

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Universität Tübingen**

**Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Nachweis von E. coli aus Wasserproben  
durch in-situ-Hybridisierung  
und molekularbiologische Verfahren**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
ANDREAS ALEXANDER BEYER**

**aus  
Tübingen**

**2006**

Dekan:  
1. Berichterstatter:  
2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth  
Professor Dr. K. Botzenhart  
Professor Dr. B. Flehmig

**Meinen lieben Eltern gewidmet**



## Verzeichnis der Abkürzungen

### Verzeichnis der Abkürzungen

23S	23 Svedberg
à	zu
A	Adenin
API	Analytical Profile Indexes
ATCC	American Type Culture Collection
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CCD	Charge-coupled Device
CY3	Carbocyanin 3
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dd-H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
dF/dT	F <sub>1</sub> -F <sub>2</sub> /T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> wobei F für Fluoreszenz und T für Zeit steht
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVC	Direct viable count
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanin
g	gramm, 10 <sup>-3</sup> Kilogramm
HDPE	High Density Polyethylen
l	Liter
µl	Mikroliter
LC-PCR	LightCycler <sup>®</sup> -Polymerase Chain Reaction
M	Molar
MF	Membran Filter
mg	Milligramm, 10 <sup>-6</sup> Kilogramm
min	Minute

## Verzeichnis der Abkürzungen

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPN	Most probable number
MTF	Multiple-tube-fermentation
MUG	Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid - Trihydrat
n	Anzahl der Proben
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	pondus Hydrogenii
pmol	pikomolar
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulphate
sec	Sekunden
T	Thymin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VBNC	Viable but non-culturable
VE-Wasser	Vollentsalztes Reinstwasser
VRBA	Violet red bile agar
X-GAL	Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
%	Prozent

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>2. Material</b>	<b>13</b>
2.1 Verwendete Mikroorganismen	13
2.2 Herkunft der Wasserproben	13
2.3 Reagenzien, Medien und Nährböden	14
2.4 Reagenzien für die bunte Reihe	15
2.5 Reagenzien und Medien für die FISH-Technik	15
2.6 Sonden	18
2.6.1 Sonde für FISH-Technik	18
2.6.2 Sonden für LightCycler®	19
2.7 Verbrauchsmaterial	19
2.8 Eingesetzte Geräte	20
<b>3. Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Anfangskontrolle der Wasserproben	23
Freiheit von <i>E. coli</i> , positive Nachweise mit Referenzmaterial	
3.1.1 Kulturelle Verfahren	23
3.1.2 FISH	23
3.2 Nachweis von <i>E. coli</i> mit Readycult®	27
3.3 Nachweis von <i>E. coli</i> mit der FISH-Technik	29
3.4 Nachweis von <i>E. coli</i> mit der Mikrokoloniehybridisierung auf Endo- und Tergitolagar	32
3.5 Nachweis von <i>E. coli</i> mit dem LightCycler®	34

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Anfangskontrolle durch Readycult <sup>®</sup> , bunte Reihe und FISH-Technik	41
4.1.1	Anfangskontrolle mit Readycult <sup>®</sup>	41
4.1.2	Anfangskontrolle FISH-Technik mit ECO 543	42
4.1.3	Anfangskontrolle der Wasserproben durch das Wasserlabor	43
4.2	Nachweis von <i>E. coli</i> mit Readycult <sup>®</sup>	43
4.2.1	Wachstumskontrolle mit API 20 E nach 24 h	43
4.2.2	Ergebnisse Readycult <sup>®</sup> nach 4 h Voranreicherungszeit	44
4.2.3	Ergebnisse Readycult <sup>®</sup> nach 8 h Voranreicherungszeit	44
4.2.4	Ergebnisse Readycult <sup>®</sup> nach 18 h Voranreicherungszeit	45
4.2.5	Ergebnisse Readycult <sup>®</sup> nach 24 h Voranreicherungszeit	46
4.3	Nachweis von <i>E. coli</i> mit der FISH-Technik	47
4.3.1	Wachstumskontrolle mit API 20 E nach 24 h	47
4.3.2	FISH mit ECO 543 nach 4 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon	47
4.3.3	FISH mit ECO 543 nach 8 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon	48
4.3.4	FISH mit ECO 543 nach 18 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon	49
4.3.5	FISH mit ECO 543 nach 24 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon	49
4.4	Nachweis von <i>E. coli</i> mit der Mikrokoloniehybridisierung auf Endo- und Tergitolagar	50
4.4.1	Wachstumskontrolle mit API 20 E nach 24 h	50
4.4.2	Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 2 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	51
4.4.3	Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 4 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	51
4.4.4	Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 6 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	52
4.4.5	Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 8 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	53

