filters auf einem selektiven Nährmedium unter den in den entsprechenden Normen definierten Bedingungen und in die abschließende Auszählung der typischen Kolonien.

Gegenwärtig kommen für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien eine Reihe von modifizierten Nährmedien bei der Membranfiltertechnik zur Anwendung. Die zu verwendenden Medien und die anzuwendenden Inkubationsbedingungen variieren entsprechend den einschlägigen Normen länderspezifisch. In Europa (Die Vorgangsweise bei der Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien nach EN ISO 9308-1 (2000) ist in Kapitel 4.2 dargestellt.) wird Tergitol-TTC Medium (siehe Kapitel 4.3) als Nährsubstrat verwendet, das coliforme Bakterien gelbe bzw. gelborange Kolonien bei der 24-stündigen Inkubation bei 37° C bilden lässt (siehe Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2).

Neben den in Europa verwendeten Tergitol-TTC Medium (siehe Kapitel 4.3) für das Membranfiltrationsverfahren sind noch einige andere Nährmedien weit verbreitet. In Nordamerika wird m-Endo Medium verwendet, das coliforme Bakterien nach einer 24-stündigen Inkubation bei 35°C rote Kolonien mit einem metallischen Glanz bilden lässt. Andere gebräuchliche Nährmedien zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien wären MacConkey Agar und Teepolmedium.

Die Vielzahl der modifizierten Medien begründet sich in der Tatsache, dass die Membranfiltertechnik nicht vollkommen spezifisch ist (siehe Kapitel 6.3.1.2). Im Allgemeinen ist daher ein nachfolgender Bestätigungsschritt notwendig, der je nach angewandeter Vorgangsweise weitere 24 – 48 Stunden benötigt.

Die Membranfiltration liefert ein quantitatives Ergebnis.

3.4.2 Enzymatische Methoden

Enzymatische Methoden stellen heute eine attraktive Alternative zu den herkömmlichen Techniken dar. Bei diesen Verfahren wird der Nachweis eines Bakteriums durch die Detektion eines dem Mikroorganismus eigenen Enzyms erbracht. Diese enzymatische Reaktionen können in Abhängigkeit des untersuchten Enzyms spezifisch für eine Gruppe, eine Gattung oder eine Art sein. Durch die Verwendung eines chromogenen bzw. fluoreszierenden Substrats, das durch die metabolische Aktivität des betreffenden Enzyms gespalten wird, lässt sich die Anwesenheit des entsprechenden Enzyms und somit auch des nachzuweisenden Bakteriums anhand eines Farbumschlags bzw. einer Fluoreszenz erkennen.

Im speziellen Fall des Indikatorbakteriums *E. coli* bedient man sich des Enzyms β -D-Glucuronidase. Für die Gruppe der coliformen Bakterien wird das Enzym β -D-Galaktosidase verwendet, welches den Abbau von Laktose in Galaktose und Glucose katalysiert. Diese beiden Enzyme werden im Allgemeinen als primäres Charakteristikum dieser Organismen akzeptiert (siehe Kapitel 3.1).

Um die Anwesenheit von β -D-Glucuronidase in *E. coli* zu detektieren, werden folgende chromogene Substrate verwendet: Indoxyl- β -Glucuronidase (IBDG), der Phenolphthalein-mono- β -Glucuronidkomplex und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Glucuronid (X-Glu). Am häufigsten wird das fluorogene Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUGlu) verwendet. Chromogene Substrate wie o-Nitrophenyl- β -Galactopyranosid (ONPG), p-Nitrophenyl- β -Galactopyranosid (PNPG), 6-Bromo-2-Naphtyl- β -Galactopyranosid und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galactopyranosid (X-Gal) werden genutzt, um die Präsenz der von den Coliformen gebildete β -D-Galaktosidase zu detektieren, sowie das fluorogene Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galactopyranosid (MUGal).

Nachfolgend werden einige enzymatische Verfahren zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien näher dargestellt. Dabei wird zum grundsätzlichen Verständnis der Defined Substrate Technology (DST) auf Colilert®-18, eine auf DST basierende Anwendung mit MUG und ONPG, und Colisure® näher eingegangen, da ja Colilert®-18 in einigen Ländern als gleichwertiges Alternativverfahren zugelassen ist. Weiters wird Colifast als Beispiel für eine automatisierte Anwendung der enzymatischen Methoden beschrieben.

3.4.2.1 Defined Substrate Technology

Die Defined Substrate Technology (DST) ist eine Methode zur Identifikation von Bakterien durch die Wirkung ihrer konstitutiven Enzyme auf chromogen markierte, spezifische Substrate. Spezifische Substrate in den DST-Medien werden als Nährstoffquelle für die Zielorganismen bereitgestellt und können nur von Organismen, die das Zielenzym besitzen, verwertet werden. Da keine anderen signifikanten Nährstoffe im Medium vorhanden sind, unterdrückt dieser Faktor zusammen mit Inhibitoren in den Formulierungen das Wachstum von heterotrophen Keimen und reduziert infolgedessen Störungen. Durch die Substratnutzung wird ein Farbstoff bzw. Fluoreszenz aus dem spezifischen Substrat frei und ist ein Zeichen für die Anwesenheit des Zielorganismus.

Zur Bestimmung von *E. coli* liegt im Medium das Substrat Glukuronid vor, welches mit Methyl-Umbelliferon als fluorogenem Indikator zum Molekül 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Glukuronid (MUG) konjugiert ist. Während des Wachstums von *E. coli* metabolisiert das konstitutive Enzym β -D-Glukuronidase die Glukuronid-Komponente des MUG. Dadurch wird das Methyl-Umbelliferon freigesetzt, was zu einer leuchtend blauen Fluoreszenz unter UV-Beleuchtung bei 365 nm führt. Die Abbildung 3 veranschaulicht das Prinzip der Detektion von *E. coli* durch Spaltung des Moleküls MUG.

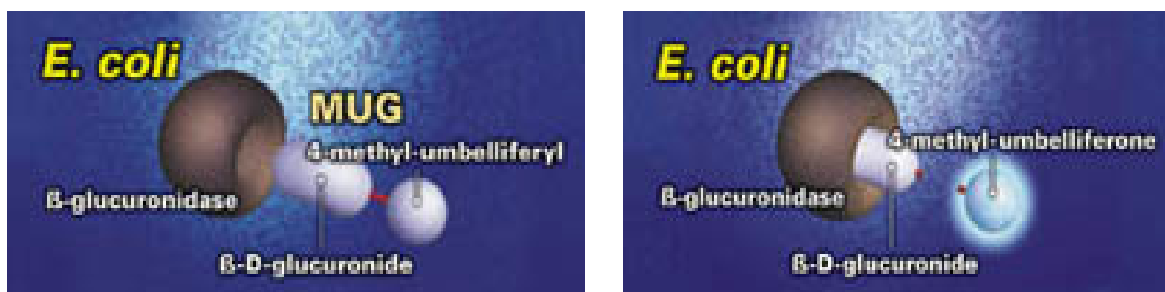


Abbildung 3: Prinzip der Detektion von *E. coli*. Metabolisierung durch *E. coli* β -Glukuronidase von MUG erzeugt Fluoreszenz. © 2003 IDEXX Laboratories, Inc.

Das Substrat Galaktopyranosid liegt für die Bestimmung der coliformen Bakterien im Medium vor. Es ist mit ortho-Nitrophenol als chromogenen Indikator zum Molekül ortho-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) konjugiert. Beim Wachstum der coliformen Bakterien wird mit dem konstitutiven Enzym β -D-Galaktosidase die Galaktopyranosid-Komponente des ONPG metabolisiert, wodurch das ortho-Nitrophenol freigesetzt wird und die Farbe der Lösung von farblos in ein leuchtendes Gelb umschlägt. Die Abbildung 4 veranschaulicht das Prinzip der Detektion von coliformen Bakterien durch Spaltung des Moleküls ONPG.



Abbildung 4: Prinzip der Detektion von Coliformen. Metabolisierung durch Coliformen β -Galaktosidase von ONPG erzeugt Gelbfärbung. © 2003 IDEXX Laboratories, Inc.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von coliformen Bakterien ergibt sich durch die Verbindung des Substrates Galaktopyranosid mit dem chromogenen Indikator Chlorophenol zum Molekül Chlorophenol- β -D-Galaktopyranosid (CPRG). Das konstitutive Enzym β -D-Galaktosidase der coliformen Bakterien metabolisiert während des Wachstums die Galaktopyranosid-Komponente des CPRG und setzt Chlorophenol frei. Dadurch wandelt sich die gelbe Färbung der Lösung in eine magentafarbene. Die Abbildung 5 veranschaulicht das Prinzip der Detektion von coliformen Bakterien durch Spaltung des Moleküls CPRG.

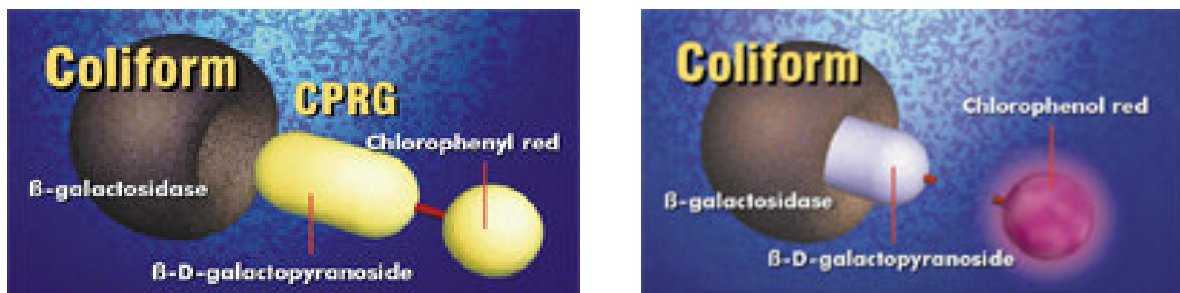


Abbildung 5: Prinzip der Detektion von Coliformen. Metabolisierung durch Coliformen β -Galaktosidase von CPRG erzeugt Magentafärbung. © 2003 IDEXX Laboratories, Inc.

Für die praktische Anwendung der Defined Substrate Technology sind zahlreiche kommerzielle Tests erhältlich und werden nachfolgend beschrieben.

3.4.2.1.1 Colilert®-18

Das Prinzip des Colilert®-18 Verfahrens basiert auf der oben beschriebenen Defined Substrate Technology von IDEXX (Colilert, IDEXX Laboratories; 1997). Das Colilert-Reagenz dient gleichzeitig zum Nachweis und zur Bestätigung von Gesamt-Coliformen und *E. coli* und lässt sich sowohl für einen Presence /Absence-Test wie auch für eine Quantifizierung verwenden.

Zur Bestimmung der Anwesen- oder Abwesenheit von *E. coli* und Coliformen wird die in vorportionierten sogenannten Snap-Päckchen enthaltenen Colilert®-18 Reagenz der Probe von 100 ml in einem sterilen, durchsichtigen und nicht-fluoreszierenden Gefäß zugegeben und anschließend 18 Stunden bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Ergebnisinterpretation erfolgt anhand des Aussehens der Probe. Eine unveränderte bzw. eine farblose Probe bedeutet ein negatives Ergebnis für coliforme Bakterien und *E. coli*. Eine Gelbfärbung ist ein positiver Nachweis für Gesamt-Coliforme, und eine Gelbfärbung gemeinsam mit einer Fluoreszenz, die mit einer UV-Lampe von 6 Watt bei einer Wellenlänge von 365 nm im Dunklen und einem Höchstabstand von 12 cm von der Probe geprüft wird, gilt als positiver Nachweis für *E. coli*.

Zur Quantifizierung von *E. coli* und coliformen Bakterien wird der IDEXX Quanti-Tray® zum Ermitteln von Keimzahlen bis zu 200 CFU (Colony forming units) pro 100 ml bzw. der Quanti-Tray®/2000 zum Ermitteln von Keimzahlen bis zu 2419 CFU pro 100 ml zur Verfügung gestellt. Diese Trays sind Schalen, die im Falle des Quanti-Trays® 51 Probenvertiefungen und im Falle des Quanti-Trays®/2000 97 Vertiefungen allerdings mit zwei verschiedenen Probenvolumina aufweisen. Auch hier wird der Inhalt einer Packung Colilert®-18 einer Probe von 100 ml in einem sterilen Gefäß zugegeben und gut vermischt. Anschließend wird die Mischung aus Probe und Reagenz in einen Quanti-Tray® bzw. Quanti-Tray®/2000 gegossen und die Trays mit einem IDEXX Quanti-Tray® Versiegelungsgerät verschlossen. Dieser Quanti-Tray® Sealer garantiert die automatische Aufteilung der Probe in die richtigen Portionen. Nach der 18 stündigen Inkubation bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ wird die Zahl der positiven Vertiefungen nach der oben beschriebenen visuellen Auswertung festgestellt, und dieser Wert anhand der bereitgestellten Tabellen in die wahrscheinlichste Anzahl (Most Probable Number, MPN) der Bakterien in der Originalprobe konvertiert.

Diese Methode ist aufgrund der DST spezifisch und weist laut Produktbeschreibung (Coliort, IDEXX Laboratories; 1997) „ein einzelnes lebensfähiges *E. coli* bzw. Coliformes“ in der Probe nach. Sie wurde bereits in zahlreichen Ländern durch die entsprechenden Gesetze und Normen als dem Referenzverfahren gleichwertiges Verfahren anerkannt. So sind beispielsweise Trinkwasserprüflaboratorien nach der deutschen Trinkwasserverordnung verpflichtet, entweder das EU- Referenzverfahren (EN ISO 9308-1 (2000)) oder das Verfahren Colilert®-18/Quanti-Tray von IDEXX anzuwenden. Die britische Umweltbehörde benennt diese Methode in „The Microbiology of Drinkingwater“ 2000. Von der US Behörde EPA wurde der Colilert®-18 Stunden Test zugelassen und wurde in die „Standard Methods for Examination of Water and Wastewater“ aufgenommen.

3.4.2.1.2 Colisure®

Das Verfahren unter der Verwendung des Colisure®-Reagenz basiert ebenfalls auf der unter Punkt 3.4.2.1 beschriebenen Defined Substrate Technology von IDEXX. Auch hier ist gleichzeitig der Nachweis und die Bestätigung von *E. coli* und der coliformen Bakterien sowohl in einem Presence /Absence-Test als auch durch eine Quantifizierung möglich.

Zur Bestimmung der Anwesen- bzw. Abwesenheit von *E. coli* und coliformer Bakterien wird der Inhalt einer mit Colisure®-Reagenz gefüllten Snap-Päckchen, das für eine 100 ml Probe vorportioniert ist, dieser in einem sterilen, durchsichtigen und nicht-fluoreszierenden Gefäß zugegeben und anschließen mindestens 24 Stunden bis maximal 48 Stunden bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Test wird visuell ausgewertet. Eine unveränderte Gelb- bzw. Goldfärbung der Probe ist ein negativer Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien. Ein Farbumschlag der Lösung in Rot oder Magenta bedeutet einen positiven Nachweis von Gesamt-Coliformen. Die deutliche Rot- bzw. Magentafärbung eines positiven Nachweises kommt einer augenscheinlichen Auswertung entgegen. Tritt neben der Rot- bzw. Magentafärbung auch eine Fluoreszenz unter einer UV-Lampe von 6 Watt bei einer Wellenlänge von 365 nm und einen Abstand von 13 cm in einer dunklen Umgebung der Probe auf, so ist dies ein positiver Nachweis für *E. coli*.

Zur Quantifizierung von *E. coli* und coliformen Bakterien wird der in Kapitel 3.4.2.1.1 beschriebenen IDEXX Quanti-Tray® bzw. Quanti-Tray®/2000 angewendet. Der Inhalt eines Colisure® Snap-Päckchen wird zu 100 ml einer Probe in einem sterilen Gefäß gegeben und gut geschüttelt, sodass sich die Reagenz vollständig auflöst und mit der Probe gut vermischt. Anschließend wird die Probenreagenzmischung in einen Quanti-Tray bzw. Quanti-Tray®/2000 gegossen und mit dem IDEXX Quanti-Tray Sealer verschlossen. Nach der 24 – 48 -stündigen Inkubation bei $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ erfolgt die Zählung aller positiven Vertiefungen der Trays nach der oben beschriebenen Ergebnisinterpretation. Diese Zahl wird anhand den bereitgestellten Tabellen in die

wahrscheinlichste Anzahl (Most Probable Number) der Bakterien in der Originalprobe konvertiert.

Colisure ist von der US Behörde EPA anerkannt und in „Standard Methods for Examination of Water and Wastewater“ einbezogen.

3.4.2.2 Colifast®

Colifast, eine in Lysaker einem Vorort von Oslo, Norwegen, ansässige Firma, entwickelt mikrobiologische Schnelltests für den Umwelt- und Nahrungsmittel- sowie den pharmazeutischen Markt. Für die Qualitätskontrolle von Wasser sind drei Produkte erhältlich: Colifast MicroDetektor (CMD) der Colifast Analyser (CA) und der Colifast At-Line Monitor (CALM).

Die patentierte Colifast® Technologie kombiniert ein selektives Nährmedium mit einem automatisierten Analyser und einer Anwendersoftware. Das Nährmedium für coliforme Bakterien enthält als Substrat 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-Galaktoside, welches nach der Hydrolyse durch das Enzym β -D-Galaktosidase fluoresziert. Spezifität wird durch das Indikatorsubstrat im Colifast®-Medium und durch verschiedene Inkubationstemperaturen von 44 – 44,5°C für thermotolerante Coliformen und von 35 – 37°C für Totalcoliforme gewährleistet. Weiters unterdrücken Inhibitoren das Wachstum von Nichtzielorganismen.

Beim Colifast® Basistest werden mit dem spezifischen Colifast® Nährmedium vorgefüllte Fläschchen verwendet. Das Wasser wird direkt in die Fläschchen gefüllt. Nach einer Inkubation von maximal 15 Stunden kann eine positive Coliformenreaktion an einem hellen blauen Licht unter einer UV Lampe abgelesen werden. Für die Auswertung kann auch nach Transformation der Probe der Colifast MicroDetektor verwendet werden.

Der CA ist ausgelegt als semi-automatische Laborausstattung für die Schnellerkennung von Zielbakterien in flüssigen Proben. Die normale Anwendung umfasst die Mischung der Probe mit dem entsprechenden Nährmedium in Fläschchen, die anschließend im Inkubatorblock des CA positioniert und registriert werden, und die Auswahl des entsprechenden Messprogramms mittels der Software. Es besteht auch die Möglichkeit zur Konzentrationserhöhung der Probe, diese zu filtern, und den Membranfilter aseptisch ins Fläschchen einzubringen, wo die Substrate der Nährlösung ebenfalls eine enzymatische Reaktion bewirken. Der Analyser überwacht ein eventuelles Auftreten einer Fluoreszenz, und mittels der entsprechenden Software wird sowohl der Messvorgang kontrolliert und gesteuert als auch die Datenregistrierung und nachfolgende Bearbeitung ermöglicht. Die Automatisierung erlaubt bei positiven Proben mittels E-Mail zu warnen. Während der Inkubation werden in unterschiedlichen programmabhängigen Zeitintervallen Unterproben genommen, und automatisch gibt ein Endbericht die Konzentration des die Fluoreszenz erzeugenden Produkts an. Es können bis zu 76 unterschiedliche Proben während einer Untersuchung analysiert werden.

Der CALM stellt einen allein operierenden Analysierer für industrielle Zwecke dar und eignet sich im Besonderen für systematisches Qualitätsmonitoring in Wasserversorgungssystemen. Auch hier wird die Anwesenheit von *E. coli* und coliformen Bakterien in Wasser, wie oben beschrieben, durch die β -Glucoronidaseaktivität fluorimetrisch festgestellt. Bei der Anwendung wird der Inkubatorblock ungefähr einmal wöchentlich mit den das Nährmedium enthaltenden Fläschchen bestückt und der Arbeitsplan zur automatischen Probennahme des zu untersuchenden Wasserstrom vorprogrammiert. Der CALM verteilt entsprechend diesem Arbeitsplan in programmierten Intervallen die Proben in die Fläschchen und analysiert sie. Es besteht die Möglichkeit ein Alarmlevel zu definieren. Die Resultate werden als analoges Signal festgehalten und können optional via E-Mail zeitgleich versendet werden. Die Kapazität des Systems beträgt 80 Probenpositionen, welche gleichzeitig das obere Limit der Anzahl der Analysen zwischen den erforderlichen Wartungen darstellt.

Laut Herstellerangabe liegen bei den beiden automatisierten Anwendungen, CA und CALM, die Ergebnisse in Abhängigkeit der bakteriellen Kontamination innerhalb von 2 - 13 (max. 15) Stunden bei einem Detektionslimit von einem Coliform pro Probenvolumen vor.

3.4.2.3 Anwendungen des enzymatischen Analyseprinzips für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien

Die Tabelle 7 zeigt eine Zusammenstellung von praktischen Verfahren für Trinkwasseruntersuchungen, die für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien enzymatische Reaktionen nutzen.

Verfahren	Reaktion	Anmerkung
Colilert®-18	Gelbfärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Presence/Absence Test
Colilert®-18, Quanti-Tray	Gelbfärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Quantitatives Verfahren (MPN)
Colisure®	Rot- Magentafärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Presence/Absence Test
Colisure®, Quanti-Tray	Rot- Magentafärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Quantitatives Verfahren (MPN)
Colifast®	Fluoreszenz	Quantitatives Verfahren (KBE/100ml)
ColiComplete®	Blaufärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Presence/Absence Test oder Quantitatives Verfahren (MPN)
ColiTrak Plus	Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Presence/Absence Test oder Quantitatives Verfahren (MPN)
Colitag™	Gelbfärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Presence/Absence Test
IntelliQUANT 9000™	Blau-Grünfärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Quantitatives Verfahren (KBE/100ml)
Aqua-checker	Blau-Grünfärbung (Coliforme) zusätzliche Fluoreszenz (<i>E. coli</i>)	Quantitatives Verfahren (KBE/100ml)
Digital Colorcount ¹	Pinkfärbung (Coliforme) Blau- bzw. Purpurfärbung (<i>E. coli</i>)	Quatitatives Verfahren (MPN)

Tabelle 7: Zusammenstellung alternativer Verfahren zum Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien mittels Enzymreaktion; Anmerkung ¹: beschrieben bei THOMAS et al. (1997)

Es werden auch verschiedene kommerzielle Agar für die Bestimmung von *E. coli* und coliforme Bakterien, die auf dem enzymatischen Analyseprinzip beruhen und für das Membranfiltrationsverfahren (siehe Kapitel 3.4.1.2 und 4.2) geeignet sind, angeboten. Sie kombinieren klassisches Agarmedium für die Zählung von *E. coli* und coliforme Bakterien mit spezifischen chromogenen und/oder fluoreszierenden Substraten zur Identifizierung der Enzyme β -D-Glucuronidase und β -D-Galaktosidase.

Chromocult-Agar (Merck) beispielsweise ermöglicht die sofortige Differenzierung in *E. coli* (dunkelblau-violette gefärbte Kolonien) und coliforme Bakterien (rosa-rote gefärbte Kolonien). Das Nährmedium m-Coli24BLUE der Firma Hach ist ebenfalls eine derartige Entwicklung, das die simultane Detektion und Auszählung von *E. coli* (blau gefärbte Kolonien) und coliforme Bakterien (rote gefärbte Kolonien) erlaubt. Bei diesen Verfahren wird keine UV-Lampe zur Differenzierung in *E. coli* und coliforme Bakterien benötigt. Ein fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli* ist mit dem Nährmedium Fluorocult der Firma Merck möglich.

3.4.3 Molekulare Methoden

Die meisten molekularen Techniken funktionieren auf Basis der Biochemie, Genetik und Immunologie. Nachfolgend sind molekulare Methoden zur spezifischen Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser beschrieben.

3.4.3.1 Immunologische Methoden

Immunologische Methoden basieren auf der spezifischen Erkennung zwischen Antikörper (Abwehrstoff) und Antigenen. Dabei können Oberflächenstrukturen wie Epitope von Proteinen als Zielort für markierte Antikörper dienen. Die hohe Affinität des Antigen-Antikörperkomplexes ist für diese Erkennungsreaktion charakteristisch. In Abhängigkeit von der taxonometrischen Ebene des Zielantigens erlauben immunologische Methoden die Detektion der Antigene einer Familie, Gattung oder Art.

3.4.3.1.1 Immunfluoreszenz Untersuchung

Die Immunfluoreszenz-Untersuchung bedient sich fluoreszenzmarkierter Antikörper. In einer direkten immunofluoreszenten Prozedur ist der spezifische Antikörper direkt mit einem Fluorochrom konjugiert. Bei einer indirekten immunofluoreszenten Methode bindet der spezifische primäre Antikörper an das Zielantigen gefolgt von einer zusätzlichen Zugabe eines fluorochrom markierten sekundären Antikörper, welcher auf den ersten Antikörper abzielt. Nach Filtration der Wasserprobe erfolgt die Auszählung der fluoreszent markierten Zellen mit Hilfe epifluoreszenter Mikroskopie oder Cytometrie der festen Phase bzw. mittels Durchflussscytometrie.