## Inhaltsverzeichnis

4.4.6	Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 2 h Vorreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	53
4.4.7	Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 4 h Vorreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	54
4.4.8	Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 6 h Vorreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	55
4.4.9	Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 8 h Vorreicherungszeit mit der Sonde ECO 543	55
4.5	Nachweis von <i>E. coli</i> mit dem LightCycler®	56
4.5.1	Ergebnisse LightCycler® nach 4 h Vorreicherungszeit in Lactose-Bouillon	56
4.5.2	Ergebnisse LightCycler® nach 8 h Vorreicherungszeit in Lactose-Bouillon	57
4.5.3	Ergebnisse LightCycler® nach 18 h Vorreicherungszeit in Lactose-Bouillon	57
4.5.4	Ergebnisse LightCycler® nach 24 h Vorreicherungszeit in Lactose-Bouillon	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1	Methoden	59
5.2	Untersuchung mit Readycult®	60
5.3	Untersuchung mit der FISH-Technik	61
5.4	Untersuchung mit der Mikrokoloniehybridisierung	63
5.5	Untersuchung mit dem LightCycler®	65
5.6	Standardisierung und Statistik	67
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>



## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

*Escherichia coli* gehört als gramnegatives, peritrich begeißeltes gerades Stäbchen zur normalen Darmflora von Mensch und Tier. Es dient als Indikatorkeim und sein Nachweis in Wasser und Lebensmitteln ist ein Hinweis auf fäkale Verunreinigungen. Die Trinkwasserverordnung fordert, daß in 100 ml keine Kolibakterien vorhanden sein dürfen, ebenso gilt für Badegewässer, daß in 100 ml nicht mehr als 100 Keime enthalten sein dürfen. Häufig kommt es im Zusammenhang mit *E. coli* zu Wundinfektionen, die in Krankenhäusern mit schon immunabwehr-geschwächten Patienten sehr gefürchtet sind. Die komplexe Antigenstruktur von *E. coli* beruht auf O- und H-Antigenen, wobei auch Fimbrienantigene beschrieben werden. Hieraus folgt eine Bezeichnung der Antigene mit Zahlen und der Serovare mit den betreffenden O-, H-, und K-Antigenen. So bezeichnet kann man *E. coli* klinisch in vier Gruppen unterteilen (Kayser, F. 1999):

**EPEC** (enteropathogene *E. coli*) sind säuglingspathogen und werden bestimmten O-Gruppen zugeordnet. Die Zugehörigkeit zu bestimmten O-Gruppen wurde im Lauf der Zeit mehrfach geändert und soll deswegen hier nicht dargestellt werden. Der Nachweis dieser Pathogenitätsfaktoren ist zurzeit noch Speziallaboren vorbehalten.

**EHEC** (enterohämorrhagische *E. coli*) sind Stämme von *E. coli* O:157; H:7, O:157; H-, O:26; H:11, O:111; H:8, O:111; H-, die Zytotoxine bilden und somit an Henle-407-Zellen adhärieren können. Sie rufen eine schwere, wäßrige bis hämorrhagische Enterokolitis oder ein hämolytisch-urämisches Syndrom bei Erwachsenen und Kindern hervor. Dieses Syndrom ist oft mit einem akuten Nierenversagen, einer Thrombozytopenie sowie einer Anämie verbunden.

**ETEC** (enterotoxinbildende *E. coli*) besitzen ein hitzeempfindliches, dem Cholera-toxin verwandtes Protein sowie ein hitzestabiles Peptid. Hierbei kommt es zu einer verminderten Absorption von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>, was in schweren Durchfällen zum Ausdruck kommt. Sie sind in den südlichen Ländern die häufigste Ursache der Reisediarrhoe.

## 1. Einleitung

**EIEC** (enteroinvasive *E. coli*) besitzen die Fähigkeit in die Epithelzellen des Dickdarms einzudringen um dort geschwürige Entzündungen auszulösen, die dem Krankheitsbild der Ruhr entsprechen.

Der Nachweis von *E. coli* erfolgt bei der Trinkwasseruntersuchung noch heute über den kulturellen Nachweis, der aber mindestens 24 h, unter Umständen sogar 48 h in Anspruch nimmt. Da *E. coli* aber pathogen ist, wäre es überaus wichtig einen schnelleren und zuverlässigen Test zu haben der über spezielle Sonden erfolgen könnte. Dies ist insbesondere in Krisenzeiten wie beispielsweise der Tsunami-Katastrophe in Asien und der Überschwemmungskatastrophe in Nordamerika sehr wichtig um der Bevölkerung kein mit *E. coli* belastetes Trinkwasser zu bieten und damit Epidemien vorzubeugen.

Hier setzt nun der Versuch an, *E. coli* aus Wasserproben mittels der in-situ - Hybridisierung zu identifizieren. Zu beurteilen war also einerseits die Zuverlässigkeit und andererseits der Zeitgewinn.