3.4.3.1.2 Biosensoren

Biosensoren sind mit biologischen Komponenten ausgestattete Messfühler. Ihre drei primären Komponenten sind Immunoaffinitäts-Techniken, Tests auf Basis von Oberflächenchemie und integrierte Optik.

Zunächst werden die in einer Probe vorhandenen Zielorganismen von Antikörpern, die an den Biosensor gekoppelt sind, erkannt und gebunden. Dann bindet ein Satz von „Reporter-Antikörper“ an den selben Zielorganismus und katalysiert eine chemische Reaktion. Ein chemischer Sensor detektiert das Produkt der chemischen Reaktion, das wiederum die Eigenschaften des optischen Sensors ändert und Signale mithilfe von

Lasern weiterleitet. Letztendlich erhält man sowohl qualitative und quantitative Information bezüglich eines spezifischen Mikroorganismus in einer Wasserprobe (KÖSTER et al., 2002).

Biosensoren können auch biologische Systeme auf anderem Niveau als Antikörper nutzen (z.B. Enzyme).

3.4.3.2 Nukleinsäure basierende Methoden

Desoxyribonukleinsäure (DNS/DNA) speichert in allen Lebewesen die gesamte Erbinformation. Die DNA ist ein doppelhelixförmiges Biomolekül, das kettenförmig aus Nukleotiden aufgebaut ist. Jedes Nukleotid besteht aus einem Phosphat-Rest, einem Zucker und einer von vier organischen Basen (Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T)). Die Informationen über den Bau und Funktion einer jeden Zelle ist nun in der Abfolge der vier Basen in Form von so genannten Sequenzen festgelegt. Die Ribonukleinsäure (RNA), ähnlich der DNA jedoch meist einzelsträngig aus eine Kette von Nukleotiden aufgebaut, dient unter anderem der Umsetzung von genetischer Information in Proteine.

Organismen unterscheiden sich dabei in ihrer Sequenzierung der DNA. Diese Sequenzunterschiede werden von den molekularen Methoden bei der Bestimmung von Organismen ausgenutzt.

Die meisten auf Nukleinsäure basierenden Methoden nützen Hybridisierung – einen Vorgang, bei dem durch die komplementäre Sequenzerkennung ein Nukleinstrang sich an einer Nukleinvorgabe anlagert, indem sich Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Nukleinbasen ausbilden. Die Hybridisationsreaktion kann zwischen einem nukleinen DNA-Strang und einer chromogenen DNA-Sequenz (DNA-DNA Hybridisation) oder einer rRNA- bzw. tRNA-Sequenz (DNA-RNA Hybridisation) realisiert werden.

Diese Methoden liefern taxonometrische Information auf den Ebenen der Klassen, der Gattungen, der Arten oder Unterarten manchmal ohne aufwendige Kultivierungsschritte und ermöglichen die Bestimmung von spezifischen Bakterien innerhalb weniger Stunden.

3.4.3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die Generierung von multiplen Kopien spezifischer DNA-Fragmente. Diese Kettenreaktion läuft unter Verwendung eines DNA-replizierenden Enzyms (DNA-Polymerase) und oligonukleotide Primer zur Markierung des Startpunktes unter bestimmten Bedingungen ab. Ausgehend von einem Genom (oder Fragmenten davon) lassen sich DNA-Fragmente in Quantitäten herstellen, die dann mit etablierten Methoden sichtbar gemacht werden können.

Der theoretische Ablauf der PCR besteht aus einer Anzahl von 20 - 50 Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung, und Elongation, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Bei der Denaturierung werden die beiden Stränge der DNA unter Hitze getrennt. Dann erfolgt die Anlagerung der Primer an die nun einsträngige DNA bei einer spezifischen Hybridisationstemperatur und anschließend werden die fehlenden Stränge von der DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Die Zyklen der PCR resultieren in einer exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz, da die Produkte eines Zyklus als Matrize im nächsten dienen. Das PCR-Produkt kann durch die molekularbiologische Methode der Agarose-Gelelektrophorese oder durch Hybridisation mit markierten Sonden identifiziert werden.

Abhängig von der „Ziel-Sequenz“ erlaubt diese Technik den Nachweis größerer Organismengruppen oder die Identifizierung spezifischer Spezies. Das geschieht entweder durch die Amplifizierung von Regionen, die innerhalb verschiedener Spezies konserviert vorliegen (z.B. Bereiche der 16S-ribosomalen DNA) oder durch

Vervielfältigung von Sequenzen, die mit speziellen Funktionen assoziiert sind. Da die Schritte des PCR-Protokolls in drei bis vier Stunden durchgeführt werden können, lassen sich die Erreger von wasserbedingten Krankheiten in akzeptabler Zeit ermitteln (KÖSTER et al., 2002).

3.4.3.2.2 *In-situ-Hybridisierung*

Die in-situ-Hybridisierung (ISH) dient dem Nachweis von Nukleinsäuren (DNA, RNA) in einzelnen Zellen. Dabei wird eine markierte Sonde aus Nukleinsäure verwendet, um komplementäre Nukleinsäuresequenzen (z.B. geeignete Abschnitte der mRNA oder rRNA) zu detektieren. Über die komplementären Basenpaarungen bindet die Oligonukleotid-Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure und formt Hybridmoleküle. Anschließend werden nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Sondenmoleküle ausgewaschen, und die markierten Zellen lassen sich dann je nach der Eigenschaft der Markierung mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie, Flowcytometrie, oder Laser-Scanning-Elektronenmikroskopie auswerten. Bei der Laser-Scanning-Analyse wird ein Fluoreszenzereignis automatisch durch eine motorisierte Laser-Scanning-Einrichtung, die mit einem Epifluoreszenzmikroskop verbunden ist, registriert, und es sind nur noch falsch positive Partikel (z. B. durch Autofluoreszenz) auszuschließen.

Die Sonde ist aufgrund ihrer komplementären Eigenschaft je nach ausgewählter Sequenz der Nukleinsäure spezifisch zu einem einzelnen Mikroorganismus, Art oder Gattung. Da das Signal eines einzelnen Sondenmoleküls schwach ist, sollte die Zielsequenz in vielfacher Kopie in der Zelle vorhanden sein (z.B. 16S rRNA).

Die Entwicklung einer spezifischen 16S rRNA-Sonde – anders als bei *E. coli* - ist für coliforme Bakterien nicht möglich, da diese Gruppe definitionsbedingt Bakterien von Gattungen umfasst, die phylogenetisch unterschiedlich sind.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet fluoreszierende Marker und ermöglicht die Identifizierung von Mikroorganismen ohne Kultivierungsschritt. In der Praxis umfasst die Prozedur folgende Schritte: Filtration der Wasserprobe und Fixierung der Organismen auf der Membran, Permeabilisierung der Zellhülle für den Eintritt der Sonden, Hybridisierung (Bindung der Sonden an die Zielmoleküle), Auswaschen der nicht gebundenen oder unspezifisch gebundene Sondenmoleküle und die Detektion. FISH gilt als hoch spezifische zelluläre Detektionsmethode, die relativ einfach durchzuführen ist.

3.4.3.2.3 *Microarray Technologie*

Microarray bezeichnet molekularbiologische Untersuchungssysteme, die die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelnachweisen in biologischem Probenmaterial erlauben. Es gibt zwei Varianten der Microarray-Technologie:

- In einer automatisierten Auftragungsprozedur werden cDNA-Sonden (einige hundert Nukleotide lang) auf einer festen Oberfläche (z.B. Glas) fixiert. Anschließend folgt die Exposition und die spezifische Hybridisierung in Gegenwart einer Auswahl von sogenannten „Zielsequenzen“ die entweder separat oder in einer Mischung angeboten werden (EKINS und CHU, 1999; zit. bei KÖSTER et al., 2002)
- Ein „Array“ von kurzen Oligonukleotiden (ca. 18 bis 25 Basenpaare) oder RNA-Sonden wird markierten DNA-Fragmenten ausgesetzt. Nach erfolgter Hybridisierung wird auf das Vorhandensein von komplementären Sequenzen getestet und deren Identität bestimmt. Das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip wurde zuerst von Affymetrix Inc. entwickelt und als sogenannter „GeneChip® Array“ oder „DNA Chip“ beschrieben (LEMIEUX et al., 1998; zit. bei KÖSTER et al., 2002, LIPSHUTZ et al.; zit. bei KÖSTER et al., 2002).

Unabhängig von der Art der verwendeten Arrays wird RNA aus dem zu untersuchenden Objekt gewonnen und beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Anschließend werden diese dann mit den Arrays hybridisiert. Nach Abwaschen der nicht gebunden RNA wird die eventuelle Fluoreszenz jeder Position des Microarrays mittels Laser ausgelesen.

Es ist abzusehen, dass diese Methoden die Analysezeit für fäkale Indikatoren zu 4 Stunden reduzieren kann, und die Kosten signifikant senkt (STEVENS et al., 2003).

3.4.4 Elektrochemische Methoden

In diesem Kapitel werden praktische Messtechniken zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien beschrieben, bei denen Rückschlüsse auf die An- bzw. Abwesenheit der Zielbakterien in der Probe über die Veränderung der physikalischen, chemischen und elektrischen Parametern des Nährmediums gezogen werden. Durch die mikrobielle Tätigkeit der Organismen ändern sich die physikalischen, chemischen und elektrischen Eigenschaften der Nährlösung, welche durch sensible Techniken der Moderne gemessen werden können. Da die gängigen Bestimmungen die Zahl der Indikatororganismen, *E. coli* und coliforme Bakterien, in Trinkwasser mit Null festlegen (siehe Kapitel 3.2), sind diese Methoden mit ihrem presence/absence-Ergebnis für die praktische Anwendung geeignet.

3.4.4.1 Colitrack

Colitrack wurde in Zusammenarbeit mit CRECEP (Research and Control Center Paris) und mit der finanziellen Unterstützung von Seine - Normandy Water Agency von dem französischen Unternehmen Saur entwickelt. Dieses Gerät erlaubt ein quasi-continuierliches Monitoring und die Fernüberwachung der bakteriologischen Qualität in einem Wasserverteilungssystem.

Colitrack basiert auf dem Prinzip der *E. coli*-Detektion anhand der Säuregärung in einem selektiven Medium. Die anfängliche Bakterienkonzentration wird durch Messungen des pH-Wertes der Probe und der Zeit, die benötigt wird, um aufgrund der Säurebildung eine Absenkung des pH-Wertes um 0,1 pH-Einheiten zu erreichen, abgeschätzt. Für diese kinetische Methode bedeutet dies, dass die Inkubationszeit indirektproportional zum Logarithmus der anfänglichen *E. coli*-Konzentration sein muss.

Die Methode wurde unter Laborbedingungen geeicht und getestet und es zeigte sich, dass die Detektionszeit eines *E. colis* in einer 100 ml Probe unter elf Stunden liegt. Diese Zeit kann sich um zwei Stunden im Falle von Stress hervorgerufen durch starke Chlorung erhöhen.

3.4.4.2 Impedanzverfahren

Die spezifische Messtechnik des Impedanzverfahrens wird heute in weiten Bereichen der Gütekontrolle von Lebensmitteln (Milch und Milchprodukte, etc.) eingesetzt. Für das Lebensmittel Trinkwasser, das naturgemäß eine im Vergleich sehr geringe Anzahl an Keimen enthält, ist das Impedanzverfahren an die Erfordernisse der Gütekontrolle von Trinkwasser anzupassen. Im Rahmen der gegenständlichen Arbeit wird eine Vergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999) (siehe Kapitel 4.5) zwischen dem Impedanzverfahren mit dem Messsystem Bac Trac 4100 der Firma Sy-Lab (siehe Kapitel 4.4) und der allgemein anerkannten Methode des Membranverfahren nach EN ISO 9308 (2000) (siehe Kapitel 4.2 und 4.3) beschrieben, um die Eignung dieses Impedanzverfahrens für die mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser festzustellen.

Die Bestimmung von Mikroorganismen mittels Impedanzverfahren beruht auf deren Stoffwechseleigenschaften. Dabei dient die Veränderung des frequenzabhängigen elektrischen Widerstands der Nährlösung als Maß für eine eventuelle mikrobielle Belastung. Durch die metabolistische Tätigkeit der Mikroorganismen werden höhermolekulare Bestandteile der Nährlösung wie zum Beispiel Kohlenhydrate, Proteine, Peptide, usw. in einfachere Teilchen zerlegt, die meist dissoziieren und dadurch zum elektrischen Stromfluss beitragen. Diese geladenen Teilchen können sich in der Flüssigkeit wegen ihrer geringeren Größe leichter bewegen und besitzen aufgrund ihrer elektrischen Ladung eine höhere elektrische Mobilität und erhöhen somit die elektrische Leitfähigkeit der Nährlösung. Anders ausgedrückt führt die zeitliche Zunahme der Ionen zu einer Abnahme des elektrischen Widerstands der Nährlösung, der an Elektroden registriert wird. Daneben bewirken andere Prozesse während der Inkubationszeit ebenfalls eine Veränderung der Nährlösung. Die Abbildung 6 veranschaulicht das Prinzip der Impedanzmessung.

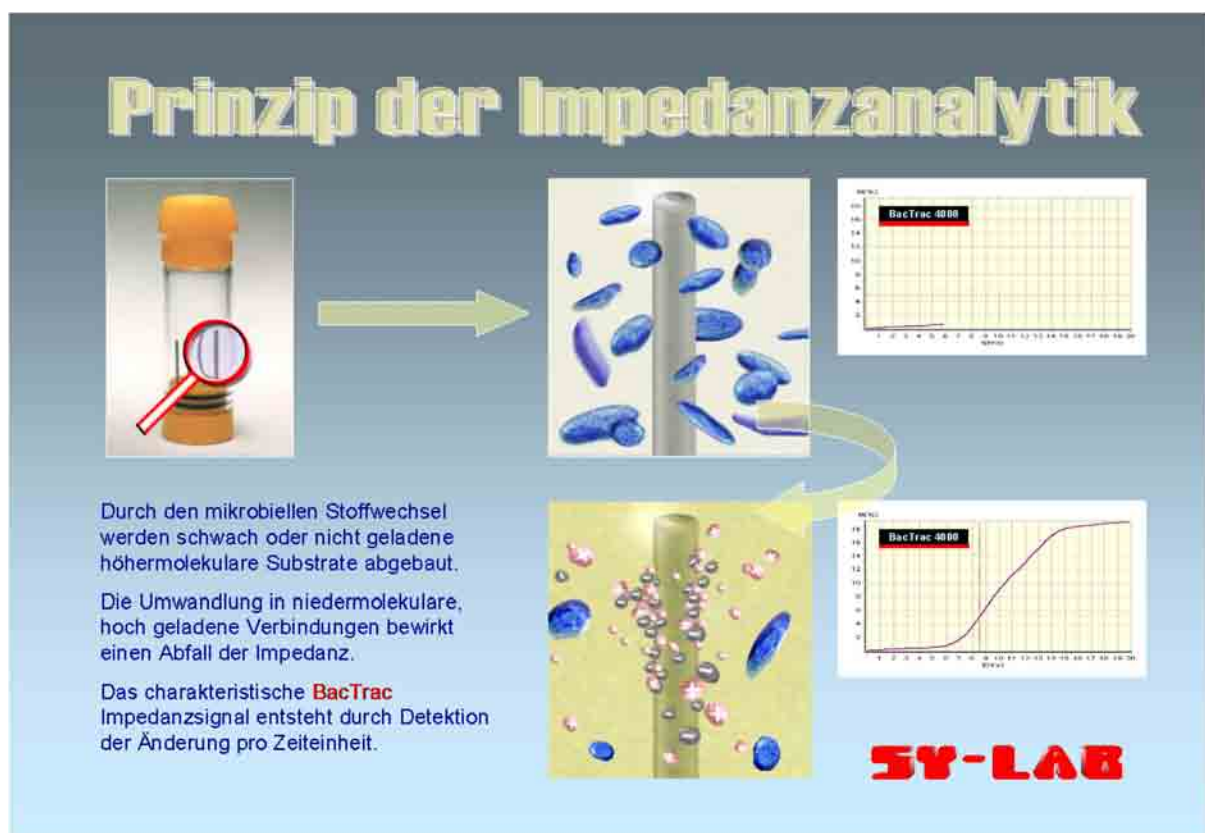


Abbildung 6: Prinzip der Impedanzanalytik Umwandlung von schwach oder nicht geladenen höhermolekularen Substraten in hoch geladene niedermolekulare Verbindungen durch mikrobiellen Stoffwechsel; Sy-Lab, Purkersdorf, Austria

Das Impedanzverfahren liefert ein qualitatives Ergebnis. Für die Aufgabe der routinemäßigen Trinkwasserkontrolle in Bezug auf den Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien ist dies ausreichend, da nach den gängigen Normen *E. coli* und Coliforme in einwandfreien Trinkwasser nicht nachweisbar sein dürfen (siehe Kapitel 3.2).

Im bisherigen Anwendungsbereich der Gütekontrolle von Lebensmitteln hat die spezifische Messtechnik des Impedanzverfahrens zu wesentlich rascheren Untersuchungsergebnissen geführt als mit herkömmlichen mikrobiologischen Analyseverfahren. Für die Anwendung der Impedanztechnik in der routinemäßigen Trinkwasserkontrolle sind ebenfalls positive Auswirkungen in Form von kürzeren Analyse-

und Arbeitszeiten, Materialaufwand sowie einer weitgehenden Automatisierung mit der Möglichkeit einer Fernsteuerung des Systems zu erwarten. Da die herkömmlichen Standardverfahren großen Material-, Arbeits- und Zeitaufwand benötigen, ist der Bedarf nach neuen automatisch arbeitenden Untersuchungsmethoden international ein aktuelles Anliegen. „Rapid Detection for Rapid Decisions“ stellt in diesem Zusammenhang nicht nur ein Schlagwort, sondern die zentrale Forderung eines nachhaltigen Trinkwassergütemanagement dar (ZIBUSCHKA, 2003).

Neben dem in dieser Arbeit im Zuge einer vergleichenden Untersuchung vorgestellten Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 der Firma Sy-Lab ist auch das RABIT-System von Don Whitley Scientific Ltd., das ebenfalls auf dem Prinzip der Impedanzmessung beruht, zu nennen.

Hervorzuheben ist bei dem Messsystem Bac Trac 4100, dass zwei unabhängige Messgrößen während einer Untersuchung an den Elektroden registriert werden (Impedanz Splitting Methode). Bei dieser sogenannten Impedanz Splitting Methode wird neben der Änderung des Widerstands der Nährlösung auch die elektrochemische Doppelschicht an den Elektroden als zusätzliche Messgröße betrachtet. Eine elektrochemische Doppelschicht bildet sich an der Phasengrenze Nährmedium / Elektroden aus und ihre Eigenschaften werden von der Konzentration der Lösung und von der Beweglichkeit der Ionen bestimmt. Da infolge des Mikroorganismenwachstums sich die Ionenkonzentration in der Nährlösung ändert, erfolgt auch eine Änderung der Eigenschaften der elektrochemischen Doppelschicht, welche als zusätzliche Messgröße registriert wird. Damit bietet die Impedanz Splitting Methode zwei separat interpretierbare Messgrößen, die während einer Messung Rückschlüsse auf Bakteriendichte und deren Aktivitätszustand ermöglichen.

An dieser Stelle wird nochmals darauf hingewiesen, dass im Rahmen der gegenständlichen Arbeit eine Vergleichsuntersuchung unter Verwendung des Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 der Fa. Sy-Lab in Kombination mit dem Nährmedium BiMedia 165A zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser durchgeführt wurde. Beschreibung, Vorgangsweise und Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchung finden sich in den folgenden Kapiteln.

4. Material und Methoden

4.1 Probenentnahme und Aufbereitung

Für die vorliegende vergleichende Studie wurde Wasser aus verschiedensten Bereichen mikrobiologisch untersucht. Als Kriterium für die Auswahl diente die vermutete Belastung mit *E. coli* und coliformen Bakterien. Es wurde darauf geachtet, neben wenig oder nicht kontaminierten Wasser auch mutmaßlich stark belastetes Wasser zu untersuchen. Als Modellwasser für nicht bzw. wenig verunreinigten Wasser diente Trinkwasser aus dem öffentlichen Wiener Leitungsnetz bzw. Quellwasser der I. und II. Wiener Hochquellenwasserleitung. Für mutmaßlich stark kontaminiertes Wasser wurde sogenanntes Brauchwasser herangezogen. Eine Zusammenstellung der verwendeten Wasserproben findet sich in Kapitel 5.1.1 Tabelle 11. Da dieser Methodenvergleich auf die Eignung des Impedanzverfahrens für Trinkwasseruntersuchungen abzielt, nahmen die Trink- und Quellwasserproben den Hauptbestandteil der Proben ein.

Bei der Entnahme der Wasserproben wurde die in der Praxis übliche Vorgangsweise beachtet. So wurden jeweils Kaltwasserhähne ausgewählt, und nach Entfernung von eventuell vorhandenem Zubehör wie Gummischläuchen, Brausen und Ähnlichem erfolgte die Probennahme bei Fliesskonstanz nach einer Vorlaufzeit von mindestens einigen Minuten. Für die Untersuchung wurde das Probenwasser in hitzesterilisierte Glasflaschen mit einem Volumen von einem Liter abgefüllt, dicht verschlossen und anschließend gekühlt innerhalb von maximal zwei Stunden ins Labor gebracht und unmittelbar anschließend verarbeitet.

4.2 Membranfiltration nach EN ISO 9308-1 (2000)

Im Rahmen dieses Methodenvergleichs wurde als Referenz eine Membranfiltration nach EN ISO 9308-1 (2000) „Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien Teil 1: Membranfiltrationsverfahren“ durchgeführt. Dieser Teil der EN ISO 9308 (2000) legt ein Referenzverfahren für den Nachweis und die Zählung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Wasser für den menschlichen Gebrauch fest. Es ist auch jenes Analyseverfahren welches in der österreichischen Trinkwasserverordnung und in der Richtlinie 98/83/EG des Rates für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien spezifiziert ist (siehe Kapitel 3.2).

Zur Durchführung einer Trinkwasseruntersuchung steht laut gegenständlicher Norm der Standardtest und der optionale Schnelltest zur Verfügung. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde der Standardtest angewandt und wird in dem folgenden Kapitel 4.3 eingehend beschrieben.

Der Standardtest basiert auf einer Membranfiltration, einer anschließenden Subkultur auf einem Selektivagar und der Berechnung der Anzahl der gesuchten Organismen in der Probe. Das Verfahren benötigt aufgrund der drei Inkubationsschritte (Inkubation der Organismen der Trinkwasserprobe, Inkubation der typischen Kolonien auf einem nichtselektiven Agar zur Anlage von Subkulturen und der Inkubation zur Differenzierung) rund drei Tage für den Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien.

Das Verfahren ist besonders für desinfiziertes Wasser und andere Trinkwässer geeignet und erlaubt auch den Nachweis geschädigter Bakterien. Laut genannter Norm kann sich „aufgrund der geringen Selektivität Begleitwachstum störend auf die verlässliche Auszählung von coliformen Bakterien und *E. coli* auswirken, wie in einigen Trinkwässern,

z.B. aus Flachbrunnen, die nicht desinfiziert wurden und ein hohes Begleitwachstum zeigen“. Besonders ungünstig kann sich hierbei überschießende Begleitflora auswirken, da sie Einfluss auf das Wachstum der nachzuweisenden Bakterien nehmen kann und gegebenenfalls die Anlage von Reinkulturen verhindern. Auch Trübung bzw. Schwebstoffe können die Poren des Membranfilters verlegen und somit die Filtration deutlich beeinflussen, jedoch wird bezüglich des Anwendungsbereichs in der gegenständlichen Norm ausdrücklich darauf hingewiesen, dass der Standardtest „auch bei anderen Wässern angewandt werden kann, vorausgesetzt, dass suspendierte Stoffe oder Begleitflora die Filtration, die Kultur und das Zählen nicht stören“.

4.3 Wachstum auf Lactose-TTC-Agar nach EN ISO 9308-1 (2000) (Standardtest)

Der erste Schritt des Verfahrens besteht in einer Membranfiltration. Hierbei wird eine bestimmte Wassermenge der zu untersuchenden Probe – bei Trinkwasserproben in der Regel ein Volumen von 100 ml (siehe Kapitel 3.2) - durch einen Membranfilter mit definierten Eigenschaften filtriert. Die Filtration wurde unter Zuhilfenahme eines Edelstahl 3-fach Vakuumfiltrationsgerätes (Sartorius, Göttingen, Germany) durchgeführt, welches die gleichzeitige Filtration von drei Probenansätzen ermöglicht. An der Vakuumfiltriereinheit war zur Beschleunigung des Filtrationsvorgangs eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen.

Vor Beginn bzw. zwischen dem Ansatz neuer Proben wurden alle Teile des Gerätes, die mit dem Filter und mit der Probe vor der Filtration in Berührung kommen, mittels Flammlung hitzesterilisiert. Nach einer entsprechenden Abkühlzeit wurden die Membranen mit einer an den Enden abgerundeten und sterilen Pinzette auf die Auflageflächen des Vakuumfiltrationsgerätes aufgebracht und die Trichter zum Einfüllen der Probe aufgesetzt und mittels Spange eingerastet. Durch das Festspannen des Trichters an der Auflagefläche kommt die flexible Dichtungslippe des Trichters auf dem Rand des Membranfilters zu liegen, wodurch Dichtheit hergestellt wird. Anschließend wurde die Probe bis zur entsprechenden 100 ml Markierung des Trichters eingefüllt und durch Öffnen des Absperrhahns und Inbetriebnahme der Wasserstrahlpumpe die Filtration gestartet.

Es wurden Membranfilter von Sartorius (Cellulosefilter) mit einem Durchmesser von 50 mm verwendet, die in Einklang mit der EN ISO 9308-1 (2000) aus Zelluloseestern vorzugsweise mit aufgedruckten Gittern zur Erleichterung der Zählung bestehen und Filtrationscharakteristiken entsprechend einem mittleren nominalen Porendurchmesser von 0,45 µm aufweisen. Die Filter (und die Drucktinte) sind frei von wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Eigenschaften, damit sie keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien nehmen, und sind steril abgepackt verfügbar. Mittels dieser Membranfilter werden die in der Probe enthaltenen Bakterien zurückgehalten.

Nachdem das Volumen von 100 ml der Probe vollständig filtriert wurde, wurden die Trichter abgenommen und die Filter vorsichtig mit einer abgerundeten, sterilen Pinzette auf das entsprechende Nährmedium (siehe Tabelle 8) aufgebracht. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass zwischen dem Nährboden und der Membran keine Luftblasen eingeschlossen wurden, um die Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen zu gewährleisten.

Die Ingredienzien der Nährlösung ermöglichen den Metabolismus der Organismen. Zur Verfestigung der Nährlösung wird 1 – 2 % Agar, ein aus Meeresalgen gewonnenes stark vernetztes, komplexes Polysaccharid, der Nährlösung zugesetzt, welches der wässrigen Lösung eine geleeartige Konsistenz verleiht. Agar wird von der überwiegenden Zahl der

Mikroorganismen nicht angegriffen (SCHLEGEL, 1985). Der Agar und die Nährbestandteile werden durch Erhitzen bei ca. 100°C in Wasser gelöst, beim Abkühlen jedoch bleibt die Agar - Nährlösung aufgrund der physikalischen Eigenschaft des Agars bis zu einer Temperatur von 45°C flüssig und somit gießfähig. Die Nährlösung wird nun in Petrischalen gegossen, wo sie nach weiterer Abkühlung zur Raumtemperatur zu einem Gel erstarrt. Auf dem festen Nährmedium können unter entsprechenden Bedingungen einzelne Keime isoliert voneinander zur Entwicklung gebracht werden. Im vorliegenden Fall kam ein Lactose-TTC-Agar mit Tergitol®7 der Firma Merck zur Anwendung. Die Bestandteile dieses kommerziellen Produktes sind in der nachfolgend Tabelle 8 ersichtlich.

Bestandteil	Anteil
Lactose	20 g/l
Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	6 g/l
Fleischextrakt	5 g/l
Bromthymolblau	0,05 g/l
Tergitol®7	0,1 g/l
Agar	12,1 g/l
Additiv	
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	0,025 g/l
Destilliertes Wasser	1000 ml

Tabelle 8: Bestandteile des Laktose-TTC-Agar

Die Selektivität dieses Mediums bewirken die Bestandteile Natriumheptadecylsulfat (Tergitol®7) und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), welche die meisten grampositiven Bakterien hemmen. TTC trägt auch zur Differenzierung der Bakterien bei (siehe Kapitel 4.3.2) (MERCK Herstellerangabe, 2008).

Diese Bestandteile wurden spätestens am Vortag der Probennahme in deionisierten Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die Nährlösung in einem Wasserbad GFL langsam auf 45-50°C abgekühlt und das Additiv TTC wurde in einer Menge von 0,025 g/l der Nährlösung zugegeben. Hierfür wurde eine 0,05 % wässrige Lösung TTC verwendet, welche mittels Sartorius Minisart Filtern mit 0,20 µm Porendurchmesser sterilfiltriert wurde (Spritzenvorsatzfilter). Die nun fertige Nährlösung wurde zur Homogenisierung geschwenkt und in Petrischalen gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Agarschicht eine Höhe von rd. 5 mm in den Petrischalen aufweist. An den Tagen der Probennahmen standen die klaren und grünen Nährböden unmittelbar bereit, und die Filter konnten nach der Vakuumfiltration blasenfrei aufgebracht werden.

4.3.1 Anzucht von Trinkwasserbakterien

Die Nährstoffe des selektiven Lactose-Agar-Medium diffundieren durch die Membran und ermöglichen das Wachstum der Bakterien bzw. die Bildung von Bakterienkolonien. Dieser Vorgang findet bei einer bestimmten Temperatur statt, die an die Zielorganismen angepasst ist, und für Nichtzielorganismen mitunter wachstumshemmend ist. Nach EN ISO 9308-1 (2000) ist dieser Temperaturbereich mit $36 \pm 2^\circ\text{C}$ definiert. Die Inkubationszeit ist mit 21 ± 3 Stunden festgelegt.

4.3.2 Visuelle Auswertung

Nach der Inkubation werden die Proben visuell geprüft. Hierbei werden alle typischen Kolonien, die eine gelbe Farbentwicklung zeigen, ungeachtet ihrer Größe, auf bzw. unter der Membran im Medium als Laktose-positive Bakterien gezählt.

Die Säurebildung während der Laktosedegradation wird durch den pH-Indikator Bromthymolblau angezeigt, welcher sich durch Änderung der Farbe des Mediums unter der Membran in gelb bemerkbar macht. Ein weiterer Teil des Differenzierungssystems ist der Bestandteil TTC. Laktose-negative Bakterien bilden beim Abbau von TTC dunkelrote Kolonien. Die laktose-positiven *E. coli* und coliforme Bakterien hingegen reduzieren TTC schwächer und bilden daher gelbe bis gelb-orange Kolonien (MERCK Herstellerangabe, 2008).

4.3.3 Anzucht von Reinkulturen

Zur Bestätigung und Differenzierung von *E. coli* und coliformen Bakterien wird in der EN ISO 9308-1 (2000) empfohlen, möglichst von allen oder von einer repräsentativen Anzahl der typischen Kolonien Subkulturen anzulegen, um im Anschluss einen Oxidase- und Indoltest durchzuführen.

Entsprechend EN ISO 9308-1 (2000) wurden für den Bestätigungstest eine repräsentative Zahl der Kolonien unter dem Holten Laminar Air HBB 2448 mit einer sterilen Öse abgeimpft und auf einem nicht-selektiven Hefe-Agar aufgebracht. Aus einer abgeimpften Kolonie entwickelt sich unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen eine Reinkultur in einer für die eindeutige Bestätigung der Bakterien der ursprünglichen Kolonie ausreichenden Menge. Der nicht-selektive Agar wurde 21 ± 3 h bei einer Temperatur von $36 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert.

4.3.4 Bestätigung und Differenzierung

EN ISO 9308-1(2000)

Zur Bestätigung und Differenzierung von *E. coli* und coliformen Bakterien ist nach EN ISO 9308-1 (2000) ein Oxidase- und Indoltest durchzuführen. Zu diesem Zweck werden zwei bis drei Tropfen Oxidase-Reagenz auf ein Filterpapier gegeben und ein Teil der Reinkultur darauf verstrichen. Eine positive Oxidase-Reaktion zeigt sich durch das Erscheinen einer dunkelblauen Farbe innerhalb von 30 Sekunden. Alle Kolonien mit einer negativen farblosen Oxidase-Reaktion sind als coliforme Bakterien bestätigt und zu zählen. Zur Differenzierung wird eine Subkultur in Tryptophan-Bouillon bei $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 21 ± 3 Stunden

inkubiert und durch Hinzufügen von 0,2 ml bis 0,3 ml Kovacs' Reagenz auf Indolbildung untersucht. Die Entwicklung einer kirschroten Farbe an der Oberfläche der Bouillon bestätigt die Bildung von Indol. Alle Kolonien mit einer negativen Oxidase-Reaktion und einem positivem Indol-Test sind als *E. coli* nachgewiesen und zu zählen.

Testsystem Api 20 E

In Abweichung zur EN ISO 9308-1 (2000) wurde anstatt des beschriebenen Oxidase- und Indoltests die Bestätigung alternativ mit dem Testsystem Api 20 E der Firma bioMérieux durchgeführt. Dieser Test dient der Identifizierung von Enterobakteriaceae und wird in der mikrobiologischen Routinediagnostik aufgrund der hohen Qualität und der einfachen Handhabung vielfach verwendet.

Das Testsystem Api 20 E besteht aus einem Streifen mit 20 Mikroröhrchen, in denen sich verschiedene Substrate in dehydratisierter Form befinden (vgl. entsprechende Abbildungen in Kapitel 5.1.2). Die Röhrchen wurden mittels einer sterilen Pipette mit einer Suspension der zu untersuchenden Reinkultur beimpft. Hierdurch lösen sich die Substrate und es werden gleichsam 20 Tests auf Vergärung und andere biochemische Merkmale einer Bakterienkolonie auf einem Streifen durchgeführt. Die Vorbereitung des Streifens und des Inokulums sowie die Beimpfung des Streifens wurden entsprechend den Angaben des Herstellers vorgenommen.

Nach der Inkubation von 18 - 24 h bei 35 – 37 °C können die biochemischen Reaktionen anhand von Farbumschlägen abgelesen werden, die entweder spontan, während der Inkubation oder nach Zugabe der entsprechenden Reagenzien entstehen. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte mit dem Analytischen-Profil-Index, der alle Reaktionen eines Teststreifens in einen dem vorliegenden Bakterium entsprechenden 7-stelligen numerischen Code umwandelt.

4.4 Impedanzmessung mit Bac Trac 4100

Als Alternativmethode wurde das Meßsystem Bac Trac 4100, eine Entwicklung der Firma Sy-Lab mit Sitz in Purkersdorf, in Kombination mit dem Nährmedium BiMedia 165A (siehe Kapitel 4.4.1) auf seine Eignung zur Bestimmung von *E.coli* und coliformer Bakterien in Trinkwasser untersucht. Dieses Verfahren basiert auf dem in Kapitel 3.4.4.2 beschriebenen Prinzip der Impedanzmessung.

Die Grundfiguration des weitgehend automatisierten Meßsystems Bac Trac 4100 besteht aus einem Inkubator, den Messzellen, der Mess- und Auswertesoftware kombiniert mit einem herkömmlichen Personal Computer zur Bedienung, Steuerung und Speicherung. Ein Bildschirm und gegebenenfalls ein Drucker dienen der Darstellung und Ausgabe der Messergebnisse.

Der Inkubator beinhaltet eine mikroprozessorgesteuerte Messelektronik, eine Thermostateinrichtung, sowie 40 Messplätze zur Aufnahme der Messzellen. Der Thermostat regelt die Temperatur im Metallinkubatorblock und ist in einem Temperaturbereich von 0°C – 65°C in 0,1°C Schritten einstellbar. Die Messplätze, in die die Messzellen einrasten, sind mit zwei Führungsstiften sowie vier Elektrodenanschlusskontakten ausgestattet und werden durch zwei aufklappbare Kunststoffdeckel gegen Verschmutzung und Wärmeverlust geschützt.

Die Standardmesszelle, die in Kapitel 3.4.4.2 in der Abbildung 6 als Teilbild enthalten ist, hat ein Füllvolumen von 10 ml und besteht prinzipiell aus den drei Teilen Elektrodenstopfen, Messrohr und Schraubverschluss. Der Elektrodenstopfen aus Kunststoff enthält vier eingepresste Elektrodenstifte und ist an der Stopfenunterseite mit

zwei Bohrungen für die Führungsstifte des Messplatzes versehen. Der Kunststoffschraubverschluss ist nicht dichtend, sodass die Messzelle durch eine eventuelle Gasentwicklung keinen Schaden nehmen kann. Alle Teile bzw. Materialien der Messzelle können 15 - 20 Minuten lang bei 121°C autoklaviert werden. Da die Materialien der Messzelle Autoklaviervorgängen widerstehen, lassen sich die Messzellen mehrmals sterilisieren und minimieren durch ihre Wiederverwendbarkeit den Verbrauch, die Entsorgung und damit die Kosten eines Labors.

Die Software dient der Einstellung und automatischen Steuerung des Messvorganges. Weiters dient sie der Messwertbildung und ermöglicht das Auswerten und Bearbeiten der Daten am Computer.

Die folgende Abbildung 7 zeigt eine Bac Trac-Messeinheit. Es handelt sich hierbei um das Nachfolgegerät des oben beschriebenen Bac Trac 4100, den Bac Trac 4300, der sich im wesentlichen durch das Design, die Anzahl der Messplätze und der Möglichkeit zwei unterschiedliche Temperaturbereiche im Inkubatorblock herzustellen unterscheidet, aber ansonsten auf dem gleichen Analyseprinzip beruht.



Abbildung 7: Bac Trac Messeinheit; Sy-Lab, Purkersdorf, Austria

Das Messsystem Bac Trac 4100 ermöglicht während des Mikroorganismenwachstums gleichzeitig die Bestimmung der Veränderung zweier elektrischer Kenngrößen (Impedanz Splitting Methode):

- die Veränderung der Impedanz Z_M des Nährmediums – bezeichnet als M-Wert
- die Veränderung der Elektrodenimpedanz Z_E – bezeichnet als E-Wert

Die Signaltrennung in M- und E-Wert der Impedanz Splitting Methode ermöglicht die Messung zweier separat interpretierbarer Größen, aus denen sich Rückschlüsse auf Bakteriendichte und deren Aktivitätszustand ableiten lassen.

Beim Messsystem Bac Trac 4100 werden relative Größen der Impedanz ermittelt.

Der M-Wert bedeutet die relative Abnahme der Medienimpedanz bezogen auf den Anfangswert. Dieser relative Wert wird aus den gemessenen Werten mit Hilfe der nachstehenden Formel berechnet:

$$M[\%] = \frac{Z_{M(t=0)} - Z_{M(t)}}{Z_{M(t=0)}} * 100$$

mit

- M relative Medienimpedanz in Prozent [%]
- $Z_{M(t=0)}$ Impedanz des Nährmediums zum Zeitpunkt $t = 0$ in Ohm [Ω]
- $Z_{M(t)}$ Impedanz des Nährmediums zum Zeitpunkt t in Ohm [Ω]

Der E-Wert bedeutet die relative Abnahme der Elektrodenimpedanz bezogen auf den Ausgangswert. Dieser relative Wert wird analog dem M-Wert mit nachstehender Formel berechnet.

$$E[\%] = \frac{Z_{E(t=0)} - Z_{E(t)}}{Z_{E(t=0)}} * 100$$

mit

- E relative Elektrodenimpedanz in Prozent [%]
- $Z_{E(t=0)}$ Elektrodenimpedanz zum Zeitpunkt $t = 0$ in Ohm [Ω]
- $Z_{E(t)}$ Elektrodenimpedanz zum Zeitpunkt t in Ohm [Ω]

Im Rahmen des Impulsprogramm Wasser zeigte sich, dass der E-Wert im speziellen Fall der Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien nur geringe Aussagekraft besitzt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung das Hauptaugenmerk auf die Medienimpedanz (M-Wert) gelegt. Die Elektrodenimpedanz (E-Wert) wird hier in dieser Arbeit der Vollständigkeit wegen erwähnt. Sie ergibt sich durch die Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht an der Phasengrenze Metall/Flüssigkeit. Die Änderung der elektrischen Eigenschaften dieser Ionenschichten an den Elektroden – bedingt durch die Änderung der Ionenkonzentration in der Nährlösung – wird bei der Messung des elektrischen Widerstands der Flüssigkeit von dem Messsystem Bac Trac miterfasst (siehe Kapitel 3.4.4.2).

Während einer Untersuchung misst die mikroprozessorgesteuerte Messelektronik in definierten Zeitintervallen den Widerstand und die relativen Impedanzabnahmen werden errechnet.

Die grafische Darstellung der Impedanzwerteabnahmen in Abhängigkeit von der Zeit wird als Kurven dargestellt. Die Kurvenverläufe sind in der Regel jenen biologischer Wachstumskurven – mit allen charakteristischen Wachstumsphasen, wie lag-Phase, exponentielle Wachstumsphase, und stationäre Phase – sehr ähnlich, obwohl es sich um "elektrische Wachstumskurven" handelt, und diese nicht ident mit der Lebendzellzahl sind (Gerätehandbuch Bac Trac 4100, 1994). Durch die Verwendung relativer Größen ergeben sich für alle Untersuchungen immer der selbe Ausgangswert, nämlich 0%

Impedanzabnahme zum Zeitpunkt $t=0$. Das ermöglicht das Vergleichen von Kurvenverläufen beliebiger Proben.

Die Abbildung 8 gibt ein Beispiel für die grafische Darstellung einer Bac Trac – Messung. Die beschriebene Ähnlichkeit der Kurvenverläufe der relativen Impedanzabnahme mit biologischen Wachstumskurven ist augenscheinlich. Für Erläuterungen der eingetragenen Parameter Reaktionszeit und Schwellenwert wird an dieser Stelle auf das Kapitel 4.4.2 verwiesen.

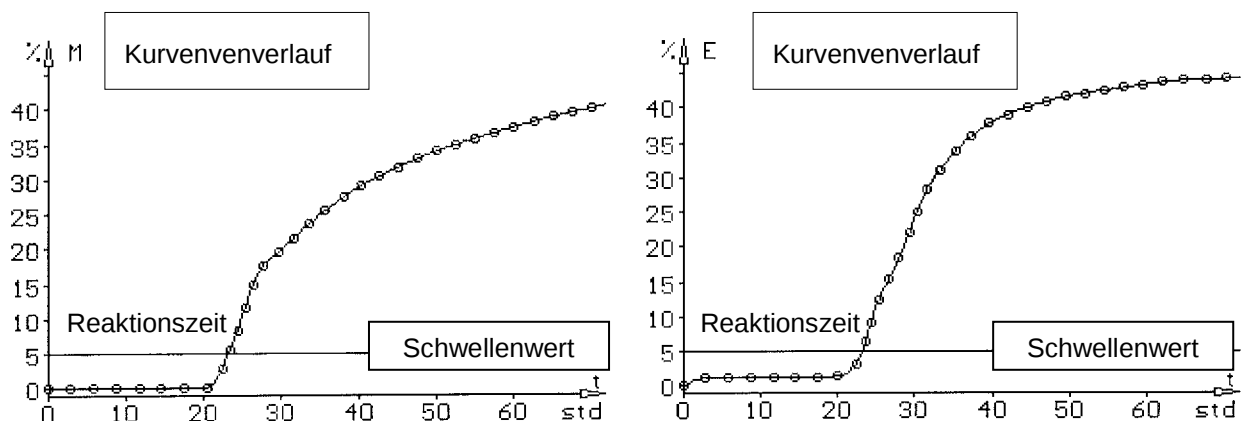


Abbildung 8: Beispiel einer BacTrac – Messung; Kurvenverlauf, Reaktionszeit und Schwellenwert

4.4.1 Anzucht von Trinkwasserbakterien

Ebenfalls wie bei der in Kapitel 4.2 beschriebenen Membranfiltertechnik wurden 100 ml der zu untersuchenden Probe filtriert, und die Filter (siehe Kapitel 4.2) mit einer abgerundeten, sterilen Pinzette in die zuvor autoklavierten Messzellen eingebracht. Grundsätzlich könnte man die Probe direkt in die Messzelle pipettieren, doch erfordert dies die Verwendung von speziellen Messzellen, die auf ein entsprechendes Volumen und Konzentrat der Nährlösung ausgelegt sind. Anschließend wurde mit einer sterilen Pipette 10 ml der Nährlösung in die Messzellen gefüllt. Zur Anwendung kam ein selektives Nährmedium für coliforme Bakterien, das die Bezeichnung BiMedia 165A trägt. Die nachfolgende Tabelle 9 zeigt die Rezeptur des verwendeten Nährmedium BiMedia 165A.

Bestandteil		Anteil
Proteose Pepton	Oxoid L85	10 g/l
Hefeextrakt	Merck 3753	6 g/l
Lactose	Merck 7657	20 g/l
Gallesalze Nr. 3	Oxoid L56	1 g/l
Bromkresolpurpur	Merck 3025	0,035 g/l
L-Tryptophan	Sigma T-0254	1 g/l
Tergitol-7	Sigma NP-7	0,1 g/l

Tabelle 9: Rezeptur von Bi Media 165A (Fa. Sy-Lab)

Das Impedanzmedium BiMedia 165A wird von der Firma Sy-Lab in 500 g Packungen zur Verfügung gestellt. Die Bestandteile des Nährmediums wurden in deionisierten Wasser gelöst und durch Autoklavierung sterilisiert.

Die verschlossenen Messzellen wurden in die Messplätze im Inkubatorblock eingerastet, und nach der Probenidentifikation setzt der automatische Mess- und Auswertevorgang ein (siehe Kapitel 4.4.2). Bei jeder Untersuchung war ein Messplatz für die sogenannte Blindprobe (blank) vorgesehen, um sicherzustellen, dass das Nährmedium frei von mikrobiologischen Kontaminationen und von einwandfreier Qualität ist.

Im Thermoblock des Messsystem Bac Trac 4100 war während den Untersuchungen eine Temperatur von 37°C eingestellt.

4.4.2 Messung mit Bac Trac 4100

Alle 20 Minuten wird automatisch der elektrische Widerstand der Nährlösung gemessen. Die relative Abnahme der Medienimpedanz wird nach in Kapitel 4.4 angegebenen Formel berechnet und in Form des M-Wertes ausgedrückt. Durch Übertragen der M-Werte auf die Zeitachse gelangt man zur graphischen Darstellung des Messvorganges. Aus ihrer charakteristischen Form - wie in Kapitel 4.4 beschrieben – lassen sich Aussagen über Bakteriendichte und Aktivitätszustand ableiten.

Es besteht die Möglichkeit mittels der Software einen beliebigen M-Wert als Schwellenwert festzusetzen. Durch die Festlegung eines Schwellenwertes wird der Grad der Kontamination definiert. Die Zeitspanne zwischen Untersuchungsbeginn und Erreichen bzw. Überschreiten des Schwellenwerts ergibt die Reaktionszeit, die von der Belastung der Probe abhängig ist (vergleiche Abbildung 8: Beispiel einer BacTrac – Messung; Kurvenverlauf, Reaktionszeit und Schwellenwert in Kapitel 4.4). Dieses Schwellenwertprinzip ermöglicht mikrobiologische Kontaminationen in Abhängigkeit der Reaktionszeit schon frühzeitig zu registrieren. Im Rahmen des Trinkwassermonitorings stellt die Möglichkeit der Kopplung des Messsystems mit modernen Kommunikationstechniken wie z.B. E-Mail oder SMS einen interessanten Aspekt dar, da auf vorliegende Kontaminationen durch entsprechende Alarmierung rasch reagiert werden kann.

Im Falle dieses Methodenvergleichs war der Schwellenwert für den M-Wert mit 3 % festgelegt, und die gesamte Messdauer im Falle von unbelasteten Proben betrug zur Vergleichbarkeit ebenfalls 21 +/-3 h.

4.5 Begriffsdefinitionen laut ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN ISO 16140, (2000) (Entwurf)

Die Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der zum Zeitpunkt der Untersuchung gültigen ISO/DIS 16140 (1999) "Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln Arbeitsvorschriften für die Validierung alternativer Verfahren". Diese Norm legt das allgemeine Prinzip und die technischen Arbeitsvorschriften für die Validierung alternativer Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Analyse von Lebens- und Futtermitteln und damit zusammenhängender Gebiete fest. Sie kann sowohl für die Validierung alternativer Verfahren, die für offizielle Kontrolluntersuchungen verwendet werden, als auch für die

internationale Anerkennung der durch das alternative Verfahren ermittelten Ergebnisse angewandt werden.