### 2. Material

#### 2.1 Verwendete Mikroorganismen

Es wurde *Escherichia coli* 500 (WR1) Reference Material von SVM (Niederlande) verwendet.

#### Positivkontrolle

Hierzu werden 4 Kapseln von *Escherichia coli* 500 (WR1) (500 *E. coli* pro Kapsel) in ein Reagenzglas mit 10 ml Peptonwasser gegeben und mit einem sterilen Stopfen verschlossen. Nach kurzem Mixen auf dem Vortex Genie wurde das Reagenzglas für 40 min in ein mit 38,5 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Alle 10 min wird das Reagenzglas entnommen und 10-15 sec gemixt bis sich dann nach 40 min die Kapseln gelöst haben. Nun wird das Reagenzglas für 15 min auf Eis gestellt. Die dann fertiggestellte Positivkontrolle sollte noch am selben Arbeitstag benutzt werden.

#### Negativkontrolle

Auf die gleiche Vorgehensweise werden 2 Discs *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Viva Diagnostika GmbH, Köln) wie bei der Positivkontrolle angesetzt und als Negativkontrolle verwendet.

#### 2.2 Herkunft der Wasserproben

Die verwandten Wasserproben entstammten Proben der routinemäßigen Trinkwasseruntersuchung des Institutes für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, sowie Proben von Leitungswasser, die von mir oder

## 2. Material

Mitarbeitern des vorgenannten Institutes aus zufällig ausgewählten Entnahmestellen in der Umgebung von Tübingen gewonnen wurden. Diese Wasserproben wurden nach kurzer Erhitzung des Wasserhahns mittels des Labogaz 470 Bunsenbrenners und 3 min laufenlassen des Wasser in HDPE 250 ml-Behälter gefüllt. Pro Wasserprobe mußten 4 solcher Behälter befüllt werden. In einer Kühlbox wurden sie dann ins Hygieneinstitut gebracht und bis zu ihrer Untersuchung im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt.

### 2.3 Reagenzien, Medien und Nährböden

#### DEV Laktose-Bouillon

Heipha Diagnostika

Pepton	30 g/l
Fleischextrakt	9 g/l
NaCl	15 g/l
Laktose	30 g/l
Bromkresolpurpur	60 mg/l
pH	7.20 +- 0,2

#### Lactose-TTC-Agar mit Tergitol-7

Heipha Diagnostika

Pepton	10 g/l
Fleischextrakt	5 g/l
Bromthymolblau	50 mg/l
TTC	25 mg/l
Hefeextrakt	6 g/l
Laktose	20 g/l
Tergitol-7	0,1 ml/l
Agar	12 g/l
pH	7,20 +- 0,2

## 2. Material

### Endo-Agar

	Heipha Diagnostika
Fleischpepton	13 g/l
Laktose	10 g/l
K-phosphat	3,5 g/l
Fuchsin	300 mg/l
Na-sulfit	4 g/l
Agar	20 g/l
Wasser	1000 ml
pH	7,50 +- 0,2

### Peptonwasser

	Heipha Diagnostika
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	9 g/l
Wasser	1000 ml
pH	7,20 +- 0,2

## 2.4 Reagenzien für die bunte Reihe

Api 20 E

bioMérieux Deutschland GmbH

## 2.5 Reagenzien und Medien für die FISH-Technik

**PBS:** (Phosphate Buffered Saline) 10x konzentrierte Lösung

NaCL	8,50 g (Merck)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	14,23 g (Merck)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35 g (Merck)
TWEEN20	1,00 ml

## 2. Material

Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit VE Wasser auf 1 Liter auffüllen und 15 min bei 121 °C autoklavieren

### **10 % SDS**

Serva

10 g in 90 ml VE Wasser bei ca. 70 °C lösen und 15 min bei 121 °C autoklavieren

### **1 M Tris pH 8**

Tris-HCL

Merck

Mit HCL auf pH 8 einstellen und autoklavieren.

### **5 M NaCL**

Merck

292 g in 708 ml VE Wasser lösen und 15 min bei 121 °C autoklavieren.

### **Formamid (HCONH<sub>2</sub>)**

3,7 % Formaldehyd Lösung

Merck

3,7 % Formaldehyd 1:10 mit PBS verdünnen und bei 4 °C aufbewahren.

**DAPI** (4,6-Diamidino-2-phenylindol):

Roth GmbH

2 µl Stammlösung mit 1ml PBS pH8 und 0,05 % Tween mischen.

## 2. Material

### **Antibleichmittel**

500 µl PBS pH8

500 µl Glycerin

10 mg/ml Ascorbinsäure

Uni Apotheke

Uni Apotheke

mischen und bei 4 °C aufbewahren.