Die Arbeitsvorschriften für die Validierung umfassen eine Verfahrensvergleichsuntersuchung und einen Ringversuch mit beiden Analyseverfahren. Weiters werden qualitative und quantitative Verfahren unterschieden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die Arbeitsvorschriften dieser Norm auf eine Verfahrensvergleichsuntersuchung für qualitative Verfahren angewandt.

Folgende Definitionen gelten für die Anwendung dieser Norm (Auszug aus ISO/DIS 16140 (1999)):

- Als Referenzverfahren ist ein international anerkanntes und in breitem Maße angenommenes Verfahren zu verwenden. Das bedeutet ein ISO- und CEN-Verfahren und bestimmte nationale Normen gleichen Ansehens.
- Ein alternatives Verfahren ist ein Analyseverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen zu analysierenden Stoff nachweist oder quantitativ schätzt, der mittels des entsprechenden Referenzverfahrens bestimmt wird. Das Verfahren kann patentiert oder nichtkommerziell sein, und es muss nicht einen gesamten Analyseablauf umfassen, das heißt von der Probenvorbereitung bis zum Untersuchungsbericht. Das alternative Verfahren weist Merkmale auf, die den Erfordernissen des Anwenders angemessen sind. Diese umfassen zum Beispiel Anforderungen an Schnelligkeit der Analyse und/oder der Reaktion, an Einfachheit der Durchführung und/oder der Automatisierung, an Eigenschaften der Analyse in Hinblick auf Präzision, Genauigkeit,..., an Miniaturisierung und an Kostenverringerung. Die Verwendung des Begriffes "alternativ" bezieht sich auf das gesamte "System von Prüfverfahren und Reaktion" und schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind, ein.
- Die Validierung eines alternativen Verfahrens ist der Nachweis, dass ein ausreichender Vertrauensnachweis dafür geliefert wird, dass die durch das alternative Verfahren erzielten Ergebnisse den durch Anwendung des Referenzverfahrens gewonnenen vergleichbar sind. Das Wort "vergleichbar" ist durch eine technische Arbeitsvorschrift definiert.
- Der zu analysierende Stoff ist der durch das Analyseverfahren bestimmte Bestandteil. Er kann der Mikroorganismus selbst sein, seine Bestandteile oder die von ihm ausgehenden Produkte.
- Ein qualitatives Verfahren ist ein Analyseverfahren, das die Reaktion des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins des zu analysierenden Stoffes ergibt. Dieser wird in einer bestimmten Probenmenge entweder direkt oder indirekt nachgewiesen.
- Eine Verfahrensvergleichsuntersuchung ist die durch das mit der Organisation beauftragte Laboratorium durchgeführte Untersuchung des alternativen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren.

Die nachstehende Tabelle 10 enthält für die Anwendung dieser Norm geltende Definitionen, die für die statistische Auswertung und Interpretation einer Verfahrensvergleichsuntersuchung eines qualitativen Verfahrens relevant sind (siehe Kapitel 5.1.2 und 5.1.3).

Abkürzung	Bezeichnung, ggf. Definition
PA:	Positive Übereinstimmung (positive accordance) Eine positive Übereinstimmung liegt vor, wenn sowohl das alternative Verfahren als auch das Referenzverfahren ein Positivergebnis erbringt.
NA:	Negative Übereinstimmung (negative accordance) Eine negative Übereinstimmung liegt vor, wenn sowohl das alternative Verfahren als auch das Referenzverfahren ein Negativergebnis erbringt.
ND:	Negativabweichung (negative deviation) Das alternative Verfahren zeigt eine Negativabweichung, wenn es ein Negativergebnis erbringt, während das Referenzverfahren ein Positivergebnis erbringt.
PD:	Positivabweichung (positive deviation) Das alternative Verfahren zeigt eine Positivabweichung, wenn es ein Positivergebnis erbringt, während das Referenzverfahren ein Negativergebnis erbringt.
N:	Gesamtanzahl der Proben ($NA + PA + PD + ND$)
AC:	Relative Genauigkeit (accuracy) Die relative Genauigkeit ist als der Grad der Übereinstimmung zwischen der durch das Referenzverfahren erzielten Antwortreaktion und der durch das alternative Verfahren erzielten Antwortreaktion bei identischen Proben definiert.
N+:	Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Referenzverfahren ($PA + ND$)
SE:	Relative Empfindlichkeit (sensitivity) Die relative Empfindlichkeit ist die Eignung des alternativen Verfahrens, den zu analysierenden Stoff nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird.
N-:	Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Referenzverfahren ($NA + PD$)
SP:	Relative Spezifität für die nachgewiesene Spezies Die relative Spezifität ist die Eignung des alternativen Verfahrens, den zu analysierenden Stoff nicht nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nicht nachgewiesen wird.

Tabelle 10: Begriffsdefinitionen laut ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN ISO 16140 (2000)

4.6 Anreicherungsversuch

Unabhängig von der oben beschriebenen Verfahrensvergleichsuntersuchung wurden Versuche zur Anreicherung des Keimmaterials (*E. coli* und coliforme Bakterien) aus Quellwasser der I Wiener Hochquellwasserleitung durchgeführt. Diese Versuche zielten

darauf ab, die gewünschte Reaktionszeitverkürzung der Impedanzmessung infolge der Filtration größerer Wassermengen - und damit vermutlich auch höhere Bakterienzahl - abzuschätzen. Weiters sollten Rückschlüsse für die praktische Anwendbarkeit der verschiedenen verwendeten Filtrationsverfahren gewonnen werden.

Es wurden drei unterschiedliche Filtrationseinheiten – Vakuumfiltriereinheit, Druckfiltriereinheit und Capsule - zur Anreicherung der Volumina 1 000 ml (=1l), 10 000 ml (=10l), und 100 000 ml (=100l) getestet und bezüglich Anwendbarkeit, Arbeitsaufwand und Praxistauglichkeit miteinander verglichen. Der Grund für die Anwendung unterschiedlicher Filtriereinheiten ist methodisch bedingt. Mit der Vakuumfiltriereinheit lassen sich nur Volumina bis 10 Liter innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens filtrieren. Es wurde daher als Interpretationsbrücke die Anreicherung des Volumens von 10 Liter mit allen drei Filtrationseinheiten durchgeführt.

Die Impedanzmessung nach der Vakuum- bzw. Druckfiltration wurde wie mit dem in Kapitel 4.4 beschriebenen Messsystem Bac Trac 4100 und dem Impedanzmedium BiMedia 165A für *E. coli* und coliforme Bakterien durchgeführt. Bei der Filtrationseinheit Capsule ist der Filter hingegen fix eingebaut, und bedingt dadurch eine modifizierte Vorgehensweise bei der Inkubation (siehe Kapitel 4.6.3). Weiters wurde eine 100 ml Probe zur Bestimmung der Belastung der Probe mit *E. coli* und coliformen Bakterien nach dem Standardverfahren (EN ISO 9308-1 (2000)) ausgewertet (siehe Kapitel 4.3).

4.6.1 Filtration mit Vakuumfiltrationseinheit

Die Anreicherung der Wasserproben bis zu einem Volumen von maximal 10 Liter wurde unter Verwendung eines Edelstahl 3-fach Vakuumfiltrationsgerätes (Sartorius, Göttingen, Germany) durchgeführt (siehe Kapitel 4.3). Für die Anreicherung wurden größere Aufsatztrichter verwendet. Die Leistung der angeschlossenen Wasserstrahlpumpe ist geringer als der bei den beiden anderen Anreicherungsverfahren angewandte Druck, sodass diese Methode nur auf kleinere Volumen innerhalb eines vertretbaren Zeitrahmens anwendbar ist.

Da die im Rahmen der Anreicherungsversuche ebenfalls getesteten Capsulen mit einem Filter mit einem mittleren Porendurchmesser von 0,2 µm ausgestattet sind, wurde zur Vergleichbarkeit die Vakuumfiltration ebenfalls mit Filtern dieser Porengröße durchgeführt. Verwendet wurde ein Produkt, Cellulosefilter mit mittlerem nominalem Porendurchmesser von 0,2 µm, der Firma Sartorius.

Nach der Filtration der entsprechenden Volumina (1000 ml, 10 000 ml) wurden die Filter in die vorbereiteten Messzellen eingebracht und der Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 (siehe Kapitel 4.4) zugeführt. Dabei war der Inkubator des Bac Tracs auf eine Bebrütungstemperatur von 37°C eingestellt.

Weiters wurde als Referenz zusätzliche 100 ml der Quellwasserprobe bereit, die nach dem Standardverfahren nach EN ISO 9308–1 (2000) untersucht wurden. Entsprechend dieser Norm wurden die in Kapitel 4.3 beschriebenen Filter von Sartorius verwendet, die eine Filtrationscharakteristik entsprechend einem mittleren nominalen Porendurchmesser von 0,45 µm aufweisen.

4.6.2 Filtration mit Druckfiltrationseinheit

Die Anreicherung der Quellwasserproben zu einem Volumen von 10 und 100 Liter wurde unter Verwendung der Druckfiltriereinheit SM 16263/67 (Sartorius 16263/67, Göttingen Germany) durchgeführt. Dieses Gerät besteht aus der Filterauflagefläche mit drei Stehern

und dem Abflussanschluss, dem aufsetzbaren Zylinder mit dem Zuflussanschluss und dem Dichtungsring dazwischen. Mittels dreier Schrauben werden die Auflagefläche und der Zylinder durch entsprechendes Anziehen aneinandergepresst, wodurch sich in Verbindung mit der Dichtung die Dichtheit ergibt.

Vor der Filtration wurden die sterilen Filter der Firma Schleicher & Schuell mit einem Durchmesser von 100 mm und einer mittleren nominalen Porenweite von 0,2 µm auf die Auflagefläche steril aufgebracht, der Zylinder aufgesetzt und die Schrauben festgezogen. Zuleitung und Druckzylinder wurden vor der Filtration sterilisiert. Die filtrierte Wassermenge konnte mit einem in der Abflussleitung eingeschalteten Wasserzähler geprüft und gemessen werden. Die Abbildung 9 zeigt die Druckfiltriereinheit SM 16263/67 sowie die Versuchsanordnung bei der Beprobung im Wasserwerk.



Abbildung 9: Probennahme mittels Druckfiltrationseinheit SM 16263/67 im Wasserwerk

Nach Abschluss der Filtration der entsprechenden Wassermengen wurde der Filter der Druckfiltriereinheit entnommen und mit einer sterilen Pinzette in die vorbereiteten Messzellen für die Impedanzmessung eingebracht. Die Inkubationstemperatur während der Impedanzmessung betrug 37°C.

4.6.3 Druckfiltration mit Capsulen

Zur Prüfung von Alternativen wurden Anreicherungen von Quellwasser auf ein Volumen von 10 bzw. 100 Liter auch mittels SpiralCap® PF Capsule mit Supor® Membrane der Firma Pall Gelman Laboratory durchgeführt. Das Polypropylengehäuse dieser Capsule ist mittels Gammastrahlung sterilisiert und ist einzeln verpackt erhältlich.

Das Kunststoffgehäuse der Capsule enthält zwei Filterschichten mit einer effektiven Filterfläche von 250 cm². Dieser Membranaufbau ermöglicht hohe Fließgeschwindigkeiten und eine hohe Durchflussleistung. Die beiden Filterschichten aus hydrophilen Polyethersulfon bestehen aus einem Vorfilter mit einer Porengröße von 0,8 µm und einem Feinfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm. Der Vorfilter entfernt eventuell vorhandene Schwebstoffe, während der Feinfilter die Bakterien zurückhält. Die

verwendeten Capsulen halten einem maximalen Wasserdruck von 4,1 bar bei Raumtemperatur stand.

Die Abbildung 10 zeigt eine Capsule bei der Beprobung im Wasserwerk. Auch hier befand sich ein Wasserzähler zur Kontrolle und Messung in der Abflussleitung. In der Abbildung 11 ist die Capsule nach der Beprobung zu sehen. Der ursprünglich weiße Vorfilter hat sich gelblich verfärbt. Die Abbildung 12 ist eine Aufnahme der Capsule vor der Inkubation. Die Capsule ist mit der Nährlösung befüllt, und die Elektrodenverlängerung der Spezialmesszelle wurde bereits angeschlossen.



Abbildung 10: Filtration mittels Capsule im Wasserwerk



Abbildung 11: Capsule nach der Filtration; Färbung des Vorfilters



Abbildung 12: Capsule befüllt mit Nährlösung (BiMedia 165A)

Im Unterschied zur herkömmlichen Impedanzmessung, bei der die Inkubation der Probe mittels Messzellen im Thermoblock des Bac Tracs erfolgt, muss bei Anwendung von Capsulen anders vorgegangen werden. Da die Filter der Capsulen nicht entnommen werden können, wird die Capsule selbst mit der entsprechenden Nährlösung befüllt (siehe Abbildung 12) und anschließend in einem separaten Brutschrank inkubiert. Die Verbindung zwischen der Nährlösung in der bebrüteten Capsule und dem Messplatz im Bac Trac wird durch eine Spezialmesszelle mit einem angeschlossenen Kabel hergestellt. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um eine Verlängerung der Elektroden bis in die Capsule.

Die Inkubation der Capsule in Kombination mit der Spezialmesszelle erfolgte aufgrund räumlicher Gegebenheiten im Labor der Firma Sy-Lab. Der Inkubator zur Bebrütung der Capsule war dabei auf eine Temperatur von 37°C eingestellt. Die Impedanzmessung wurde auf dem Nachfolgermodell des Bac Trac 4100 dem Bac Trac 4300 durchgeführt, der wie in Kapitel 4.4 erwähnt auf dem gleichen Analyseprinzip beruht wie der bei den anderen Messungen verwendeten Bac Trac 4100.

In Abbildung 13 ist die beschriebene Anordnung des Systems bei der Inkubation ersichtlich. Die Abbildung 14 ist eine Detailaufnahme und zeigt die Spezialmesszelle im Messplatz 1 des Thermoblockes des Bac Tracs.



Abbildung 13: Brutschrank, und Impedanzmessgerät
Verbindungskabel



Abbildung 14: Modifizierte Messzelle im Thermoblock des Impedanzmessgerätes mit Verbindungskabel zum Brutschrank

5. Ergebnisse

5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999)

5.1.1 Projektdurchführung

Im Rahmen des vorliegenden Methodenvergleichs wurden in dem Zeitraum vom 21.01.2002 bis 01.04.2002 insgesamt 490 Wasserproben jeweils mit dem herkömmlichen Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000) und dem spezifischen Impedanzverfahren mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem Coliformenmedium BiMedia 165A auf die An- bzw. Abwesenheit von *E. coli* und coliformen Bakterien untersucht.

In dem angegebenen Zeitraum fanden die Probennahmen an jedem Montag, Mittwoch und Freitag zwischen 8:30 und 10:00 Uhr statt. Der Probenansatz erfolgte im unmittelbaren Anschluss im mikrobiologischen Labor des Institutes für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz an der Universität für Bodenkultur Wien. Die Auswertung der Proben wurde nach den entsprechenden Inkubationszeiten an den darauffolgenden Tagen durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle 11 zeigt eine detaillierte Zusammenstellung der untersuchten Wasserproben nach Art und Zeitpunkt. Die Doppel- bzw. Mehrfachbelegung einzelner Probennummern mit unterschiedlichen Wässern ergibt sich zum einem aus organisatorischen Bedürfnissen zum anderen aus deren mangelnder Verfügbarkeit. So wurden beispielsweise vom 20.03.02 bis 22.03.02 Wartungsarbeiten an der zweiten Wiener Hochquellenwasserleitung durchgeführt, was zum Entfallen bzw. zum Ersatz der entsprechenden Proben geführt hat.

Probennr.	Datum	Probe [Anzahl]	Anmerkung
1	21.01.2002 bis 29.03.2002	Rohwasser der zweiten Wiener Hochquellenwasserleitung [28]	entfallen vom 20.03.02 bis 22.03.02
		Trinkwasserbehälter Lainz [2]	vom 20.03.02 bis 22.03.02
2	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser der zweiten Wiener Hochquellenwasserleitung nach der Desinfektion [28]	entfallen vom 20.03.02 bis 22.03.02
		Mischwasser Gosau [1]	am 20.03.02

Tabelle 11: Zusammenstellung der untersuchten Wasserproben; im angegebenen Zeitraum fanden die Probennahmen jeden Montag, Mittwoch und Donnerstag statt.

Fortsetzung Tabelle 11

Probennr.	Datum	Probe [Anzahl]	Anmerkung
3	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser der zweiten Wiener Hochquellenwasserleitung nach der UV- Desinfektion [28]	entfallen vom 20.03.02 bis 22.03.02
4	21.01.2002 bis 29.03.2002	Rohwasser der ersten Wiener Hochquellenwasserleitung [29]	entfallen am 06.03.02
5	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser der ersten Wiener Hochquellenwasserleitung nach der Desinfektion [29]	entfallen am 06.03.02
6	21.01.2002 bis 29.03.2002	Wasser der neuen Donau Höhe Floridsdorfer Brücke [10]	jeden Montag
7	21.01.2002 bis 29.03.2002	Wasser der neuen Donau Höhe Floridsdorfer Brücke (1:1 verdünnt) [10]	jeden Montag
		Trinkwasser 8. Bezirk [4]	vom 31.01.02 bis 08.02.02 außer montags
8	04.02.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser 8. Bezirk [22]	vom 11.02.02 bis 29.03.02
9	21.01.2002 bis 29.03.2002	Ablauf einer Pflanzenkläranlage (1:10 000 verdünnt) [10]	jeden Montag
10	21.01.2002 bis 29.03.2002	Ablauf einer Pflanzenkläranlage (1:1000 verdünnt) [10]	jeden Montag
11	21.01.2002 bis 29.03.2002	Ablauf einer Pflanzenkläranlage (1:100 verdünnt) [10]	jeden Montag

Tabelle 11: Zusammenstellung der untersuchten Wasserproben; im angegebenen Zeitraum fanden die Probennahmen jeden Montag, Mittwoch und Donnerstag statt.

Fortsetzung Tabelle 11

Probennr.	Datum	Probe [Anzahl]	Anmerkung
12	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; 5. Stock, Damen WC [30]	
13	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; 5. Stock Küche [30]	
14	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; 1. Stock Damen WC [30]	
15	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; 1. Stock Küche [30]	
16	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; Erdgeschoss, Portier WC [30]	
17	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; Mikrobiologielabor [30]	
18	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser BOKU; Chemie Labor 5 [30]	
19	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser Schwechat [29]	entfallen am 01.03.02
		Trinkwasser 1. Bezirk [1]	am 01.03.02
20	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasser 13. Bezirk [21]	entfallen am 23.01.02 und 15.02.02
		Trinkwasser Rannersdorf [7]	am 04.03.02 am 11.03.02 vom 18.03.02 bis 20.03.02 vom 25.03.02 bis 29.03.02

Tabelle 11: Zusammenstellung der untersuchten Wasserproben; im angegebenen Zeitraum fanden die Probennahmen jeden Montag, Mittwoch und Donnerstag statt.

Fortsetzung Tabelle 11

Probennr.	Datum	Probe [Anzahl]	Anmerkung
21	21.01.2002 bis 29.03.2002	Trinkwasserbrunnen [1]	am 11.02.02

Tabelle 11: Zusammenstellung der untersuchten Wasserproben; im angegebenen Zeitraum fanden die Probennahmen jeden Montag, Mittwoch und Donnerstag statt.

5.1.2 Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien nach EN ISO 9308-1 (2000) und Messsystem Bac Trac 4100 im Vergleich

Mittels den in Kapitel 4 beschriebenen Methoden wurden die 490 Proben untersucht, und die Ergebnisse der mit dem Messsystem Bac Trac 4100 erhaltenen Reaktionen mit den Ergebnissen des parallel durchgeführten Referenzverfahrens, EN ISO-Methode 9308-1 (2000), verglichen.

Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde für jede Probe ein Mehrfachansatz bereitet. Dabei wurde für jede Probe, die mit dem Referenzverfahren (Membranfiltration nach EN ISO 9308-1 (2000)) untersucht wurde, ein Doppelansatz durchgeführt. Die mit dem alternativen Verfahren (Impedanzverfahren Messsystem Bac Trac 4100) geprüften Proben wurden dreifach angesetzt. Dies ergibt für die statistische Auswertung der Vergleichsuntersuchung eines qualitativen Verfahrens 3 mal 4 also insgesamt 12 Möglichkeiten der Zuordnung zu den Definitionen der damals gültigen ISO/DIS 16140 (1999) Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln Arbeitsvorschriften für die Validierung alternativer Verfahren (siehe Kapitel 4.5). Dies wird nachfolgend erläutert und tabellarisch dargestellt.

Aus einem Doppelansatz einer Probe können drei mögliche Ergebnisse resultieren. Im Falle der Membranfiltration bilden sich entweder auf beiden Membranen der selben Probe charakteristische Kolonien oder nicht bzw. kann sich auf einer der beiden Membranen des Doppelansatzes mindestens eine charakteristische Kolonie finden während sich auf der anderen Membran der selben Probe keine findet. In Tabelle 12 sind die Kombinationsmöglichkeiten der Ergebnisse eines Doppelansatzes dargestellt. Ein Plus (+) bezeichnet eine Reaktion bzw. einen Nachweis (Bildung mindestens einer charakteristischen Kolonie) und ein Minus (-) keine Reaktion bzw. keinen Nachweis (keine charakteristischen Kolonien).

Aus einem Dreifachansatz ergeben sich vier mögliche Ergebnisse. Für die Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 bildet die Überschreitung des festgesetzten Schwellenwertes das Kriterium, ob die untersuchte Probe eine Kontamination mit *E. coli* bzw. coliformen Bakterien aufweist. Bei einem Dreifachansatz können im Idealfall alle drei Ansätze einer Probe während der Messdauer unter dem Schwellenwert bleiben und somit in ihrer Impedanzänderung diesen nicht überschreiten. Die gleiche Reaktion aller drei Ansätze derselben Probe kann sich andersherum durch Überschreitung des Schwellenwertes ergeben. Die anderen beiden denkbaren Ergebnisse eines Dreifachansatzes bestehen in der Möglichkeit, dass jeweils ein Ansatz der selben Probe in seiner Reaktion bezüglich des Schwellenwertes von den beiden anderen Ansätzen abweicht. In der Tabelle 13 sind die Möglichkeiten der Ergebnisse eines Dreifachansatzes dargestellt. Analog bezeichnet wieder ein Plus (+) eine Reaktion bzw.

einen Nachweis (Überschreitung des Schwellenwertes) und ein Minus (-) keine Reaktion bzw. keinen Nachweis (keine Überschreitung des Schwellenwertes).

Doppelansatz	
Ansatz 1	Ansatz 2
+	+
+	-
-	-

Tabelle 12: Mögliche Ergebnisse bei einem Doppelansatz

Dreifachansatz		
Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
+	+	+
+	+	-
+	-	-
-	-	-

Tabelle 13: Mögliche Ergebnisse bei einem Dreifachansatz

Bei drei möglichen Ergebnissen des Doppelansatz des Membranfiltrationsverfahren und vier möglichen Ergebnissen des Dreifachansatz der Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 ergeben sich für eine Probe theoretisch zwölf verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Ergebnisse. Für die Interpretation und die Zuordnung zu Übereinstimmung bzw. Abweichung der Ergebnisse zu den Definitionen nach ISO/DIS 16140 (1999) (siehe Kapitel 4.5) wurde die in Tabelle 14 dargestellte Systematik angewandt. Wiederum bezeichnet ein Plus (+) eine Reaktion bzw. einen Nachweis und ein Minus (-) keine Reaktion bzw. keinen Nachweis.

Doppelansatz		Dreifachansatz			ISO/DIS 16140 (1999)
Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Definition
+	+	+	+	+	Positive Übereinstimmung (positive accordance)
		+	+	-	Positive Übereinstimmung (positive accordance)
		+	-	-	Negativabweichung (negative deviation)
		-	-	-	Negativabweichung (negative deviation)

Tabelle 14: Zuordnung der Ergebnisse aus einem Doppel- und Dreifachansatz zu den Definitionen der ISO/DIS 16140 (1999)

Fortsetzung Tabelle 14

Doppelansatz		Dreifachansatz			ISO/DIS 16140 (1999)
Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Definition
-	-	+	+	+	Positivabweichung (positive deviation)
		+	+	-	Positivabweichung (positive deviation)
		+	-	-	Negative Übereinstimmung (negative accordance)
		-	-	-	Negative Übereinstimmung (negative accordance)
+	-	+	+	+	Positivabweichung (positive deviation)
		+	+	-	Positive Übereinstimmung (positive accordance)
		+	-	-	Negative Übereinstimmung (negative accordance)
		-	-	-	Negativabweichung (negative deviation)

Tabelle 14: Zuordnung der Ergebnisse aus einem Doppel- und Dreifachansatz zu den Definitionen der ISO/DIS 16140 (1999)

5.1.2.1 Positive Übereinstimmung (PA) am Beispiel einer Brauchwasseruntersuchung

Die Abbildungen in diesem Abschnitt sollen ein Beispiel für eine positive Übereinstimmung der beiden Methoden, Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000), angeben. Bei einer positiven Übereinstimmung zeigen sowohl das Referenzverfahren als auch das alternative Verfahren eine positive Reaktion.