### **Hybridisierungspuffer FISH**

700 µl ddH<sub>2</sub>O

100 µl Formamid

180 µl 5M NaCl

20 µl 1M Tris pH 8

1 µl 10 % SDS

wird in einem Eppendorf Cup angesetzt und ist für einen Objektträger ausreichend. Der Hybridisierungspuffer wird 9:1 mit der Sonde kombiniert.

### **Hybridisierungspuffer Mikrokoloniehybridisierung**

700 µl ddH<sub>2</sub>O

100 µl Formamid

180 µl 5M NaCl

20 µl 1M Tris pH 8

1 µl 10 % SDS

wird in einem Eppendorf Cup angesetzt und ist für einen Mikrofilter ausreichend.

Der Hybridisierungspuffer wird 9:1 mit der Sonde kombiniert.

## 2. Material

### Waschpuffer

5 ml 5M NaCl  
1 ml 1M Tris pH8  
44 ml dd H<sub>2</sub>O  
50 µl 10 % SDS

wird in einem 50 ml Falconröhrchen angesetzt und ist für einen Objektträger ausreichend.

### 2.6 Sonden

#### 2.6.1 Sonde für FISH

Die Oligonukleotid-Sonde wurde von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und am 5´ Ende mit dem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Die Sonde bindet an einen Abschnitt des rrlH Gens auf der 23S rRNA von *E. coli*. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da die 23S rRNA ca. 3000 Basen lang ist, und somit eine größere genetische Vielfalt als die 16S rRNA besitzt.

#### ECO 543

5´CY3-GCAGTCACACGCCTAAGC-3´

GC-Anteil: 61,1 %

T<sub>m</sub>: 48,8 °C

Arbeitskonzentration: 100 pmol/µl (gelöst in 551,6 µl Ampuwa)

Die Sonde wird bei –20 °C im Kühlschrank aufbewahrt, sowie mit dem Hybridisierungspuffer 1:9 kombiniert.

## 2. Material

### 2.6.2 Sonden für LightCycler®

Die Oligonukleotid-Sonden wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Diese codieren ein Abschnitt der Gensequenz des Enzyms  $\beta$ -Glucuronidase, das auf dem uidA-Gen von *E. coli* lokalisiert ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Charakteristikum von *E. coli* - ca. 97 % der *E. coli*-Stämme enthalten dieses Enzym - sowie einigen Shigellen unter den Enterobakterien und Vibrionaceen. Aufgrund dieser Eigenschaft erfolgte die Auswahl der Sonden für diese Versuchsreihe.

EC 3:

5´TAT-GAA-CTG-TGC-GTC-ACA-GCC-3´

GC-Anteil: 52,4 %

T<sub>m</sub>: 59,8 °C

Arbeitskonzentration: 100 pmol/µl (gelöst in 699 µl Ampuwa)

EC 4:

5´-CAT-CAG-CAC-GTT-ATC-GAA-TCC-3´

GC-Anteil: 47,6 %

T<sub>m</sub>: 57,9 °C

Arbeitskonzentration: 100 pmol/µl (gelöst in 699 µl Ampuwa®)

Als Mastermix werden nun beide Sonden 1:1 gemischt und bei -20 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.7 Verbrauchsmaterial

Readycult® Coliforms 100	Merck
Glasflaschen mit Deckel (250 ml)	Schott
Glas-Objektträger Superfrost® (76 x 26 mm)	Roth GmbH
Teflonbeschichtete Diagnostika	Roth GmbH
Objektträger für FISH (mit 10 Aussparungen 75 x 25 x 1 mm weiß)	

## 2. Material

Deckgläser	Roth GmbH
24 x 60 mm	
24 x 24 mm	
Rotilabo® Objektträgerkasten	Roth GmbH
Mehrwegpipetten aus Glas (1 ml, 5 ml und 10 ml)	
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Glasperlen	
Ampuwa® Infusionsflaschen zu 1000 ml	Boehringer, Ingelheim
Falconröhrchen	
15 ml FALCON 2096	
50 ml FALCON 2070	
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
0,5 ml	
1,5 ml	
Kovac's Indolreagenz	Merck
LightCycler® Kapillaren	Roche
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
LightCycler® – DNA Master SYBR Green I	Roche
Isopore™ Membrane Filters	Millipore
Filter Type: 0,4 µm HTTP01300	
Silikonstift	Dako, Hamburg
BD Plastikpak™	Becton Dickinson GmbH
Spritzen mit Luer-Lok™ 10 ml	
HDPE Behälter 250 ml mit 5 mg Natriumthiosulfat	Milian

### 2.8 Eingesetzte Geräte

Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH
Brutschränke (30 °C, 37 °C, 46 °C)	Memmert