Die Abbildung 15 stellt die positive Reaktion einer mittels Impedanzmessung untersuchten 100 ml Brauchwasserprobe grafisch dar. Die Überschreitung des Schwellenwerts des dreifachen Ansatzes erfolgte nach durchschnittlich 9,13 Stunden (std.).

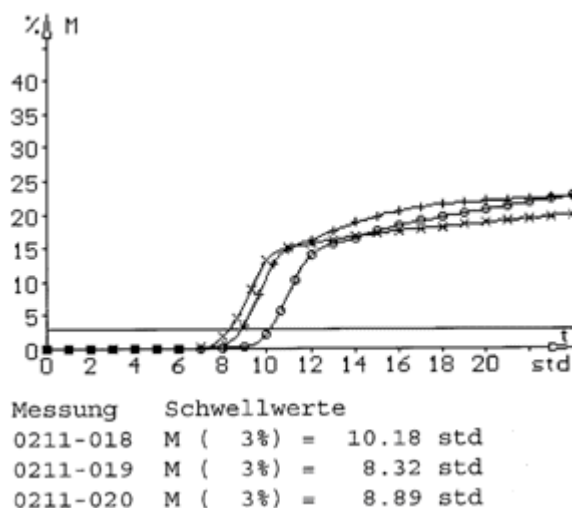


Abbildung 15: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; positive Reaktion – Überschreitung des Schwellenwertes

Zur Detektion und Differenzierung von *E. coli* und Coliformen sind nach den gängigen Regelwerken Kultivierungstechniken zwingend vorgeschrieben (Referenzverfahren). Die Abbildung 16 zeigt das vorläufige Ergebnis der gegenständlichen Brauchwasseruntersuchung nach EN ISO 9308-1 (2000) und gibt die ermittelte Koloniezahl in 100 ml Probenwasser auf Lactose TTC-Agar an. Nach EN ISO 9308-1 (2000) sind verdächtige Kolonien einem Bestätigungstest zu unterziehen (siehe Kapitel 4.3.4). Das Ergebnis des vorgeschriebenen Bestätigungstests ist für die mit der Nummer 17 markierte Kolonie in Abbildung 17 dargestellt.

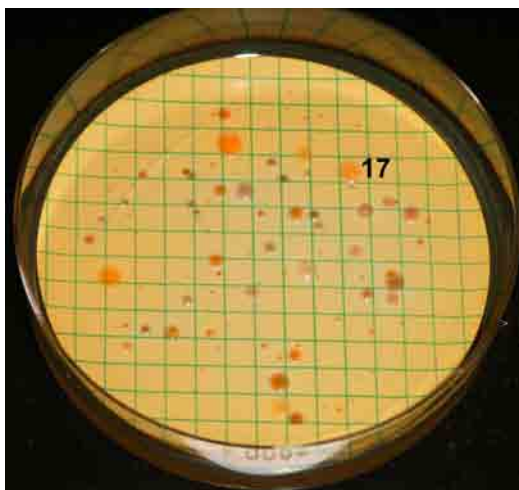


Abbildung 16: Referenzmethode EN ISO 9308-1 (2000); positiver Befund; die gegenständliche Kolonie ist mit der Nummer 17 markiert

Nach Auswertung der Petrischalen erfolgt die abschließende Bestätigung der charakteristischen Kolonien mittels biochemischer Tests. Die Abbildung 17 zeigt den positiven Befund der Bestätigungsuntersuchung mittels des API-Tests (API20E) (siehe Kapitel 4.3.4) für die in Abbildung 16 mit der Nummer 17 markierte Kolonie.



Abbildung 17: Bestätigungstest API-Test; positiver Befund (*E. coli*)

5.1.2.2 Negative Übereinstimmung (NA)

Bei einer negativen Übereinstimmung zeigen beide Untersuchungsmethoden (Referenzverfahren und alternatives Verfahren) eine negative Reaktion.

Im Falle dieser Vergleichsuntersuchung wird während der gesamten Messdauer mit dem Messsystem Bac Trac 4100 (alternatives Verfahren) der Schwellenwert nicht erreicht bzw. überschritten. Bei dem Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000) (Referenzverfahren) bilden sich auf den Filtern oberhalb der Nährböden keine Kolonien mit charakteristischer Farbentwicklung bzw. liefern gegebenenfalls durchgeführte Bestätigungstests einen negativen Befund.

5.1.2.3 Negativabweichung (ND) am Beispiel einer Quellwasseruntersuchung

Die Abbildungen in diesem Abschnitt geben ein Beispiel einer Negativabweichung für eine Quellwasserprobe. Hierbei zeigt das alternative Verfahren ein Negativergebnis, während das Referenzverfahren ein positives Ergebnis erbringt.

Die Abbildung 18 stellt die negative Reaktion der Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 grafisch dar. Der Schwellenwert wird während der gesamten Untersuchungsdauer nicht überschritten.

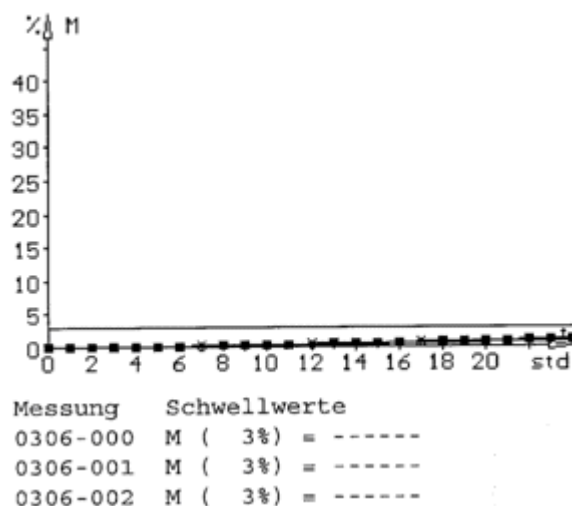


Abbildung 18: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; keine Reaktion – keine Überschreitung des Schwellenwertes

Die Abbildung 19 zeigt die Koloniezahl der selben 100 ml Quellwasserprobe. Es werden alle jene Kolonien als laktosepositive Bakterien gewertet, die eine gelb-orange-

Farbentwicklung im Medium unter der Membran zeigen. Die mit der Nummer 10 bezeichnete Kolonie wurde für den vorgeschriebenen Bestätigungsschritt abgeimpft.

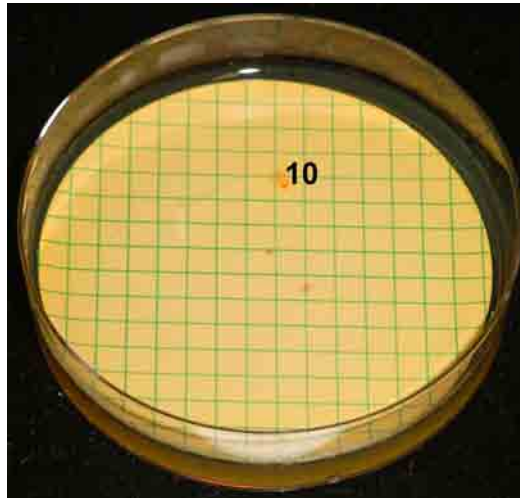


Abbildung 19: Referenzmethode EN ISO 9308-1 (2000); positiver Befund, die gegenständliche Kolonie ist mit der Nummer 10 markiert

Verdächtige Kolonien sind abzuimpfen und durch weitere Tests zu bestätigen. Die Abbildung 20 zeigt den positiven Befund der Bestätigungsuntersuchung mittels des API-Testsystems (siehe Kapitel 4.3.4) für die in Abbildung 19 mit der Nummer 10 markierten Kolonie.



Abbildung 20: Bestätigungstest API-Test; positiver Befund (*E. coli*)

5.1.2.4 Positivabweichung (PD) am Beispiel einer Quellwasseruntersuchung

Die Darstellungen in diesem Abschnitt zeigen ein Beispiel einer Positivabweichung für eine Quellwasserprobe. Bei einer Positivabweichung erbringt das alternative Verfahren ein Positivergebnis, während das Referenzverfahren ein negatives Ergebnis erbringt.

Die Abbildung 21 stellt die positive Reaktion der Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 grafisch dar. Der Schwellenwert wird überschritten.

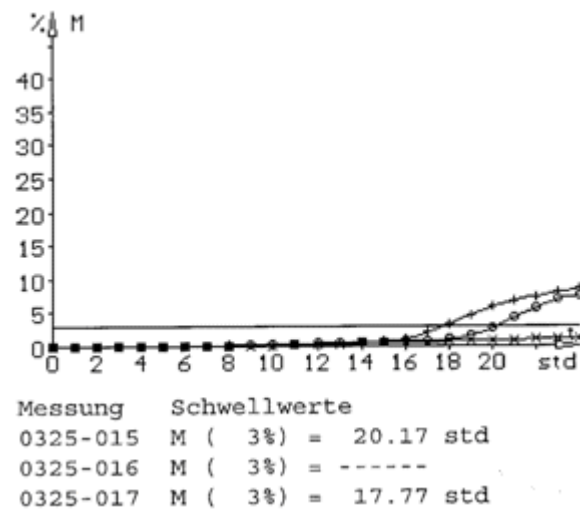


Abbildung 21: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; positive Reaktion – Überschreitung des Schwellenwertes

Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der mittels der Referenzmethode (Membranverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)) untersuchten Quellwasserprobe.

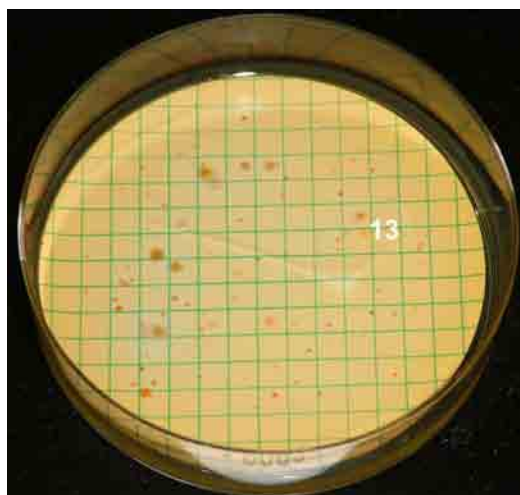


Abbildung 22: Referenzmethode EN ISO 9308-1 (2000); negativer Befund die gegenständliche Kolonie ist mit der Nummer 13 markiert

Die Bestätigungsuntersuchung der verdächtigen – in der Abbildung 22 mit der Nummer 13 markierten - Kolonie ergab einen negativen Befund. Somit sind die auf der Filteroberseite erkennbaren Kolonien als Begleitflora zu werten. Das in Abbildung 23 gezeigte Ergebnis des API-Tests (siehe Kapitel 4.3.4) ist nicht zuordenbar.

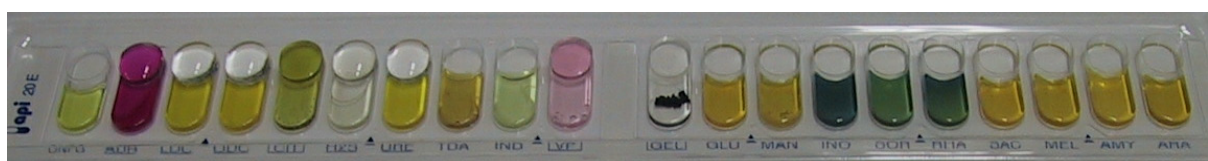


Abbildung 23: Bestätigungstest API-Test; negativer Befund

5.1.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Proben erfolgte nach der zum Zeitpunkt der gegenständlichen Untersuchung gültigen Fassung der ISO/DIS 16140 (1999). Die für diese Arbeit wesentlichen Grundzüge und Definitionen dieser Norm sind in Kapitel 4.5 angegeben. Die Vorgangsweise bei der Zuordnung der Ergebnisse des Zweifachansatzes der Membranfiltertechnik und des Dreifachansatz der Impedanzmethode zu den Kriterien Positiv- bzw. Negativübereinstimmung und Positiv- bzw. Negativabweichungen sind in Kapitel 5.1.2 beschrieben.

Die statistische Auswertung aller 490 Proben ergab 55 Positivübereinstimmungen und 392 Negativübereinstimmungen. Die Dominanz der negativen Übereinstimmungen begründet sich in der überwiegenden Zahl der Trinkwasserproben, die naturgemäß keine mikrobielle Belastung mit *E. coli* und coliformen Bakterien aufweisen sollten. Die Impedanzmessung mittels des Messsystems Bac Trac 4100 wies zudem 37 Negativabweichungen und 6 Positivabweichungen auf.

Mit Hilfe der nachstehenden Formel lässt sich die Alternativmethode in Bezug auf das Referenzverfahren beurteilen.

$$\text{Relative Genauigkeit} \quad AC[\%] = \frac{100 * (PA + NA)}{N} * 100$$

$$\text{Relative Spezifität} \quad SP[\%] = \frac{100 * NA}{N -} * 100$$

$$\text{Relative Empfindlichkeit} \quad SE[\%] = \frac{100 * PA}{N +} * 100$$

mit

AC	Relative Genauigkeit (accuracy) in Prozent [%]
SP	Relative Spezifität in Prozent [%]
SE	Relative Empfindlichkeit (sensitivity) in Prozent [%]
PA	Positive Übereinstimmung (positive accordance) [Anzahl]
NA	Negative Übereinstimmung (negative accordance) [Anzahl]
N	Gesamtanzahl der Proben [Anzahl]
N-	Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Referenzverfahren [Anzahl]
N+	Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Referenzverfahren [Anzahl]

Die Definitionen und die Bestimmung der Komponenten der Gleichungen sind in den Kapiteln 4.5 und 5.1.2 beschrieben.

Die Anwendung der Formeln ergab folgendes Bild:

Das Messsystem Bac Trac weist eine relative Genauigkeit von 91,2 % auf. Hierbei wurden alle untersuchten Proben berücksichtigt – also auch die für Trinkwasser untypischen mutmaßlich höher belasteten Brauchwasserproben. Der Wert von über 90 % für die relative Genauigkeit zeigt einen hohen Grad an Übereinstimmung zwischen dem durch das Referenzverfahren (Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000))

erzielten Antwortergebnissen und der durch das Alternativverfahren (Impedanz Splitting Methode mittels Bac Trac 4100) erhaltenen Antwortreaktion bei identischen Proben.

Die Eignung des Messsystems Bac Trac in Kombination mit dem Nährmedium BiMedia 165A die zu analysierende Bakteriengruppe (*E. coli*, Coliforme) nicht nachzuweisen, wenn sie auch mit dem Referenzverfahren nicht nachgewiesen wird, weist ebenfalls einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. Im Detail ergibt sich für die relative Spezifität ein Wert von 98,5 %.

Hinsichtlich der relativen Empfindlichkeit, d.h. die Eignung des Alternativverfahrens eine zu analysierende Keimgruppe nachzuweisen, wenn sie auch mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird, ergibt sich für das Messsystem Bac Trac 4100 ein bescheidener Wert von 59,8 %. Die Ursache hierfür könnte in der überwiegenden Verwendung solcher Wässer liegen, die nur eine geringe Keimbelastung aufwiesen. Dieser Fall ist für Trinkwasser typisch, bedingt jedoch, dass die Untersuchungsergebnisse stark schwanken und die Interpretation erschweren.

Die nachstehende Abbildung 24 soll diesen Effekt verdeutlichen. Es handelt sich um die Ergebnisse einer Messung eines Dreifachansatzes mittels des Messsystems Bac Trac 4100. Während eine Probe den Schwellenwert nach 11,36 Stunden überschreitet, zeigen die anderen beiden Proben des selben Wassers keine nennenswerte Reaktion (keine Überschreitung des Schwellenwertes). Bei gering mit *E. coli* und coliformen Bakterien belastetem Wasser ist es durchaus denkbar, dass zwei 100 ml Proben frei von den untersuchten Organismen sind, währenddessen eine 100 ml Probe ein *E. coli* bzw. ein coliformes Bakterium enthält, das ein Wachstum injiziert.

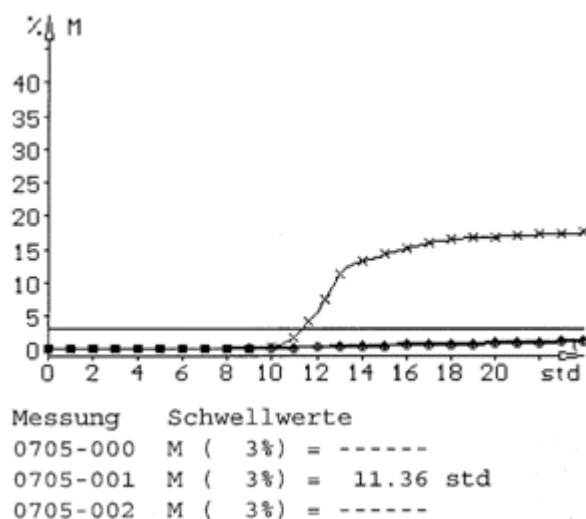


Abbildung 24: Ergebnis eines Dreifachansatzes der Impedanzmessung; geringe Belastung mit *E. coli* und Coliformen des Wassers; nur ein Ansatz überschreitet den Schwellenwert;

Ein Teil dieses Problems begründet sich in der gesetzlichen Festlegung von 100 ml Probenvolumen für Trinkwasseruntersuchungen. Dieses verhältnismäßig kleine Probenvolumen ist auch in anderer Hinsicht problematisch. Es stellt sich daher generell die Frage: Wenn Trinkwasser aus Versorgungssystemen als von exzellenter Qualität gilt und die Trübung unter 0,5 NTU ist, warum das Probenvolumen auf 100 ml limitiert wird, wenn ein Volumen von einem Liter oder mehr aussagekräftiger wäre (GELDREICH, 1997)?

Die Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der statistischen Auswertung für alle untersuchten Proben zusammen.

Matrix	PA	NA	ND	PD	Σ N	Relative Genauigkeit AC [%]	N+	Relative Empfindlichkeit SE [%]	N-	Relative Spezifität SP [%]
Summe aller Wässer	55	392	37	6	490	91,2	92	59,8	398	98,5

Tabelle 15: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), Zusammenfassung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), Gesamtübersicht Definitionen und Abkürzungen siehe Kapitel 4.5

In der nachfolgenden Abbildung 25 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung grafisch dargestellt.

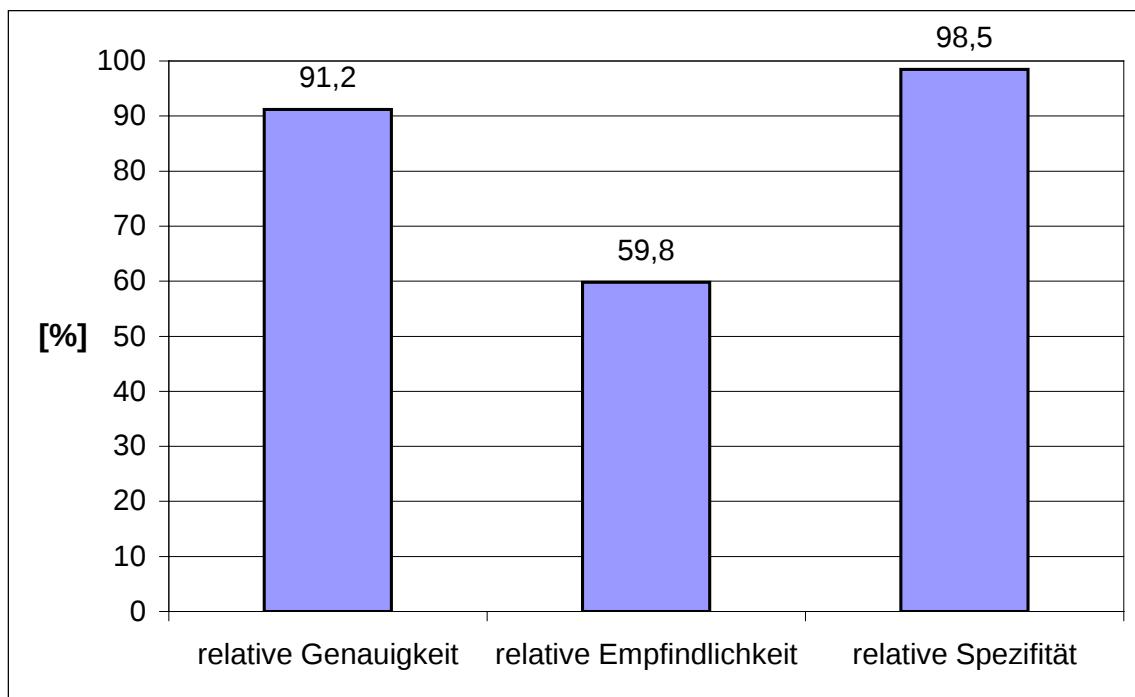


Abbildung 25: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), grafische Darstellung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), unter Berücksichtigung aller 490 Proben

Werden die Proben hinsichtlich Quell- bzw. Trinkwasser und Brauchwasser aufgegliedert, ergibt die statistische Auswertung nach ISO/DIS 16140 (1999) folgendes Ergebnis.

Insgesamt wurden 431 Quell- und Trinkwasserproben untersucht. Dabei stimmten 23 Proben positiv und 376 Proben negativ überein. Weiters wurden für diesen Wassertyp 29 Negativabweichungen und 3 Positivabweichungen festgestellt.

Die relative Genauigkeit bei Quell- und Trinkwasser ergab einen Wert von 95,6 %. Damit liegt auch hier ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen den

Untersuchungsergebnissen des Referenzverfahren (Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)) und des alternative Verfahrens (Impedanz Splitting Methode mittels Bac Trac 4100) bei identischen Proben vor.

Die relative Spezifität bei den Quell- und Trinkwasserproben weist dem Messsystem Bac Trac 4100 einen Wert von 99,2 % zu. Somit sind falsch positive Ergebnisse bei Trinkwasseruntersuchungen mit dem Messsystem Bac Trac nahezu ausgeschlossen bzw. sehr unwahrscheinlich. Falsch positive Ergebnisse sind bei Trinkwasseruntersuchungen nicht annehmbar, weil die Detektion von *E. coli* und coliformen Bakterien eine fäkale Kontamination des Trinkwassers anzeigt (siehe Kapitel 3.3). Das Wasser würde fälschlicher Weise als für den menschlichen Gebrauch ungeeignet eingestuft werden, bzw. müsste in weiterer Konsequenz der Aufwand für Desinfektionsmaßnahmen ungerechtfertigt erhöht werden.

Die relative Empfindsamkeit liegt für Quell- bzw. Trinkwasser vermutlich aus den oben angeführten Grund nur bei einem Wert von 44,2 %.

Die Tabelle 16 fasst die Ergebnisse der statistischen Auswertung für Quell- und Trinkwasser zusammen.

Matrix	PA	NA	ND	PD	Σ N	Relative Genauigkeit AC [%]	N+	Relative Empfindlich= keit SE [%]	N-	Relative Spezifität SP [%]
Quell- und Trink= wasser	23	376	29	3	431	95,6	52	44,2	379	99,2

Tabelle 16: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), Zusammenfassung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), für Quell- und Trinkwasser

Definitionen und Abkürzungen siehe Kapitel 4.5

Die Abbildung 26 stellt die Ergebnisse der statistischen Auswertung für Quell- und Trinkwasser grafisch dar.

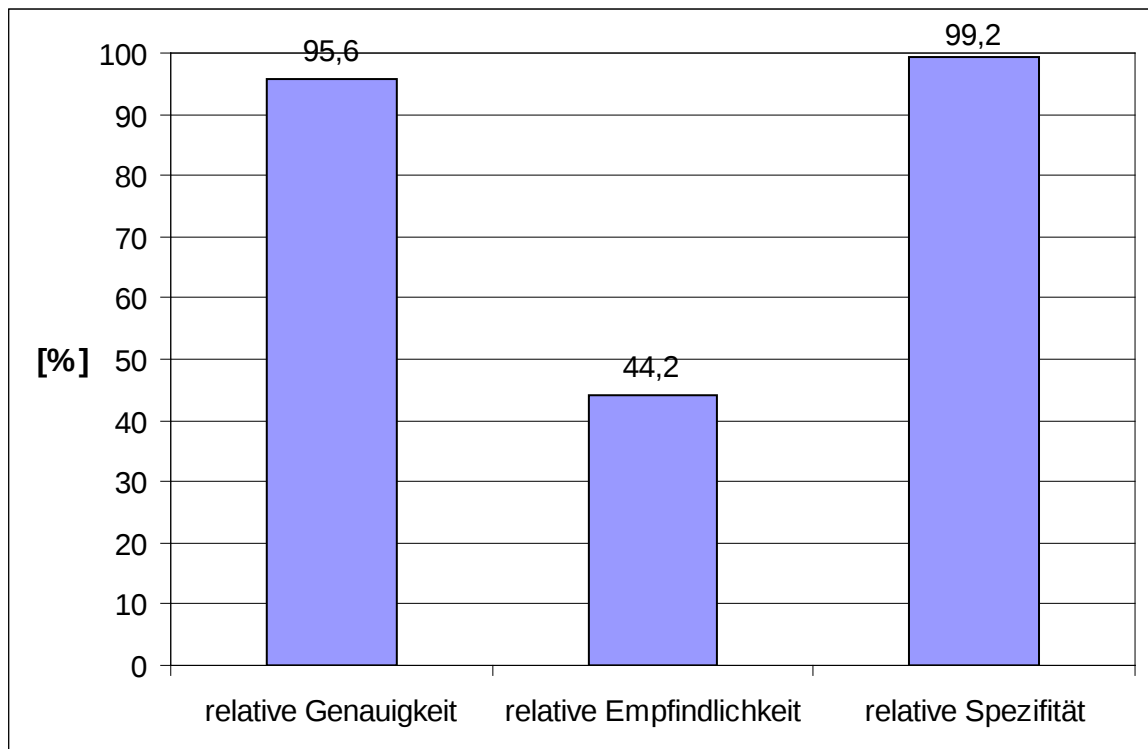


Abbildung 26: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), grafische Darstellung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), Quell- und Trinkwasser

Es wurden insgesamt 59 Brauchwasserproben untersucht. Dabei wurden 32 positive Übereinstimmungen, 15 Negativübereinstimmungen, 9 Negativabweichungen und 3 Positivabweichungen festgestellt.

Der Grad der Übereinstimmung zwischen den Untersuchungsergebnisse des Referenzverfahren (Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)) und des Alternativverfahren (Impedanzmessung mittels Bac Trac 4100) weist für Brauchwasser einen Wert von 79,7% auf (relative Genauigkeit).

Die relative Spezifität der Brauchwasserproben bestätigt dem Messsystem Bac Trac 4100 im Vergleich zur EN ISO 9308-1 (2000) Methode einen Wert von 83,3 %.

Die relative Empfindlichkeit der Brachwasserproben ergab 78,1%. Dieser im Vergleich zu den Quell- und Trinkwasserproben hohe Wert bestätigt die oben angeführte Vermutung bzgl. der relativen Empfindlichkeit. Brauchwasser weist in der Regel eine höhere Keimbelastung als Trinkwasser auf.

Die Tabelle 17 fasst die Ergebnisse der statistischen Auswertung für Brauchwasser zusammen.

Matrix	PA	NA	ND	PD	Σ N	Relative Genauigkeit AC [%]	N+	Relative Empfindlich= keit SE [%]	N-	Relative Spezifität SP [%]
Brauch= wasser	32	15	9	3	59	79,7	41	78,1	18	83,3

Tabelle 17: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), Zusammenfassung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), für Brauchwasser
Definitionen und Abkürzungen siehe Kapitel 4.5

Die Abbildung 27 stellt die Ergebnisse der statistischen Auswertung für Brauchwasser grafisch dar.

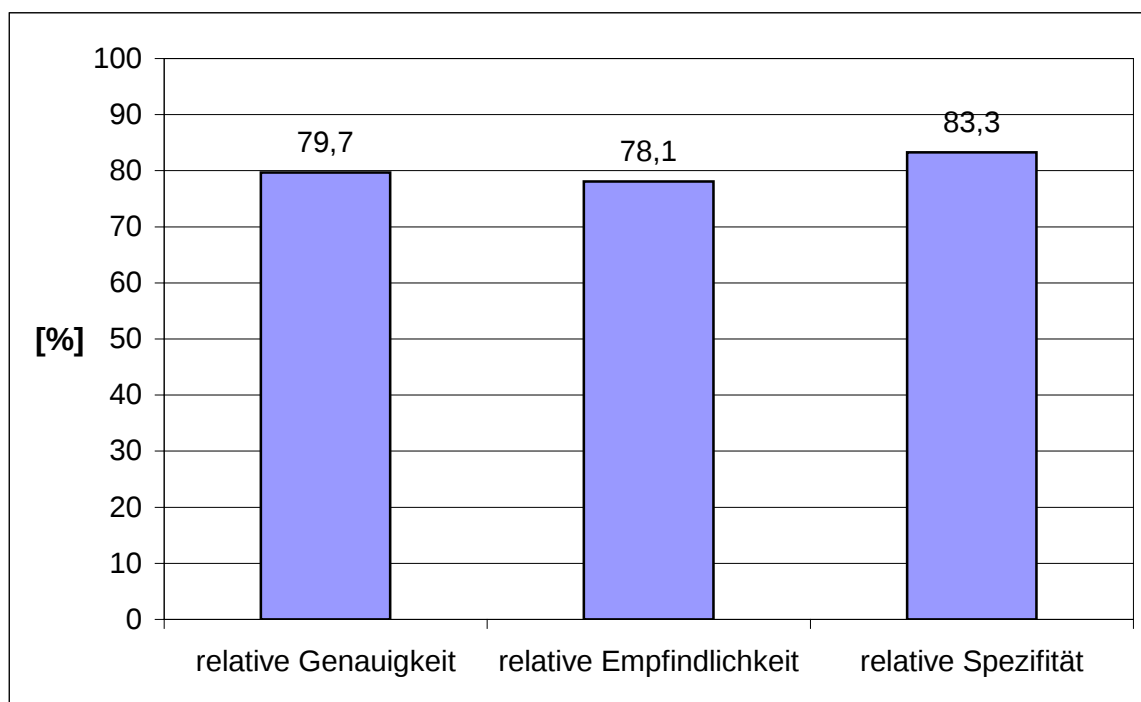


Abbildung 27: Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien (Impedanzmessung mittels Messsystem Bac Trac 4100 und Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000)), grafische Darstellung der statistischen Auswertung (ISO/DIS 16140 (1999)), Brauchwasser

5.2 Anreicherungsversuch

5.2.1 Projektdurchführung

Die Anreicherungsversuche wurden am 20.08.2002 im Wasserwerk Wien Rosenhügel mit Quellwasser der Ersten Wiener Hochquellenwasserleitung vor der Desinfektion durchgeführt. An diesem Tag wurden Probenvolumen von 10 und 100 Litern filtriert und

zwar jeweils mit den beiden Verfahren der Druckfiltration und der Capsulenfiltration. Die Vakuumfiltration wurde im mikrobiologischen Labor des Institutes für Siedlungswasserbau, Industriewasserwirtschaft und Gewässerschutz der Universität für Bodenkultur Wien vorgenommen. Eine ausreichende Menge Quellwasser zur Filtration der Volumina 1 und 10 Liter wurde dafür an den beiden Tagen in desinfizierten Kanistern abgefüllt und nach dem Transport unmittelbar weiterverarbeitet.

Zur Abschätzung der vorhandenen Belastung des Quellwassers mit *E. coli* und coliformen Bakterien wurde eine 100 ml Probe nach dem Standardverfahren EN ISO 9308-1 (2000) (siehe Kapitel 4.2) untersucht. Die Quellwasserprobe war an diesem Tag mit 3 *E. coli* und 5 Coliformen belastet.

5.2.2 Anreicherung mit Vakuumfiltration

Die Filtration von 100 ml Quellwasser benötigt unter einer Minute. Bei der angegebenen Belastung des Quellwassers wurde der Schwellenwert nach 10,48 Stunden überschritten.

Mittels der Methode der Vakuumfiltration benötigt die Filtration von 1 Liter Quellwasser 5 Minuten – rund 0,08 Stunden. Die Reaktionszeit der Messung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 betrug 9,79 Stunden. Das Ergebnis der Untersuchung lag demnach nach 9,87 Stunden vor.

Die Anreicherung bzw. Filtration von 10 Liter Quellwasser mittels Vakuumfiltration stellt aus den in Kapitel 4.6.1 genannten Gründen eine sehr aufwendige bzw. arbeitsintensive Prozedur dar. Die Probenvorbereitung benötigte durchschnittlich 2 Stunden. Die Reaktionszeit betrug 6,52 Stunden. Zusammenfassend ergibt sich aus Probenvorbereitung und Reaktionszeit der Impedanzmessung ein Zeitaufwand von rund 8,52 Stunden.

In der Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Impedanzmessung für die Volumina 100 ml, 1 000 ml und 10 000 ml grafisch dargestellt.

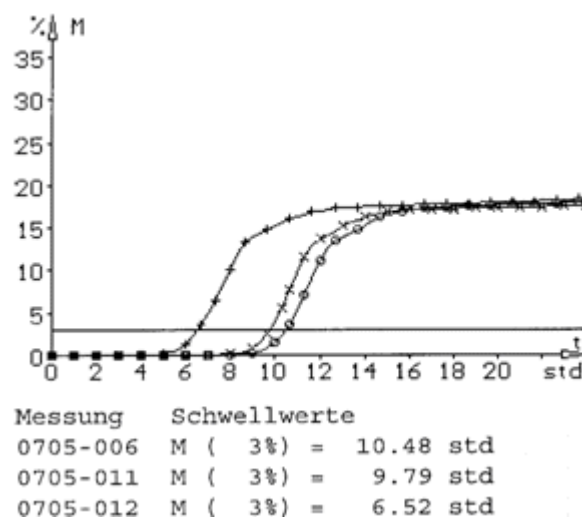


Abbildung 28: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; 100 ml (O), 1 000 ml (X) und 10 000 ml (+) Probenvolumen

Der Einfluss der Filtrationsdauer für die Volumina 100 ml und 1 000 ml auf die Gesamtdauer einer Untersuchung ist im Verhältnis zur Reaktionszeit der Impedanzmessung gering. Bei der festgestellten Belastung des Quellwassers betrug die

Zeitersparnis der Messung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 durch Anreicherung auf einen Liter rund 40 Minuten. Durch weitere Anreicherung von einem auf 10 Liter verkürzt sich die Reaktionszeit um weitere 3,27 Stunden. Da der Zeitaufwand für die Filtration von 10 Litern mittels Vakuumfiltration beträchtlich ist (rund 2 Stunden) und bei Überlegungen bzgl. der Zeitersparnis mitzuberrücksichtigen ist, reduziert sich dieser Zeitvorteil auf 1,35 Stunden.

Die Tabelle 18 stellt die Ergebnisse der vakuumfiltrierten Probenvolumen zusammen. Die Filtrationszeiten, die gemessenen Reaktionszeit der Impedanzmessung, die Gesamtdauer der Untersuchung sowie deren Zeitdifferenzen von aufeinanderfolgenden Probenvolumina sind angegeben.

Volumen [ml]	Probennahme [h]	ΔT [h]	Reaktionszeit [h]	ΔT [h]	Untersuchungsdauer	ΔT [h]
100	-	-	10,48	-	10,48	
1 000	0,08	0,08	9,79	0,69	9,87	0,61
10 000	2,00	1,92	6,52	3,27	8,52	1,35

Tabelle 18: Gegenüberstellung von Volumen (Keimdichte), Filtrationszeit, Reaktionszeit, Untersuchungsdauer und ΔT (Zeitdifferenzen) einer Quellwasserprobe

5.2.3 Anreicherung mit Druckfiltriereinheit

Die Dauer der Anreicherung mittels Druckfiltration ist druckabhängig. Die durch Drucksteigerungen erzielbaren Filtrationszeitverkürzungen sind unter Bedachtnahme auf zu vermeidende Schädigung der Mikroorganismen zu begrenzen.

Die Filtration von 10 Litern Quellwasser mit der Druckfiltriereinheit benötigte rund 5 Minuten. Die Reaktionszeit der Impedanzmessung mittels des Messsystem Bac Trac 4100 für dieses Probenvolumen betrug 8,55 Stunden. Der Zeitaufwand aus Probenvorbereitung und Reaktionszeit ergibt sich somit zu 8,63 Stunden.

Die Anreicherung von 100 Liter Quellwasser mit der Druckfiltriereinheit benötigte knapp unter 1 Stunde (0,79 Stunden). Mit zunehmender Dauer der Filtration sinkt bei gleichbleibendem Druck der Durchfluss pro Zeiteinheit. Dies hängt von der Belastung des Wassers mit Schwebstoffen ab, die den Filter schleichend verstopfen, und kann unter Umständen – wie ein Filtrationsdurchgang zeigte - zum völligen Stillstand des Filtrationsvorganges führen. Die Reaktionszeit der Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac für 100 Liter Probenvolumen betrug 5,65 Stunden. Der Zeitaufwand aus Probenvorbereitung und Reaktionszeit ergibt sich somit zu 6,44 Stunden.

In der Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Impedanzmessung für die Volumina 10 000 ml und 100 000 ml grafisch dargestellt.

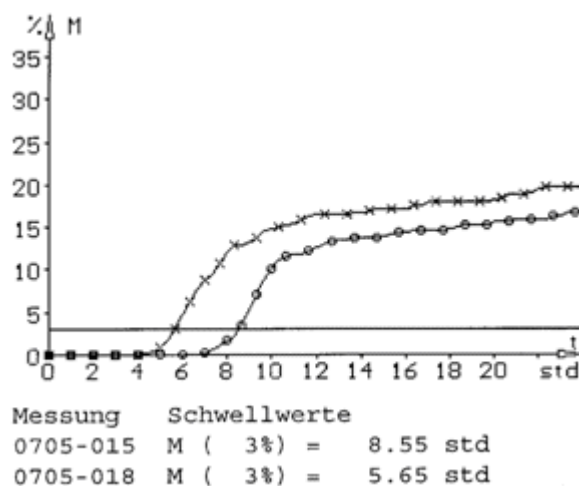


Abbildung 29: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; 10 000 ml (O) und 100 000 ml (X)
Quellwasserprobe

Der Vergleich der Reaktionszeiten der Impedanzmessung zeigt, dass bei der vorhandenen Belastung der Probe bei der Anreicherung von 10 auf 100 Liter mittels Druckfiltration eine Reaktionszeitverkürzung von 2,9 Stunden erreicht wurde. Unter Berücksichtigung des Zeitaufwandes für die Anreicherung erhielt man die Ergebnisse bei Druckfiltration von 100 Litern um rund 2,19 Stunden früher als bei der Filtration von 10 Litern. Dieser Zeitersparnis steht jedoch der Nachteil des großen Wasserverbrauchs entgegen. Weiters erreicht diese Filtrationsanordnung bei mit Schwebstoffen belastetem Wasser rasch seine Grenzen.

Die Tabelle 19 zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse der druckfiltrierten Probenvolumen. Die gemessenen Probennahmezeiten, die Reaktionszeiten der Impedanzmessung und die Untersuchungsdauer sowie deren Differenzen von aufeinanderfolgenden Probenvolumina sind zusammengefasst.

Volumen [ml]	Probennahme [h]	ΔT [h]	Reaktionszeit [h]	ΔT [h]	Untersuchungsdauer	ΔT [h]
10 000	0,08	-	8,55	-	8,63	-
100 000	0,79	0,71	5,65	2,9	6,44	2,19

Tabelle 19: Gegenüberstellung von Volumen (Keimdichte), Filtrationszeit, Reaktionszeit, Untersuchungsdauer und ΔT (Zeitdifferenzen) einer Quellwasserprobe

5.2.4 Anreicherung mit Capsulen

Die Anreicherung mit Capsulen erwies sich in der Handhabung für die Filtration als das einfachste Verfahren. Das luftblasenfreie Befüllen der Capsule mit der Nährlösung hingegen erfordert einiges Geschick. Der eingebaute Vorfilter erleichtert und beschleunigt speziell bei größeren Volumina den Filtrationsvorgang.

Die Filtration von 10 Litern Quellwasser ist in etwa 2 Minuten abgeschlossen. Die Reaktionszeit der Impedanzmessung betrug 10,42 Stunden. Die Untersuchungsergebnisse lagen demnach nach 10,45 Stunden vor.

Für die Filtration von 100 Litern Quellwasser wurde ein Zeitraum von ca.30 Minuten benötigt. Der Schwellenwert wurde nach 8,55 Stunden Inkubation überschritten. Die Summe aus Probennahme und Reaktionszeit der Impedanzmessung ergibt rund 9,05 Stunden für die Untersuchungsdauer.

Die nachfolgenden grafischen Darstellungen der Ergebnisse der Impedanzmessung erfolgte unter Verwendung der neueren Software des Messsystems Bac Trac 4300. In der Abbildung 30 ist das Ergebnis der Impedanzmessung für das Volumen 10 000 ml grafisch dargestellt.

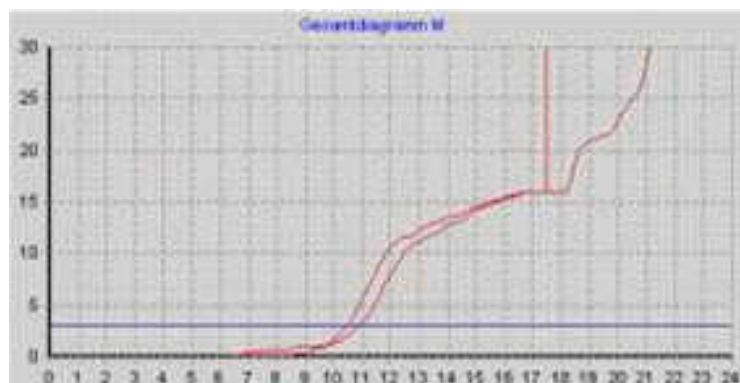


Abbildung 30: Kurvenverläufe der Impedanzmessungen; 10 000 ml Quellwasserprobe

In der Abbildung 31 ist das Ergebnis der Impedanzmessung für das Volumen von 100 000 ml grafisch dargestellt.

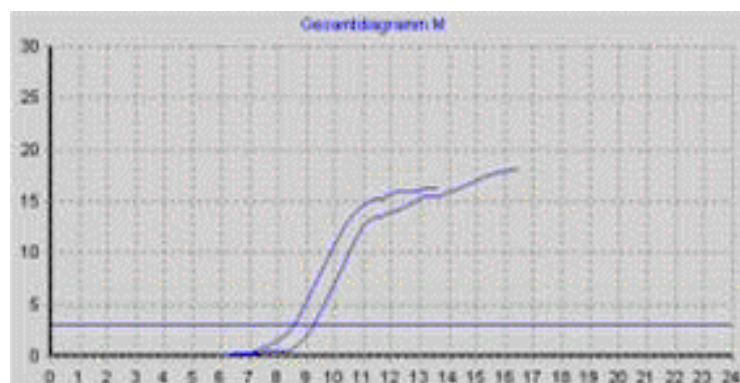


Abbildung 31: Kurvenverläufe der Impedanzmessung; 100 000 ml Quellwasserprobe

Aus der nachfolgenden Tabelle 20 ist ersichtlich, dass sich bei der vorhandenen Belastung die Reaktionszeit der Impedanzmessung um 1,87 Stunden verkürzte, wenn statt einer Anreicherung auf 10 Liter eine auf 100 Liter vorgenommen wurde. Aufgrund der unterschiedlich langen Anreicherungsauern erhält man bei Betrachtung der Gesamtdauer (Filtration und Reaktionszeit) eine Zeitdifferenz von 1,40 Stunden. Auch hier steht der große Wassereverbrauch bei der Filtration von 100 Litern Quellwasser der Zeitersparnis negativ gegenüber.

Die Tabelle 20 zeigt die Gegenüberstellung der Ergebnisse von capsulenfiltrierten Probenvolumen. Die Anreicherungszeiten, die gemessenen Reaktionszeit und die Dauer

der Untersuchung sowie die Differenzen dieser Zeiten von aufeinanderfolgenden Probenvolumina sind angeführt.

Volumen [ml]	Probennahme [h]	ΔT [h]	Reaktionszeit [h]	ΔT [h]	Untersuchungsdauer	ΔT [h]
10 000	0,03	-	10,42	-	10,45	-
100 000	0,50	0,47	8,55	1,87	9,05	1,40

Tabelle 20: Gegenüberstellung von Volumen (Keimdichte), Filtrationszeit, Reaktionszeit, Untersuchungsdauer und ΔT (Zeitdifferenzen) einer Quellwasserprobe

6. Diskussion

6.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999)

Zusammenfassend lassen sich aus der beschriebenen Verfahrensvergleichsuntersuchung folgende Erkenntnisse ableiten.

Die Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem Nährmedium BiMedia 165A ist ein genaues und spezifisches Verfahren zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien. Die mit diesem Verfahren erzielten Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der gesetzlich vorgeschriebenen Standardmethode nach EN ISO 9308-1 (2000) vergleichbar. Daraus lässt sich ableiten, dass diese neue Methode für die mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser geeignet ist.

In der Regel konnte eine vorhandene Belastung der Proben innerhalb von 8 bis 14 Stunden erkannt werden. Somit werden mit dem Messsystem Bac Trac 4100 positive Ergebnisse wesentlich rascher detektiert als mit der Standardmethode nach EN ISO 9308-1 (2000). Ein frühes Signal als Indiz eines ernsthaften hygienischen Problems einer Trinkwasserprobe stellt in der routinemäßigen mikrobiologischen Qualitätskontrolle einen entscheidenden Vorteil dar, da es ein zeitgerechtes Reagieren durch entsprechende Desinfektionsmaßnahmen ermöglicht.

Bei der hier beschriebenen Methode musste aufgrund des Standardmesszellenvolumens (10 ml) des Messsystems Bac Trac 4100 als primärer Arbeitsschritt vor der eigentlichen Impedanzmessung eine Membranfiltration durchgeführt werden, um die Bakterien einer 100 ml Probe zu gewinnen. Diese Vorgangsweise ist in Hinblick auf eine weitere Vereinfachung des Untersuchungsverfahrens (Reduzierung des Arbeitsaufwands) und dessen routinemäßigen Anwendung in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser zu verfeinern. Idealerweise wären die Messzellen für das in den gängigen Regelwerken festgesetzten Untersuchungsprobenvolumen von 100 ml (siehe Kapitel 3.2) auszulegen, sodass die Membranfiltration entfällt und die Messzellen direkt mit der Probe und der Nährlösung befüllt werden. COLQUHOUN et al. (1995), die ebenfalls eine Verfahrensvergleichsuntersuchung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit einem für *E. coli* spezifischen Nährmedium durchgeführt haben, empfehlen solch eine Entwicklung. Hierfür sind weitere Untersuchungen erforderlich, die neben Volumsvariationen der Messzellen auch die Bildung von Konzentraten der Nährlösung - unter Berücksichtigung derer Löslichkeit - einbeziehen.

Mit Ausnahme des Probenansatzes ist die Impedanzmessung mittels des Messsystems Bac Trac 4100 weitestgehend automatisiert. Die automatische Steuerung des Messvorgangs, die gleichzeitige Registrierung, Darstellung und Speicherung der Daten ermöglichen weitgehende Unabhängigkeit vom herkömmlichen Laborbetrieb. Die farbliche Ausweisung belasteter Proben und die Möglichkeit der Verwaltung der Daten am Computer erleichtern und minimieren den Arbeitsaufwand speziell bei hohen Probendurchsätzen. Durch Kopplung mit modernen Kommunikationsmitteln (Mail, short message service (sms), usw.) können Grenzwertüberschreitungen umgehend an Behörden und Einsatzzentralen zu allen Tageszeiten übermittelt werden. Es besteht auch die Möglichkeit einer Verknüpfung zu Qualitätsmanagementprogrammen. Weiters ist das Messsystem Bac Trac 4100 für ein nachhaltiges Qualitätsmonitoring besonders geeignet, da aufgrund der computergestützten Datenauswertung in unkomplizierter Weise viele Untersuchungsergebnisse miteinander verglichen werden können und somit auf Qualitätsprobleme rasch reagiert werden kann.

Das Messsystem Bac Trac 4100 ist im Gegensatz zu der Standardmethode (verwendet Petrischalen) und den meisten anderen Alternativmethode (siehe Kapitel 3.4) kein Verbrauchsprodukt bzw. Einweggut. Speziell die - gegebenenfalls kontaminierten -

Messzellen widerstehen Autoklaviervorgängen und sind somit wiederverwendbar. Aufgrund ihres dreikomponentigen Aufbaus ist bei unsachgemäßer Beanspruchung lediglich der schadhafte Teil auszuwechseln. Die Anwendung des Messsystems Bac Trac für mikrobiologische Untersuchungen reduziert somit den Materialaufwand eines Labors wesentlich und ist somit auch einen nachhaltigen Beitrag zur Abfallvermeidung.