## 2. Material

Eismaschine	Scotsman AF-1D
Epifluoreszenzmikroskop mit Filtersystem	Zeiss, Oberkochen
Filter für DAPI 365 nm	
Filter für Cy3 530-545 nm	
Bildausgabe	
3CCD Kamera	Sony
KS 300	Kontron Elektronik GmbH
Feinwaage MP300	Chyo
Hybridisierungsöfen	Hybaid® Mini 10 (MWG Biotech)
Kühlschrank mit -20 °C und +4 °C	Kirsch, Liebherr
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikroprozessor-pH-Meter	WTW
Reinstwasseranlage Seralpur pro90CN	Seral
Vortex Genie 2™	Bender und Hobein
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415	Eppendorf
Laborzentrifuge GR 412	Jouan IG 150
LightCycler®	Roche
Sterilbank Laminair HLB 2448	Heraeus
Wasserbad Julabo 20B	Julabo GmbH
Bunsenbrenner Labogaz 470	Roth GmbH
Metallblock Thermostat On-Block DB-1M	Techne
UV-Lampe (366nm)	Merck
Stainless Steel Filter Holders für 13 mm Filter	Millipore



### 3. Methoden

#### 3.1 Anfangskontrolle der Wasserproben

##### - Freiheit von *E. coli*, positive Nachweise mit Referenzmaterial

##### 3.1.1 Kulturelle Verfahren

Von den genommenen Wasserproben wurden 100 ml in 3-fach konzentrierte DEV-Laktose-Bouillon gegeben und in den mit 36 °C ± 1 °C temperierten Brutschrank für 24 h gestellt.

Weitere 100 ml der Wasserproben wurden in 250 ml Glasflaschen mit Schraubdeckel gefüllt und 1 Blister Readycult<sup>®</sup> coliforms 100 hinzugegeben, kurz geschwenkt und ebenfalls in den mit 36 °C temperierten Brutschrank für 24 h gestellt.

Nach 24 h wurden die Proben entnommen und untersucht. Die mit Readycult<sup>®</sup> versetzte Wasserprobe (Einzelheiten zu Readycult<sup>®</sup> unter 3.2) wies keinen Farbumschlag auf, sondern zeigte die dezent gelbliche Farbe wie bei Zugabe von Readycult<sup>®</sup> zu erwarten war.

Zusätzlich wurden die Proben durch das Wasserlabor des Hygieneinstitutes überprüft, wobei keine Belastung des Wassers mit *E. coli* festgestellt werden konnte.

##### 3.1.2 FISH

Mit diesen Wasserproben konnte das Procedere der am Hygieneinstitut praktizierten FISH-Technik geübt werden.

Die nach 24 h entnommenen DEV-Laktose-Bouillons zeigten eine leichte Trübung und mit dem darin vorhandenen Reagenzglas war eine Gasbildung zu beobachten.

### 3. Methoden

Aus dieser Bouillon wurden je 50 ml entnommen und in sterile Falconröhrchen gegeben, die mit Glasperlen (Schicht ca. 0,5 cm hoch) versetzt waren und für 10 min bei 4200 U/min in der Laborzentrifuge GR 412 zentrifugiert wurden. Es zeigte sich nach dem Zentrifugieren zwischen den Glasperlen ein Satz, der beim jetzigen Arbeitsschritt nicht aufgewirbelt werden durfte. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand abgesaugt, 50 ml PBS zum Waschen hinzugegeben und nochmals bei 4200 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nun konnten je 5 ml 96 % Alkohol tröpfchenweise zu den Falconröhrchen pipettiert werden, die dann für 5 min stehengelassen wurden. Danach wurde das Falconröhrchen auf dem Vortex gemixt und 5 ml PBS tröpfchenweise hinzugegeben und erneut gut auf dem Vortex gemixt. Von der für die Untersuchung mit der FISH-Technik hergestellten Ausgangslösung wurden 10 µl entnommen und auf einen teflonbeschichteten Objektträger in eine der Vertiefungen nach unten stehender Skizze pipettiert. In eine andere Vertiefung wurden 10 µl Negativkontrolle, die aus *Pseudomonas aeruginosa* bestand und in eine weitere 10 µl Positivkontrolle pipettiert, die aus *E. coli* bestand.

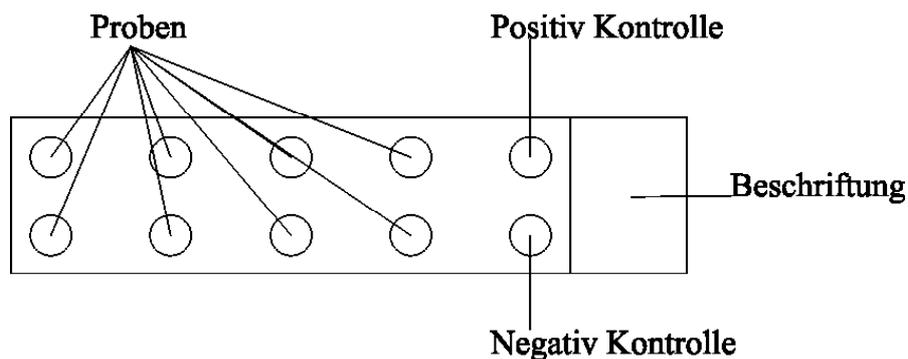


Abbildung 1: Zeichnung Objektträger

Der Objektträger wurde luftgetrocknet und anschließend 3-mal zur Hitze-fixierung durch die Bunsenbrennerflamme gezogen.

### 3. Methoden

Es folgte zur Zellentwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe in der der Objektträger jeweils 3 min in 50 %, 80 % und 90 % Alkohol verblieb und danach wieder luftgetrocknet wurde.

Währenddessen wurden der Hybridisierungspuffer und der Waschpuffer nach oben stehender Anleitung angesetzt.

Der Hybridisierungspuffer wurde hierbei in einer 10 % Lösung verwendet.

Hierzu kombinierte man pro Vertiefung des Objektträgers 9 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Sonde. Dies geschah am besten in einem neuen Eppendorf Cup, in das 12 µl Sonde und 108 µl Hybridisierungspuffer pipettiert und auf dem Vortex gemischt wurden. So erhielt man die fertige Oligonucleotid-Sondenlösung, von der also mehr als die benötigte Menge an Oligonucleotid-Sonde angesetzt wurden. Dies war notwendig, da immer ein gewisser Teil im Cup adhärent an der Wand verblieb und somit nicht für den Einsatz zur Verfügung stand. Von der so hergestellten 120 µl Sondenlösung wurden jeweils 10 µl in eine Vertiefung pipettiert, wobei man den Rest der im Cup verblieb verwarf.

Der Rest des angesetzten Hybridisierungspuffers wurde über ein Filterpapier geleert, das vorher in ein 50 ml Falconröhrchen gelegt wurde. Von der Oligonucleotid-Sonde wurden nun pro Vertiefung 10 µl auf den Objektträger pipettiert, der dann in das vorbereitete Falconröhrchen gelegt und mittels des Deckels gut verschlossen wurde. Der so behandelte Objektträger konnte für 1,5 – 12 h in den 46 °C Brutschrank gelegt werden. Für die nachfolgenden Untersuchungen war eine Zeit von 3 h mehr als ausreichend.

Währenddessen konnte man den Waschpuffer vorbereiten und ebenfalls in den mit 46 °C temperierten Brutschrank legen.

Nach 2 h wurde der Objektträger aus dem Falconröhrchen genommen, schnell - damit die Temperatur nicht zu weit absinkt - in den Waschpuffer gelegt und darin für 20 min gewaschen. Dieser Waschpuffer entfernte die noch frei verfügbaren Sonden, die nicht an die 23S rRNA gebunden sind, so daß man zur Auswertung nur fest an die rRNA gebundene Sonden vorfindet.

Danach entnahm ich den Objektträger, der sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet wurde. Hierbei bestand die Möglichkeit die

### 3. Methoden

Lufttrocknung in einem mit 36 °C temperierten Brutschrank vorzunehmen um die Wartezeit zu verkürzen.

Die nachfolgenden Arbeitsschritte mußten im Dunkeln erfolgen, da es sonst zu einer möglichen Zersetzung des Fluoreszenzfarbstoffes kommen würde und trotz ausreichender Photostabilität keine genaue Analyse mehr möglich wäre. Nach erfolgter Trocknung wurden pro Vertiefung des Objektträgers 10 µl DAPI pipetiert und 5 min im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend wurde er sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden zum Schluß noch mit ein paar Tropfen Antibleichmittel versehen und ein Deckglas blasenfrei aufgelegt.

Jetzt konnte die mikroskopische Auswertung mit dem Epifluoreszenzmikroskop und 2 verschiedenen Filtern (DAPI und CY3) erfolgen. Hierzu wurde der Objektträger in einem Objektträgerkasten zum Mikroskop gebracht und im abgedunkelten Raum ausgewertet. Eine positive Identifizierung erfolgte nur wenn DAPI und CY3 positiv waren. Da CY3 sein Absorptionsmaximum bei 550 nm und sein Emissionsmaximum bei 570 nm besitzt, kommt es unter dem CY3 Filter zu einem rötlichen-orangenem Aufleuchten der damit markierten *E. coli* Bakterien. Hierbei wurde das blaue Leuchten was noch unter dem DAPI-Filter zu sehen war durch das rote Fluoreszieren von Carbocyanin 3 (Indocarbocyanin) überstrahlt. Die so erhaltenen Ergebnisse konnten nicht nur schriftlich sondern auch mit einer eingebauten Kamera und einem daran angeschlossenen Computersystem mit Drucker auf Fotopapier festgehalten werden.