Abschließend zeigt diese Verfahrensvergleichsuntersuchung, dass das Impedanzmessverfahren mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem Nährmedium BiMedia 165A zur mikrobiologischen Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser geeignet scheint. Angesichts der Vorteile in Hinblick auf raschere Untersuchungsergebnisse, weitgehende Automatisierung, sowie geringerer Arbeits- und Materialaufwand gegenüber der Standardmethode nach EN ISO 9308-1 (2000) und auch anderen Alternativmethoden (vergleiche Kapitel 3.4 und 6.3) bedeutet die Etablierung des Impedanzverfahrens für die routinemäßigen mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser, wie bereits auch in anderen Bereichen der Lebensmitteluntersuchung, einen vielversprechenden Fortschritt.

6.2 Anreicherungsversuch

6.2.1 Vergleich der Anreicherungsverfahren

Die Vakuumfiltration ist für die Anreicherung größerer Volumina aus den bereits genannten Gründen nicht geeignet (siehe Kapitel 4.6.1 und 5.2.2). Schon die Filterung von 10 Liter mit diesem Verfahren stellt einen sehr aufwendigen Arbeitsschritt dar, der rund 2 Stunden benötigt. Der Vergleich mit der Anreicherung des selben Volumens mittels Druckfiltration zeigt, dass die Gesamtzeit der Untersuchung nahezu identisch ist. Die im Vergleich zur Druckfiltration wesentlich längere Dauer der Probennahme wird durch die kürzere Reaktionszeit der Impedanzmessung (wiederum eine Zeitdifferenz von rund 2 Stunden) nahezu vollständig kompensiert (siehe dazu Tabelle 21 bzw. Abbildung 32). Die einfachere Arbeitsprozedur der Anreicherung mittels Druckfiltration ist positiv zu bewerten.

Für die Anreicherung von 10 Litern erwiesen sich sowohl die Druckfiltriereinheit als auch die Capsule als einfache und zweckmäßige Anordnungen zur raschen Filtration. Die Capsule zeigte im Vergleich zur druckfiltrierten Probe längere Reaktionszeiten bei der Impedanzmessung. Im konkreten Fall betrug die Zeitdifferenz der Schwellenwertüberschreitungen 1,87 Stunden. Da die Probenaufbereitung bei beiden Verfahren im Bereich von Minuten liegt und in Relation zur Reaktionszeit sehr klein ist, war mit druckfiltrierten 10 Liter Proben die Belastung des Quellwassers um 1,82 Stunden früher zu identifizieren (siehe Tabelle 21).

Bei der Anreicherung von 100 Litern stellten sich der in der Capsule integrierte Vorfilter und die einfache Handhabung als Vorteil heraus. Der Durchfluss blieb während der gesamten Filtrationsdauer nahezu konstant und die Probennahme war um rund 17 Minuten schneller durchgeführt als mit der Druckfiltriereinheit. Bei der Anreicherung mit der Druckfiltriereinheit stagniert der Durchfluss mit fortschreitender Filtrationsdauer stetig und brach bei einem Versuchsdurchgang ganz ab, bevor 100 Liter filtriert waren. Die höhere Filtergeschwindigkeit der Capsule wird auch bei diesem Probenvolumen durch die längere Reaktionszeit der Impedanzmessung kompensiert. Die Differenz der Reaktionszeiten betrug 2,90 Stunden. Wird die gesamte Untersuchungsdauer betrachtet, so registrierte die druckfiltrierte Probe die Belastung des Quellwassers um 2,61 Stunden früher als die capsulenfiltrierte Probe (siehe Tabelle 21).

Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der Anreicherungsversuche im Vergleich. Für die Volumina 1, 10 und 100 Liter sind die Probennahmezeiten, die Reaktionszeiten der

Impedanzmessung sowie die Gesamtzeiten der Untersuchung der erprobten Anreicherungsverfahren angegeben.

Volumen [ml]	Dauer [h]	Anreicherung mit Vakuumfiltration	Anreicherung mit Druckfiltriereinheit	Anreicherung mit Capsule
1 000	Probennahme	0,08		
	Reaktionszeit	9,79		
	Summe	9,87		
10 000	Probennahme	2,00	0,08	0,03
	Reaktionszeit	6,52	8,55	10,42
	Summe	8,52	8,63	10,45
100 000	Probennahme		0,79	0,50
	Reaktionszeit		5,65	8,55
	Summe		6,44	9,05

Tabelle 21: Vergleich der Probennahme- und Inkubations- sowie der Gesamtdauer der Probenvolumen 100 ml, 10 000 ml und 100 000 ml der Anreicherungsverfahren (Vakuumfiltration, Druckfiltriereinheit und Capsule)

In Abbildung 32 ist der Vergleich der Untersuchungsdauer - nach Probennahmedauer und Reaktionszeit der Impedanzmessung gegliedert – grafisch dargestellt. Aus dem Balkendiagramm lässt sich für die Volumina 10 und 100 Litern die durch Anreicherung des Keimmaterials gewünschte Verkürzung der Reaktionszeit der Impedanzmessung und damit auch der Untersuchungsdauer grob ableiten. Die Verkürzung der Untersuchungsdauer liegt für die Anreicherungsverfahren Druckfiltriereinheit und Capsule allerdings auf unterschiedlichem Zeitniveau. Weiters wird die divergierende Zusammensetzung der nahezu gleichen Untersuchungszeiten der membran- bzw. druckfiltrierten Probe für das Volumen von 10 Litern deutlich.

In Abbildung 32 ist zudem ersichtlich, dass mit Ausnahme des Verfahrens der Vakuumfiltration die Dauer der Anreicherung von 10 Litern im Verhältnis zur gesamten Untersuchungsdauer unscheinbar gering ist. Auch die Anreicherung von 100 Litern mit den Methoden der Druckfiltration und der Capsule ist in einem vertretbaren Zeitraum zu bewerkstelligen. Bei Wasser mit höherem Schwebstoffgehalt weist die Druckfiltration jedoch Schwächen auf. Generell ist der große Wasserverbrauch bei diesem Volumen nachteilig zu bewerten.

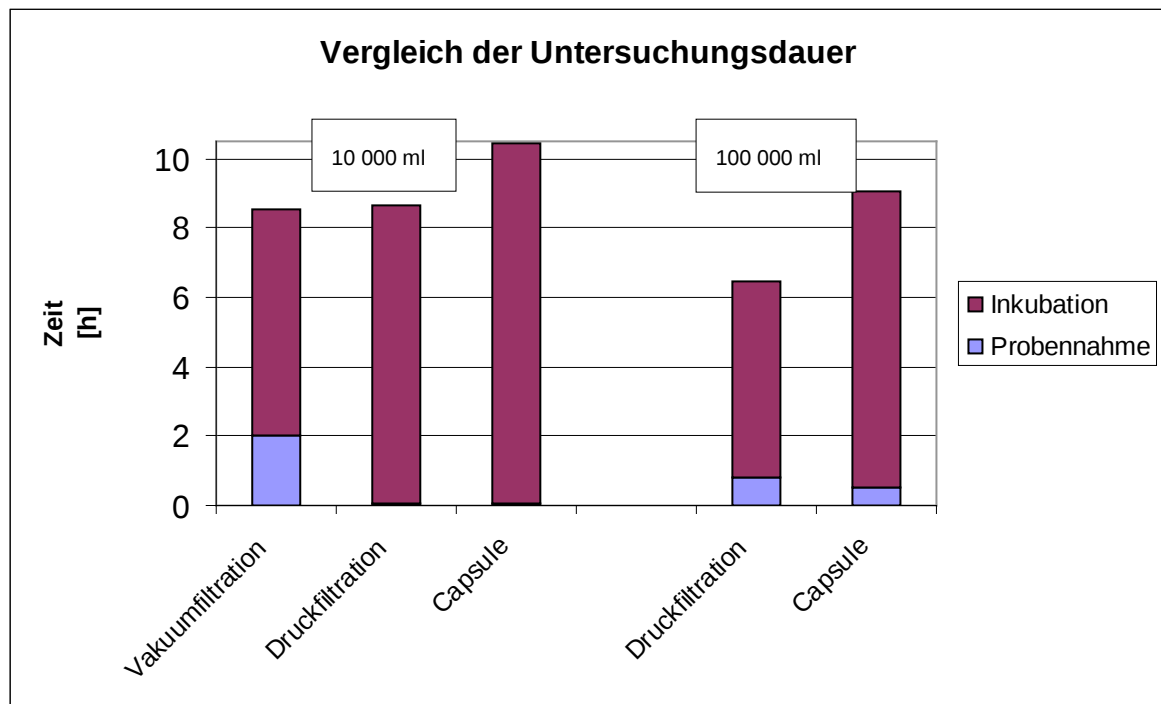


Abbildung 32: grafische Darstellung des Vergleichs der Untersuchungsdauer – aufgeteilt nach Probennahme- und Inkubationsdauer – für die Probenvolumen 10 000 ml und 100 000 ml und die Anreicherungsverfahren (Vakuumfiltration, Druckfiltriereinheit und Capsule)

6.2.2 Fazit Anreicherungsverfahren

Abschließend kann aus der gegenständlichen Untersuchung abgeleitet werden, dass durch Anreicherung – Erhöhung des Keimmaterials – die gewünschte Reaktionszeitverkürzung der Impedanzmessung mit dem Messsystems Bac Trac 4100 zu erzielen ist. Dies soll in Abbildung 33 veranschaulicht werden, in der die Reaktions- und Untersuchungszeiten der erprobten Anreicherungsverfahren für die Volumen 100 ml sowie 1, 10 und 100 Liter eingetragen sind.

Wird die dunkelrote Linie der vakuumfiltrierten Probe in Abbildung 33 betrachtet, die aus den drei Messwerten für 100 ml sowie 1 und 10 Liter der Reaktionszeit gebildet wurde, so fällt die Reaktionszeit annähernd linear mit dem Anreichervolumen bzw. der Konzentration von *E coli* und coliformen Bakterien. Die Abnahme der Reaktionszeiten bei steigenden Konzentrationen von *E coli* und coliformen Bakterien ist typisch für das Impedanzverfahren.

Bei der Betrachtung der Gesamtuntersuchungsdauer ist differenzierter vorzugehen. Die Zeit für die Probenanreicherung, die - wie eingehend beschrieben - vom angewandten Anreicherungsverfahren abhängig ist, muss mitberücksichtigt werden. Sie ergibt sich in Abbildung 33 als Differenz der Linie für die Gesamtuntersuchungsdauer und der Linie für die Reaktionszeit der jeweiligen Anreicherungs-methode.

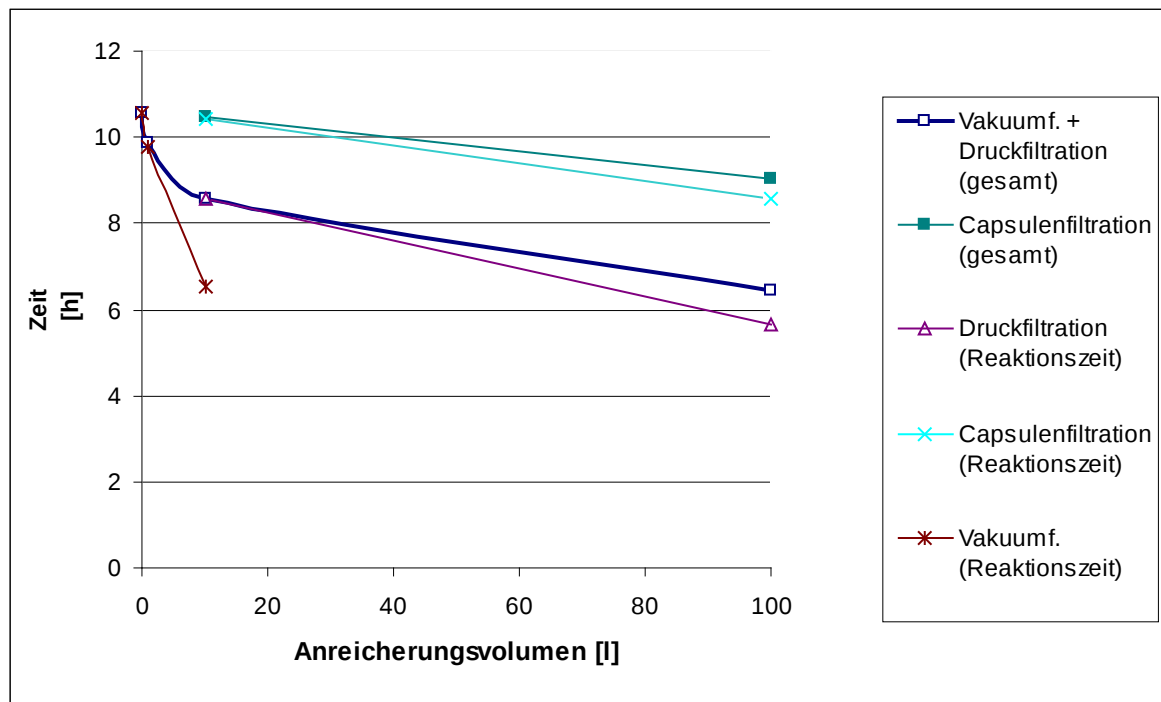


Abbildung 33: Reaktions- und Untersuchungszeiten in Abhängigkeit des Anreicherungsvolumens für die untersuchten Anreicherungsverfahren (Vakuumfiltration, Druckfiltriereinheit und Capsule)

Der gebogene Teil der dunkelblauen Linie, der bis zu dem Volumen von 10 Litern der Gesamtuntersuchungsdauer mittels Vakuumfiltration entspricht, weicht überproportional von der linear abfallenden dunkelroten Linie der Reaktionszeit der vakuumfiltrierten Probe ab. Diese überproportionale Aufweitung impliziert, dass die Anreicherungsverfahren für steigende Volumina immer ineffizienter wird, da die Untersuchungsdauer durch die Dauer der Anreicherung in einem immer stärker werdenden Ausmaß negativ beeinflusst wird. Der Zeitvorteil der Impedanzmessung, der durch Anreicherung des Keimmaterials erzielt wird, wird in Bezug auf die Gesamtuntersuchungsdauer durch die Dauer der Anreicherung selbst solange überproportional verringert, bis theoretisch die Linie der Untersuchungsdauer waagrecht bzw. steigend wird. Die Dauer der Anreicherung ist dann gleich bzw. größer als die durch die Anreicherung erzielte Reaktionszeitverkürzung. Die ursprüngliche Zeitersparnis der Impedanzmessung wäre damit durch das Verfahren der Anreicherung vollständig kompensiert.

Solche Reaktionen konnten auch bei der Versuchsdurchführung mittels der Druckfiltriereinheit beobachtet werden. Wären bei der Druckfiltration Zeiten für die Zwischenvolumina bestimmt worden, könnte man ebenfalls eine überproportionale Aufweitung zwischen den Linien der Gesamtuntersuchungsdauer und der Reaktionszeit beobachten, weil während des Verlaufes der Anreicherung von 100 Litern der Durchfluss merklich abnahm. Die Ursache hierfür ist in der allmählichen Verblockung des Filters durch Schwebstoffe zu suchen. Die Anordnung eines Vorfilters wie bei der Capsule verringert diesen Effekt.

Trotz der besten Filtrationseigenschaften der Capsule ergab sich bei beiden Volumina die längste Untersuchungsdauer für die getesteten Anreicherungsverfahren. Die Reaktionszeit der Impedanzmessung der 100 Liter Probe entsprach bei dieser Untersuchung zufällig sogar exakt der Reaktionszeit der druckfiltrierten 10 Liter Probe (siehe Tabelle 21). Allgemein haben die Linien der Capsulenfiltration in Abbildung 33 ein um rund 2 Stunden höheres Zeitniveau als die der Druckfiltration. Die Ursache hierfür dürfte in der Verwendung unterschiedlichen Filtermaterials begründet sein. Die Art des

Filtermaterials und Filterbeschaffenheit während der Inkubation nimmt anscheinend Einfluss auf das Untersuchungsergebnis. Die zur Anreicherung verwendeten Armaturen erforderten die Anwendung von Filtern unterschiedlichen Durchmessers, die von unterschiedlichen Herstellern stammten (siehe Kapitel 4.6.1, 4.6.2 und 4.6.3).

Somit ist auch unter Berücksichtigung der einfachen Handhabung der Capsule im Sinne von kürzeren Untersuchungsdauern und daher früher erzielbaren Ergebnissen einer Trinkwasseruntersuchung die Druckfiltriereinheit der Capsule bei gleichen Voraussetzungen zur Anreicherung vorzuziehen. Zudem handelt es sich bei der Capsule um ein Einwegprodukt mit hohem Preis.

Das günstigste Verhältnis aus gewünschter Reaktionszeitverkürzung und Wasserverbrauch bzw. Probenaufbereitung ergibt sich demnach bei der Anreicherung von einem Liter. Hier dauert die Untersuchung (Messung inklusive Probenvorbereitung) knapp unter 10 Stunden. Im Vergleich zum Standardverfahren (EN ISO 9308-1 (2000)), dessen Messdauer mindestens 24 Stunden beträgt, bedeutet dies vom Ansetzen der Probe bis zum Vorliegen der Untersuchungsergebnisse einen Zeitvorsprung von über 14 Stunden.

6.3 Betrachtung der anderen Methoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien

Im Zusammenhang mit den in Kapitel 3.4 beschriebenen alternativen Untersuchungsmethoden ergeben sich die im Folgenden dargestellten Vor- und Nachteile für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser.

Der Wunsch nach alternativen Bestimmungsmethoden in der Qualitätskontrolle von Trinkwasser ergibt sich vor allem aus dem bekannten Nachteil der langen Untersuchungsdauern der herkömmlichen Verfahren und dem damit verbundenen Problem, auf eventuell vorhandene Kontaminationen entsprechend reagieren zu können. Neben diesem hygienischen Aspekt geben auch andere gesundheitliche sowie wirtschaftliche Überlegungen der Etablierung neuer Untersuchungstechniken in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser Antrieb (siehe Kapitel 3.4).

Die Alternativmethoden stammen ursprünglich aus dem Bereich der mikrobiologischen Analytik bzw. der medizinischen Diagnostik. Im Folgenden wird auf die für die mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser relevanten Eigenschaften dieser Methoden eingegangen.

6.3.1 Herkömmliche biochemische Methoden

6.3.1.1 Multiple-tube fermentation Methode

Die MTF – Methode – als älteste Methode zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser - ist einfach auszuführen, relativ günstig und stellt geringe Ansprüche an die Laborausstattung und Personal. Sie kann sich jedoch insbesondere dann als sehr arbeitsintensiv und langwierig herausstellen, wenn eine große Anzahl von Verdünnungsreihen für jede Wasserprobe zu bereiten ist. Der hohe Zeitaufwand ergibt sich auch aus den langen Inkubationszeiten und den notwendigen Kultivierungsschritten für anschließende Bestätigungstests, die bis zu weiteren 48 Stunden beanspruchen können. Aus diesem Grund wird vielfach der Membranfiltertechnik für systematische Untersuchungen von Trinkwasser der Vorzug gegeben, doch bleibt die MTF - Methode

gerade unter jenen Bedingungen wertvoll, die den Einsatz der Membranfiltertechnik nicht zulassen, wie z.B. trübe und gefärbte Wasser.

6.3.1.2 Membranfiltration

Die Membranfiltertechnik ist heute in vielen Ländern das gesetzlich vorgeschriebene Standardverfahren zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser. Allerdings unterscheiden sich die zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien anzuwendenden Nährmedien (siehe Kapitel 3.4.1.2).

Die große Anzahl der modifizierten Medien spiegelt die Tatsache wider, dass die Membranfiltertechnik nicht vollkommen spezifisch ist. Dies konnte auch im Rahmen der gegenständlichen Verfahrensvergleichsuntersuchung festgestellt werden. Vergleicht man beispielsweise die Abbildung 22 in Kapitel 5.1.2.4, die eine Kolonie mit gelblich-oranger Farbentwicklung zeigt, mit der Abbildung 23 in Kapitel 5.1.2.4, die das Ergebnis des API Tests zeigt, so erkennt man, dass die für eine positive Identifizierung typische Kolonie auf einem Tergitolnährboden nicht mit dem API Testsystem identifiziert werden konnte. CRADDOCK et al. (1997), der geschädigte coliforme Bakterien in Trinkwasserversorgungsanlagen mittels Tergitol 7 Nährmedium und dem API Testsystem zur Identifizierung untersucht hatte, berichtet ebenfalls von diesem Widerspruch. Das ist offensichtlich eine Anomalie, weil diese Organismen das Enzym β -Galaktosidase besitzen mussten, um Laktose fermentieren zu können.

Da gegenwärtig kein universelles Nährmedium existiert, das die optimale Auszählung der verschiedenen coliformen Bakterien erlaubt, ist im Allgemeinen ein Bestätigungsschritt nach der ersten Inkubationsperiode notwendig. Dies führt dazu, dass die Ergebnisse einer Trinkwasseruntersuchung mittels Membranfiltration mehrere Tage benötigen.

Dessen ungeachtet ist die Membranfiltration aufgrund der relativen Einfachheit und der geringen Anforderungen an die Laborausstattung und das Personal eine wertvolle Technik für viele im Bereich der mikrobiologischen Trinkwasserkontrolle tätigen Labors.

6.3.2 Enzymatische Methoden

Die enzymatischen Methoden bilden eine attraktive Alternative zu den herkömmlichen Verfahren, und es wird bereits heute eine breite Palette an kommerziellen Produkten angeboten (siehe Kapitel 3.4.2), die auf dem enzymatischen Analyseprinzip zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser beruhen.

Das Analyseprinzip dieser Methoden - die enzymatische Aktivität von *E. coli* durch das diesem Bakterium eigenen Enzyms β -D-Glucuronidase und im Falle der coliformen Bakterien durch das für diese Gruppe eigenen Enzyms β -D-Galaktosidase nachzuweisen – bedingt hohe Spezifität. Dadurch ist kein zusätzlicher Bestätigungsschritt erforderlich, was die Analysezeit gegenüber den herkömmlichen Verfahren um mindestens 24 Stunden reduziert.

Bei dem kommerziellen Produkt Colilert®-18 (siehe Kapitel 3.4.2.1.1), das in einigen Ländern als dem gesetzlich vorgeschriebenen Standardverfahren gleichwertiges Verfahren anerkannt ist, beträgt die Inkubationszeit 18 Stunden. Dadurch ergibt sich ein weiterer Zeitvorteil von 6 Stunden gegenüber den Standardverfahren. Weiters entfällt durch das benutzerfreundliche Angebot der vorportionierten und probengerechten Snap-Päckchen mit Colilert®-18 – wie auch bei dem Produkt Colisure® (siehe Kapitel 3.4.2.1.2) - die bei den herkömmlichen Methoden oft zeitaufwendigen Vorarbeiten (wie zum Beispiel die Nährmedien bereiten), und der Arbeitsaufwand (wie zum Beispiel das Filtrieren bei

MF-Technik oder das Bereiten von Verdünnungsserien) beim Ansetzen der Proben selbst reduziert sich.

Der Colifast® Basistest (siehe Kapitel 3.4.2.2) zeigt eine positive Coliformenreaktion nach einer Inkubation von maximal 15 Stunden an und führt damit zu wesentlichen rascheren Ergebnissen als die herkömmlichen Methoden. Auch bei diesem Produkt wird der Arbeitsaufwand beim Ansatz der Proben minimiert, indem die Proben direkt in die mit dem spezifischen Colifast® Nährmedium vorgefüllten Fläschchen gegossen werden kann. Bei den beiden Anwendungen der Colifast® Technologie, dem Colifast Analyser (CA) und dem Colifast At-Line Monitor (CALM), liegen die Ergebnisse in Abhängigkeit der bakteriellen Kontamination innerhalb von 2 - 13 (max. 15) Stunden bei einem Detektionslimit von einem Coliform pro Probenvolumen vor (Herstellerangabe). Die weitgehende Automatisierung (Steuerung und Messung, Datenregistrierung und Protokollierung, Auswertung und Bearbeitung), die beim CALM die Probennahme und Befüllung der Fläschchen miteinschließt, resultiert weiters in einem verringerten Arbeitsaufwand. Die Möglichkeit der simultanen Meldung der Testergebnisse an einen unter Umständen entfernt gelegenen Kontrollraum ist als wertvolles Werkzeug für die Anwendung des CALM im Rahmen des sicheren Betriebs einer Wasserversorgungsanlage zu interpretieren.

Zusammenfassend zeichnen sich die enzymatischen Methoden durch Selektivität, Sensitivität und Schnelligkeit aus. Sie können - anders als bei dem Membranfiltrationsverfahren - auch bei Wässern mit hoher Begleitflora angewendet werden. Sie sind meist einfach und erfordern im Allgemeinen geringen Arbeitsaufwand.