Nach vollständiger Auswertung der Wasserproben war unter dem Epifluoreszenzmikroskop keine Vorbelastung mit *E. coli* erkennbar, wogegen ein Nachweis von *E. coli* in den Positivproben möglich war.

### 3. Methoden

#### 3.2 Nachweis von *E. coli* mit Readycult®

Das Funktionsprinzip von Readycult® beruht auf der Zusammensetzung der Nährlösung in den Blistern.

„Die in der Bouillon enthaltene Nährstoffe und Phosphatpuffer gewährleisten ein schnelles Wachstum von Coliformen. Laurylsulfat hemmt weitgehend das Wachstum von gramnegativen Keimen. Der simultane Nachweis von Gesamtcoliformen und *E. coli* wird ermöglicht durch das chromogene Substrat X-GAL, welches von Coliformen gespalten wird und einen Farbumschlag der Bouillon nach blau-grün bewirkt. Das fluorogene Substrat MUG wird nur von *E. coli* gespalten und unter UV-Licht mittels Fluoreszenz nachgewiesen“ (zitiert aus: 1-2-3 fertig!, Merck).

Für die Auswertung ist es von ausschlaggebender Bedeutung, daß die benutzten Schraubdeckelgläser keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

Ein auftretender Farbumschlag der Bouillon nach blau-grün zeigt eine Belastung mit coliformen Keimen an. Ein Vorhandensein von *E. coli* wird mit Hilfe einer UV-Lampe mit einem Spektrum von 366 nm überprüft.

Erfolgt eine Fluoreszenz, so kann zur Sicherheit das Ergebnis noch mit der Indol-Reaktion - Kovac's Indolreagenz - verifiziert werden. Hierzu werden ca. 2,5 ml Kovac's Indolreagenz in die Bouillon pipettiert. Erfolgt daraufhin eine kirschrote Verfärbung an der Reagenzschicht ist die Anwesenheit von *E. coli* bestätigt.

Die Auswertung der Proben erfolgte anhand folgender Tabelle.

	Blau-grüner Farbumschlag	Fluoreszenz	Indol-Reaktion
Gesamtcoliforme	positiv		
<i>E. coli</i>	positiv	positiv	positiv
Negativ	gelbe Farbe		

Tabelle 1

### 3. Methoden

In leicht abgewandelter Version kann sie auch für die Auswertung benutzt werden.

Name der Probe	Blau-grüner Farbumschlag	Fluoreszenz	Indol-Reaktion
Gesamtcoliforme			
<i>E. coli</i>			
Negativ			
Kontrollzeit in Stunden (h)		Konzentration von <i>E. coli</i> in ml	

Tabelle 2

Unter zu Hilfenahme der *E. coli*-Tabletten wurde eine Lösung in Peptonwasser hergestellt. Dabei sollten in 1 ml rund 50 *E. coli* und in 100 µl rund 5 *E. coli* vorhanden sein, was durch Auflösen 1 *E. coli* Tablette in 10 ml PBS geschah. Dies erfolgte in einem Reagenzglas, das in einem mit 38,5 °C temperierten Wasserbad stand, in das 10 ml PBS pipettiert und 1 *E. coli* Tablette gegeben wurden. Nach 10 min wurde das Reagenzglas für 10-15 sec auf dem Vortex gemixt und wieder in das Wasserbad zurückgestellt. Dies wurde jeweils nach 20, 30 und 40 min wiederholt. Nach dem letzten mixen wurde das Reagenzglas für 15 min auf Eis gestellt und war nach Ablauf dieser Zeit einsatzbereit. Wichtig hierbei war, daß die Arbeitslösung noch am selben Arbeitstag verwendet wurde. Es erfolgte eine Wachstumskontrolle der angesetzten *E. coli* Lösung, indem je 100 µl auf Tergitol-7-Agar und Endoagar pipettiert und mit einem Glasspatel verstrichen wurden. Die Auswertung erfolgte nach 24 h im 36 °C Brutschrank mit dem API 20 E Testsystem.

Von den genommenen Wasserproben wurden jeweils pro Probe zwei Schraubdeckelgläser mit 100 ml Probe befüllt, beschriftet und in ein Glas 1 ml der hergestellten *E. coli*-Lösung und in das andere 100 µl pipettiert. In diese nun mit *E. coli* verunreinigten Proben gab man ein Blister ReadyCult® und schwenkte diese kurz. Anschließend erfolgte eine Voranreicherung der Proben im 36 °C Brutschrank. Nach jeweils 4, 8 und 18 h wurden die Proben kurzzeitig aus dem Brutschrank entnommen und optisch sowie mit der UV-Lampe kontrolliert. Der Nachweis erfolgte, sobald eine Fluoreszenz erkennbar war. Die Probe wurde

### 3. Methoden

dann als positiv auf *E. coli* bewertet. Nach 24 h erfolgt eine zusätzliche Überprüfung mit Kovac's Indolreagenz.