6.3.3 Molekulare Methoden

Die Prinzipien der molekularen Methoden sind in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Sie wurden anfangs für die medizinische Diagnostik entwickelt. Der Einsatz von molekularen Methoden in der Trinkwasseruntersuchung ergibt sich aus dem geringen Zeitaufwand der Analyse und des hohen Grad an Sensitivität und Spezifität ohne aufwendige Kultivierungsschritte und nachträgliche Bestätigungstests. Einige der Methoden erlauben die Identifizierung von spezifischen kultur- oder nicht kulturfähigen Bakterien innerhalb von Stunden.

6.3.3.1 Immunologische Methoden

Immunologische Methoden sind schnelle und einfache Techniken zur Identifizierung von spezifischen Mikroorganismen, deren Genauigkeit von der Spezifität der Antikörper abhängt. Für die Detektion von *E. coli* und coliformen Bakterien waren die immunologischen Methoden noch nicht erfolgreich, vermutlich verbunden mit dem Problem der Kreuzreaktionen mit anderen Bakterienstämmen (ROMPRE et al., 2002).

6.3.3.2 Nukleinsäure basierende Methoden

Die Schritte der Polymerasekettenreaktion- (PCR-) Prozedur können in rund 3 bis 4 Stunden durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.4.3.2.1). Damit lassen sich Krankheitserreger wesentlich rascher detektieren als es mit den herkömmlichen Kultivierungsverfahren möglich ist.

FRICKER et al. (1997) hat PCR für den Bestätigungsschritt von vermutlichen *E. coli* Kolonien (aus Wasser gewonnen) angewendet und berichtet von akzeptablen Ergebnissen. Durch die der PCR vorausgehenden Kultivierung konnte das Problem, dass PCR auch DNA von toten Zellen registriert, umgangen werden. Die bestätigten Ergebnisse können in weniger als 24 Stunden vorliegen.

Von weiteren Versuchen die PCR auf die Detektion von *E. coli* und coliformen Bakterien anzuwenden berichten ROMPRE et al. (2002). Es wird resümiert, dass obwohl die PCR Amplifikation der DNA mit einigen Erfolg für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien verwendet wurde, noch viele Restriktionen überwunden werden müssen, bevor diese Methode für die sensitive Analyse von Coliformen in Trinkwasserproben verwendet werden kann.

Auch bei der in Kapitel 3.4.3.2.3 beschriebenen Microarray Technologie können sich die Analysezeiten auf bis zu 4 Stunden reduzieren. Da diese Untersuchungssysteme die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelnachweisen in biologischen Proben erlauben, wäre es bei entsprechenden Entwicklungen für eine praktische Anwendung in der Qualitätskontrolle von Trinkwasser vorstellbar, dass die Proben (neben den gängigen Indikatororganismen auch) direkt auf Krankheitserreger untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der molekularen Methoden festhalten, dass sie oftmals sensitiver und selektiver als herkömmliche Methoden sind und Ergebnisse auch rascher liefern (innerhalb von Stunden). Sie erlauben die gezielte Bestimmung von Pathogenen und - als direkte Verfahren - auch die Identifizierung von nicht kultivierbaren Spezies. Auf der anderen Seite sind die Verfahren mitunter auf teure Apparaturen und geschultes Personal angewiesen. So werden im Moment die molekularen Methoden in der Trinkwasseruntersuchung nur bei Lösung spezieller mikrobiologischer Problemstellungen angewendet.

6.3.4 Elektrochemische Methoden

In Kapitel 3.4.4 sind Beispiele für elektrochemische Methoden angegeben und deren Funktionsweisen bei der Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien dargestellt. Für ihre Anwendung im Bereich der routinemäßigen Trinkwasserkontrolle zeichnen sie sich nicht nur durch kürzere Analysezeiten gegenüber den herkömmlichen Verfahren sondern auch durch weitgehende Automatisierung aus. Dadurch sinkt der Arbeitsaufwand und ein erhöhter Probendurchsatz wird möglich.

Bei den elektrochemischen Bestimmungsmethoden hängt die Detektionszeit von der Belastung der Probe ab, da sich die jeweilig betrachtete physikalische, chemische oder elektrische Eigenschaft der Nährlösung in Abhängigkeit der mikrobiellen Tätigkeit der Organismen ändert. Dies ermöglicht hohe Belastungen bzw. Ausnahmesituationen frühzeitig zu erkennen und rasch Abhilfemaßnahmen einleiten zu können.

Für das in Kapitel 3.4.4.1 beschriebene Verfahren Colitrack gibt der Hersteller an, dass ein *E. coli* unter 11 Stunden detektiert wird. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das in der vorliegenden Verfahrensvergleichsuntersuchung beschriebene Impedanzverfahren (siehe Kapitel 3.4.4.2) mit dem Messsystem Bac Trac 4100 (siehe Kapitel 4.4) festgestellt werden. Vorhandene Belastungen der Proben waren in der Regel innerhalb von 8 bis 14 Stunden detektiert. In beiden Fällen ergibt sich ein Zeitvorteil sowohl gegenüber den herkömmlichen Untersuchungstechniken als auch gegenüber den enzymatischen Methoden. Für weitere Ergebnisse des in dieser Arbeit beschriebenen Methodenvergleichs zwischen der Standardmethode nach EN ISO 9308-1 (2000) und dem Impedanzverfahren mit dem Messsystem Bac Trac 4100 wird auf die entsprechenden Kapiteln 5.1.3 und 6.1 verwiesen.

Die Messelektronik wird bei den elektrochemischen Methoden durch einen Computer gesteuert. Weiters übernimmt der Computer die Datenregistrierung und Speicherung sowie die Protokollierung. Dies schafft Unabhängigkeit vom herkömmlichen Laborbetrieb und ermöglicht auch Messungen während der Nachtstunden. Entsprechende Software vereinfacht Auswertung und Bearbeitung der Untersuchungsdaten. Durch Kombination mit modernen Kommunikationstechniken kann eine Fernüberwachung der

bakteriologischen Qualität bzw. eine Alarmierung der zuständigen Stellen umgesetzt werden.

Abschließend stellen die elektrochemischen Methoden aufgrund der in Abhängigkeit der Trinkwasserbelastung kurzen Analysezeiten und den Vorteilen die sich aus der weitgehenden Automatisierung dieser Verfahren ergeben für die Wasserversorger eine attraktive Alternative zu den herkömmlichen Methoden für die routinemäßige Qualitätskontrolle von Trinkwasser dar.

7. Zusammenfassung

Aufgrund der Fortschritte der mikrobiologischen Analytik der letzten Jahre stehen heute eine Reihe neuer Methoden und Verfahren mit unterschiedlichen Analyseprinzipien (enzymatisch, molekularbiologisch, elektrochemisch,...) für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser zur Verfügung. Es wurde hier ein Überblick über die Prinzipien und Funktionsweisen dieser alternativen Verfahren und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser gegeben. Schwerpunktmäßig erfolgte eine vergleichende Untersuchung zwischen der neuen Methode der spezifischen Impedanztechnik und dem anerkannten Verfahren der Membranfiltration für die Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien in Trinkwasser.

Die spezifische Messtechnik des Impedanzverfahrens wird seit einigen Jahren erfolgreich für die Gütekontrolle von Lebensmitteln (Milch und Milchprodukte, usw.) eingesetzt. Für das Lebensmittel Trinkwasser, das naturgemäß eine im Vergleich sehr geringe Anzahl von Mikroorganismen enthält, war das spezifische Impedanzmesssystem Bac Trac 4100, eine Entwicklung der Firma Sy-Lab, an die Erfordernisse der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser anzupassen.

Hierfür wurden im mikrobiologischen Labor des Instituts für Siedlungswasserbau, Industriewirtschaft und Gewässerschutz der Universität für Bodenkultur Wien eine Verfahrensvergleichsuntersuchung nach ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN 16140 (2000) (Entwurf) durchgeführt, um das Impedanzmesssystem Bac Trac 4100 auf seine Eignung zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser zu prüfen. Es wurden im Zeitraum vom 21.04.2002 bis 01.04.2002 490 Wasserproben sowohl mit dem gesetzlich gültigen Standardverfahren der Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000) als auch mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem spezifischen Coliformenmedium BiMedia 165A untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Weiters wurde am 20. 08. 2002 ein Anreicherungsversuch zur Vermehrung des Keimmaterials durchgeführt, um die daraus resultierende Verkürzung der Untersuchungsdauer abzuschätzen. Dabei wurde die Praxisstauglichkeit von drei verschiedenen Anreicherungsverfahren (Vakuumfiltration, Druckfiltration, und Capsule) geprüft.

In jüngerer Zeit wird der indikative Wert der coliformen Bakterien in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser diskutiert. Die wesentlichen Kritikpunkte am coliformen Konzept wurden in dieser Arbeit dargestellt.

Nachfolgend sind die wesentlichen Ergebnisse zusammengefasst:

- Die vorliegende Vergleichsuntersuchung (Membranfiltrationsverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000) vs. Impedanz Splitting Methode mit dem Messsystem Bac Trac 4100 der Firma Sy-Lab) zeigt, dass die Impedanzmessung mit dem Messsystem Bac Trac 4100 in Kombination mit dem Coliformenmedium BiMedia 165 A zur Feststellung einer fäkalen Belastung von Trinkwasser Ergebnisse liefert, die sich nicht signifikant von der EN ISO – Methode 9308-1 (2000) unterscheiden.
- Im Detail ergibt der Methodenvergleich (Validierung) nach ISO/DIS 16140 (1999) und ÖNORM EN 16140 (2000) (Entwurf) zwischen der Impedanzmessung und dem Referenzverfahren nach EN ISO 9308-1 (2000) folgendes Bild für die Impedanz Splitting Methode:
 - o eine relative Spezifität von 98,5 %
 - o eine relative Genauigkeit von 91,2 %
 - o eine relative Empfindlichkeit von 59,8 %

- Das Messsystem Bac Trac 4100 liefert rascher Ergebnisse als die herkömmliche Membranfiltrationsmethode nach EN ISO 9308-1 (2000).
- Proben, die eine höhere Belastung aufweisen, sind nach wenigen Stunden sicher zu detektieren.
- Eine zusätzliche und erwünschte Messzeitverkürzung lässt sich durch Anreicherung des Keimmaterials erzielen.
- Die erzielbare Verkürzung der Reaktionszeit ist abhängig vom Anreichervolumen und den verwendeten Filtertyp.
- Die gesamte Untersuchungsdauer bei Anreicherung des Keimmaterials wird stark von der angewandten Filtrationsmethode beeinflusst.
- Bei einer Abwägung zwischen möglicher Reaktionszeitverkürzung und erforderlichen Arbeitsaufwand bei der Probenvorbereitung erweist sich ein Probenvolumen von einem Liter als zweckmäßig. Gemessen am Referenzverfahren (EN ISO 9308-1(2000)) ergibt sich eine Verkürzung der Untersuchungsdauer um mehr als die Hälfte.
- Die Methode der Impedanzmessung mittels des Messsystems Bac Trac 4100 ermöglicht die Automatisierung eines kulturellen Verfahrens.
- Für die Routinediagnostik im Rahmen des Trinkwassermonitorings ergibt sich dadurch ein erhöhter Probendurchsatz.
- Durch die Möglichkeit der Festlegung eines Schwellenwertes, der gleichsam die Belastungsgrenze definiert, verkürzen sich die Nachweiszeiten deutlich.
- Die verkürzten Nachweiszeiten stellen einen entscheidenden Vorteil dar, da gegenüber den meisten anderen Methoden früher auf eventuelle Kontaminationen mit entsprechenden Maßnahmen reagiert werden kann.
- Das Messsystem Bac Trac 4100 in Verbindung mit herkömmlichen PCs zur Steuerung und Speicherung der Messung vereinfacht die vollständige Dokumentation von Trinkwasserbeurteilungen.
- Die automatische Steuerung des Messvorgangs mit automatischer Datenspeicherung schafft Unabhängigkeit vom herkömmlichen Laborbetrieb und ermöglicht beispielsweise die Protokollierung des Untersuchungsergebnisses auch während der Nachtstunden.
- Die Möglichkeit der Kopplung der Analysesoftware mit Medien der modernen Kommunikation wie beispielsweise SMS oder E-Mail ermöglicht bei einer Überschreitung des Schwellenwertes unverzüglich Alarm zu übermitteln. Bei weiterer Automatisierung könnten auch Abwehrmaßnahmen selbsttätig eingeleitet werden.
- Die Dauerhaftigkeit und Wiederverwendbarkeit des Systems und der Messzellen minimieren den Verbrauch und die Entsorgung eines Labors.
- Zur weiteren Vereinfachung des Arbeitsaufwandes empfiehlt es sich die Messzellen in Kombination mit einer geeigneten Konzentration der Nährlösung an die Erfordernisse der mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Trinkwasser anzupassen.
- *E. coli* ist ein bewährter Indikator, um eine fäkale Belastung des Trinkwassers anzuzeigen.
- Die coliformen Bakterien weisen Eigenschaften auf, die ihren indikativen Wert bei der hygienischen Beurteilung von Trinkwasser relativieren. Bekannte Schwächen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- o Die coliformen Bakterien decken nicht das gesamte Spektrum der durch mikrobiologisch verunreinigtes Trinkwasser übertragbaren Krankheitserreger ab.
 - o Die coliforme Bakterien sind ein adäquater Indikator für eine potentielle Kontamination des Wassers mit Bakterien und Viren aber kein adäquater Indikator für Kontaminationen mit Protozoen.
 - o Je nach zugrundeliegender Definition der coliformen Bakterien und Untersuchungstechnik weist die Gruppe der Coliformen eine variierende Anzahl von Vertretern auf, die keinen fäkalen Ursprung haben.
- Nachverkeimung bedingt eine Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers und ist von einer Vielzahl von komplexen und zusammenhängenden Faktoren beeinflusst, was die Wasserversorgung in der Kontrolle dieser vor eine schwierige Aufgabe stellt.
- Die coliformen Bakterien sind eine sehr heterogene Gruppe, deren Definition sich aus der angewandten Untersuchungstechnik ergibt.
- Die gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien sind in den entsprechenden nationalen und internationalen Regelwerken als Standardverfahren festgelegt.
- Daneben gibt es heutzutage eine breite Auswahl an Alternativmethoden zur Bestimmung von *E. coli* und coliformen Bakterien, deren Messtechnik auf unterschiedlichen Prinzipien (z. B. enzymatisch, molekularbiologisch, elektrochemisch, ...) beruhen.
- Diese neuen Methoden weisen verschiedene Vorteile gegenüber den herkömmlichen ISO-Referenzverfahren (Standardverfahren) auf. Aus hygienischer Sicht sind dabei die meist rascher erzielbaren Ergebnisse einer Trinkwasseruntersuchung mittels dieser alternativen Methoden hervorzuheben.
- Europaweit besteht Uneinigkeit bzgl. dieser Alternativmethoden; beziehungsweise die unterschiedliche Bereitschaft diese alternativen Verfahren in den entsprechenden nationalen Normen als „zulässige alternative Verfahren“ anzuerkennen.
- Beispielsweise ist die enzymatische Bestimmungsmethode für *E. coli* und coliforme Bakterien mit Colilert®-18 in zahlreichen europäischen Ländern als gleichwertiges bzw. als zulässiges alternatives Verfahren anerkannt in Österreich jedoch - auch auf absehbare Zeit - nicht.
- Das Interesse der Wasserversorger an neuen Bestimmungsmethoden für *E. coli* und coliformen Bakterien, die vor allem den bekannten Nachteil der langen Analysezeiten der Standardverfahren beseitigen, die zahlreichen Entwicklungen von Methoden zur raschen Beurteilung der Trinkwasserqualität und die unterschiedlichen europäischen „Verhaltensmuster“ bei der Anerkennung neuer Verfahren werden auch zukünftig für Diskussion sorgen.

8. Literatur

- ALLAN, M.J., EDBERG, S.C.: The Public Health Significance of Bacteria Indicators in Drinking Water, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 176-181, (1997)
- Australian Drinking Water Guidelines: National Health and Medical Research Council (NHMRC) in Kooperation mit Natural Resource Management Ministerial Council (NRMMC), (2004); verfügbar <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/eh19syn.htm>
- BLOCK, J.C.: Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, in: Biofilms – Science and Technology, Herausgeber: L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher and M. Capdeville, NATo Advanced Study Institute, 469-485, (1992) verfügbar books.google.at
- BLOCK, J.C. , MOUTEAUX L. , GATEL, D. , RESONER, D.J.: Survival and Growth of *E.Coli* in Drinking Water Distribution Systems, , in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 158-165 (1997)
- Colliert, IDXX Laboratories: Coliforme und *E.coli* in Wasser (1997)
- COLQUHOUN, K.O. , TIMMS, S. , FRICKER C.R.: Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology, Journal of Applied Bacteriology 79, 635-639, (1995)
- CRADDOCK, J.L., CASTLE, R.G.: Viable but Injured Coliforms In Drinking Water Supplies, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 182-188, (1997)
- CRAUN, G.F., BERGER, P.S., CALDERON, R.L.: Coliform Bacteria and Waterborn Disease Outbreaks, Journal of the American Water Works Association, 3, 96-104, (1997)
- CRAUN, M.F., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L., BEACH, M.J.: Waterborne Outbreaks Reported in the United States, Journal of Water and Health, 04.Suppl 2, 19-30, (2006)
- DUTKA, B.J.: Coliforms are an inadequate index of water quality, J. Environ. Hlth. 1973; 36:29-46, (1973)
- EN ISO 9308-1: 2000 Nachweis und Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien Teil 1: Membranfiltrationsverfahren (2000)
- EPA Drinking Water Quality Standards: United States Environmental Protection Agency, (2002); verfügbar <http://www.epa.gov>
- ESCHERICHIA, T: Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings, Fortschr. Med. 1885; 3(16): 515- u. 547
- FRICKER, E.J., FRICKER, C.R.: Use Of The Polymerase Chain Reaction To Detect *Escherichia Coli* In Water and Food, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 12-17, (1997)
- GELDREICH, E.E.: Reinventing Microbial Regulations for Safer Water Supplies, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 218-219, (1997)

- GELDREICH, E.E.: Coliforms: A New Beginning To An Old Problem, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 3-11, (1997, a)
- Gerätehandbuch Bac Trac 4100 (1994). Sy-Lab GmbH
- Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table: herausgegeben von Health Canada im Auftrag des Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water (CDW), (2008); verfügbar <http://www.hc-sc.gc.ca>
- Hygieneverordnung (HyV) des EDI vom 23. November 2005, (2005); verfügbar http://www.admin.ch/ch/d/sr/c817_024_1.html
- International Standard ISO 9308-2: Water Quality - Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* – Part 2: Multiple tube (most probable number) method; International Organisation for Standardization (1990)
- KÖSTER, W., EGLI, T.: Molekulare Methoden in der mikrobiellen Trinkwasseranalytik, BIOSpektrum, 8. Jahrgang, 4, (2002)
- LeCHEVALLIER, M.W., SCHULTZ, W., LEE, R.G.: Bacterial Nutrients in Drinking Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 3, 857-862, (1991)
- LeCHEVALLIER, M.W., WELCH, N.J., SMITH, D.B.: Full-Scale Studies of Factors Related to Coliform Regrowth in Drinking Water, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, No. 7, 2201-2211, (1996)
- MANULA, L., MIETTINEN, I.T., von BONSDORF, C.H.: Norovirus Outbreaks from Drinking Water (2005), Übersetzung ins Deutsche von R.Frentzel-Beyme, umwelt medizin gesellschaft, 19: 140-145, (2/2006)
- MERCK Herstellerangabe: Laktose TTC Agar with Tergitol®7, selective differential medium for the detection and enumeration of *E. coli* und coliform bacteria in water using the membrane filtration method, Merck Microbiology Manual 12th Edition, zuletzt eingesehen (2008)
- MOMBA, M.N.B, CLOETE, T.E., VENTER, S.N, KFIR, R.: Evaluation of the impact of disinfections processes on the formation of biofilms in potable surface water distribution systems, Water Sci. Technol., 38 (8/9), 283-289, (1998); verfügbar <http://www.wrc.org.za>
- MOMBA, M.N.B, KFIR, R., VENTER, S.N., CLOETE, T.E.: An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality, Water SA, Vol. 26, No. 1, p 59-66, (2000); verfügbar <http://www.wrc.org.za>
- MOMBA, M.N.B, MAKALA, N.: Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems, Water SA, Vol. 30, No. 2, p 175-182, (2004) verfügbar <http://www.wrc.org.za>
- MOORE, A.C., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L., HIGHSMITH, A.K., JURANEK, D.D.: Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks – United States, 1991-1992, Epidemiology Programm Office, Center for Disease Control and Prevention (CDC), Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, Vol. 42/No. SS-5: 1-22 (1993); verfügbar u.a. <http://www.cdc.gov>
- ÖNORM EN ISO 16140 Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln Arbeitsvorschriften für die Validierung alternativer Verfahren (1999)
- Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch

- RIDGWAY, H.F., OLSON, B.H.: Chlorine Resistance Patterns of Bacteria from Two Drinking Water Distribution Systems, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 44 No. 4, p. 972 – 987, (1982)
- ROGERS, J., DOWSETT, A.B., DENNIS, P.J., LEE, J.V., KEEVIL, C.W.: Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems, *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 60 No. 6, p. 1842 – 1851, (1994)
- ROMPRE, A., SERVAIS, P., BAUDART, J., de-ROUBIN, M.R., LAURENT, P.: Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches, *Journal of Microbiological Methods*, Vol.49, p 31-54, (2002)
- SARTORY, D., MANJA, L., BLAZER, R.: Definitionen von *E. coli* und coliformen Bakterien und ihre Folgen in der Praxis, *energie / wasser-praxis* 3:32-35, (2007)
- SCHLEGEL, H., G.: Allgemeine Mikrobiologie, 6 überarbeitete Auflage unter Mitarbeit von Karin Schmidt, Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, (1985)
- STANDARD METHODE 9221 B. Standard Total Coliform Fermentation Technique Draft (2003); verfügbar <http://www.epa.gov>
- STEVENS, M., ASHBOLT, N., CUNLIFFE, D.: Review of Coliforms As Microbial Indicators of Drinking Water Quality, Recommendations to Change the Use of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality, National Health and Medical Research Council, 1-42 (2003)
- THOMAS, B., WILLIAMS, R., FOSTER, S., GRANT, P.: The Development And Evaluation Of A New System For The Simultaneous Enumeration Of Coliforms And *E. Coli* in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 182-188, (1997)
- UNI Wien: Übersichtsarbeit Indikatorkeime: Enterobakterien, Coliforme und *Escherichia coli* (Indikator- und Index-Keime: (K)ein zeitgemäßes Konzept?), 1-10, (2009), verfügbar <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/coliformenvortrag.pdf>
- van der WENDE, E., CHARACKLIS, W.G.: Biofilms in Potable Water Distribution Systems, in: Mc Feters GA (ed.) *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*. Springer-Verlag New York, Inc., New York., 249-268 (1990)
- Verordnung des Bundesministers für soziale Sicherheit und Generationen über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TWV), BGBl II – Ausgegeben am 21 August 2001 - Nr.304, 1805-1822, (2001), verfügbar <http://www.ris.bka.gv.at>
- Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen, mit der die Trinkwasserverordnung geändert wird, BGBl II – Ausgegeben am 6. Juli 2006 - Nr.254, 1-8, (2006), verfügbar <http://www.ris.bka.gv.at>
- Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV), BGBl I S. 959, (2001); verfügbar http://bundesrecht.juris.de/trinkwv_2001/index.html
- WAITE, W.M.: Drinking water standards: A personal perspective. Proceedings of the U.K. Symposium on Health-Related Water Microbiology. International Association on Water Pollution Research and Control, 52-65, London, UK (1991)
- WAITE, W.M.: Drinking Water Quality Regulations – A European Perspective, in: Coliforms and *E. coli* Problem or Solution?, Herausgeber C. Fricker, D. Kay, The Royal Society of Chemistry, Special Publication No. 191, 208-217 (1997)

- WHO Guidelines for Drinking water Quality, Third Edition, World Health Organisation, Geneva, (2004); verfügbar http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3rev/en/index.html
- wissenschaft online, Wissenschaft im Überblick: Rasterelektronenmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* (2009), verfügbar <http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/biok/3858>
- ZIBUSCHKA, F.: Endbericht Impedanzverfahren (Messsystem Bac Trac 4100), (2002)
- ZIBUSCHKA, F.: Mikrobiologische Trinkwasserqualität im Lichte alter und neuer Untersuchungstechniken, Wissenschaft und Umwelt, Nr. 7, 41-48, (2003), verfügbar http://www.fwu.at/wu_print/2003_07_wasser_2.pdf
- ZIBUSCHKA, F., Lindner, G.: Alternative mikrobiologische Untersuchungsmethoden zur Bestimmung des Gütezustandes von Trinkwasser, Österr. Wasser- und Abfallwirtschaft, Nr. 1-2, 19-22, (2007)