#### 3.3 Nachweis von *E. coli* mit der FISH-Technik

Amann et al. (1990) sowie DeLong et al. (1989) entwickelten die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit einer rRNA-gerichteten Oligonucleotid-Sonde zur Markierung und genetischen Typisierung einzeln, unzerstörter Bakterienzellen (Ganzzellhybridisierung), für die hier der auch anders verwendete Ausdruck FISH verwendet wird. Die Studien von Franks et al. (1998), Poulsen et al. (1994) und Bohnert et al. (2000) belegen die Wirksamkeit dieser Technik, die wegen der Unabhängigkeit von einer kulturellen Methode und des sparsamen Materialverbrauchs schnell und kostengünstig ist. Dieser Art des Nachweises geschieht über speziell angefertigte Sonden, die Sequenzen der 16S oder hier speziell der 23S rRNA besitzen. Die hierfür benötigten Sequenzen können der GenBank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> entnommen werden. Hier sind alle zur Zeit bekannten Sequenzen des Erbmaterials von *E. coli* zu finden.

Die Oligonucleotid-Sonde in meiner Versuchsreihe wurde von MWG-Biotech AG synthetisiert und am 5' Ende mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Carbocyanin 3 markiert. Diese Sonde bindet an einen Abschnitt des *rrlH* Gens, daß auf der 23S rRNA lokalisiert ist, und seit einiger Zeit auch zu Routineuntersuchungen im Wasserlabor des Hygieneinstituts eingesetzt wird.

Mit den zwei verschiedenen Filtersystemen - DAPI und CY3 - erfolgt auch hier die Identifizierung von *E. coli*.

Für diese Untersuchungsreihe wurden pro Probe zwei DEV-Laktose-Bouillonflaschen mit 100 ml Wasserprobe befüllt und einmal - wie bei der Untersuchung mit Readycult® erwähnt – mit 1 ml sowie 100 µl *E. coli*-Lösung versetzt und in den 36 °C Brutschrank gestellt.

### 3. Methoden

Nach 4 h wurden pro Flasche 10 ml entnommen und in ein 15 ml Falconröhrchen pipettiert. Wie bei der FISH-Technik im Teil Methoden beschrieben wurde das Falconröhrchen zentrifugiert aber diesmal mit 10 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und 5 ml 96 % Alkohol und 5 ml PBS zum Resuspendieren hinzupipettiert. Von den so behandelten Proben wurden je 1 ml in 1,5 ml Standardreaktionsgefäße gefüllt und in den Kühlschrank bei - 20 °C zur weiteren Auswertung mit dem LightCycler® bereitgestellt.

Von den so verbliebenen 9 ml im Falconröhrchen wurden pro Probe 10 µl pro Vertiefung auf die mit Teflon beschichteten Objektträger pipettiert und mit der FISH-Technik ausgewertet.

Diese Auswertung erfolgte am Anfang zum Teil durch zwei Personen. Wichtig war auch hier das Mitführen einer Positiv- und Negativkontrolle pro Objektträger als Reagenzienkontrolle.

Weitere 10 ml wurden nach 8, 18 und 24 h aus den DEV-Laktose-Bouillonflaschen genommen und wie in diesem Abschnitt beschrieben aufbereitet. Als Wachstumskontrolle der angesetzten *E. coli*-Lösung wurden je 100 µl auf Tergitol-7-Agar und Endoagar pipettiert und 24 h in den 36 °C Brutschrank gestellt und danach mit dem API 20 E Testsystem auf Wachstum von *E. coli* kontrolliert.

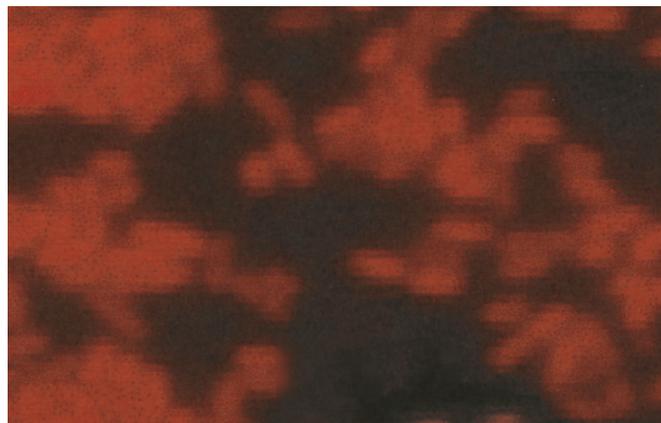


Abbildung 3: *E. coli* unter CY3 Filter

### 3. Methoden

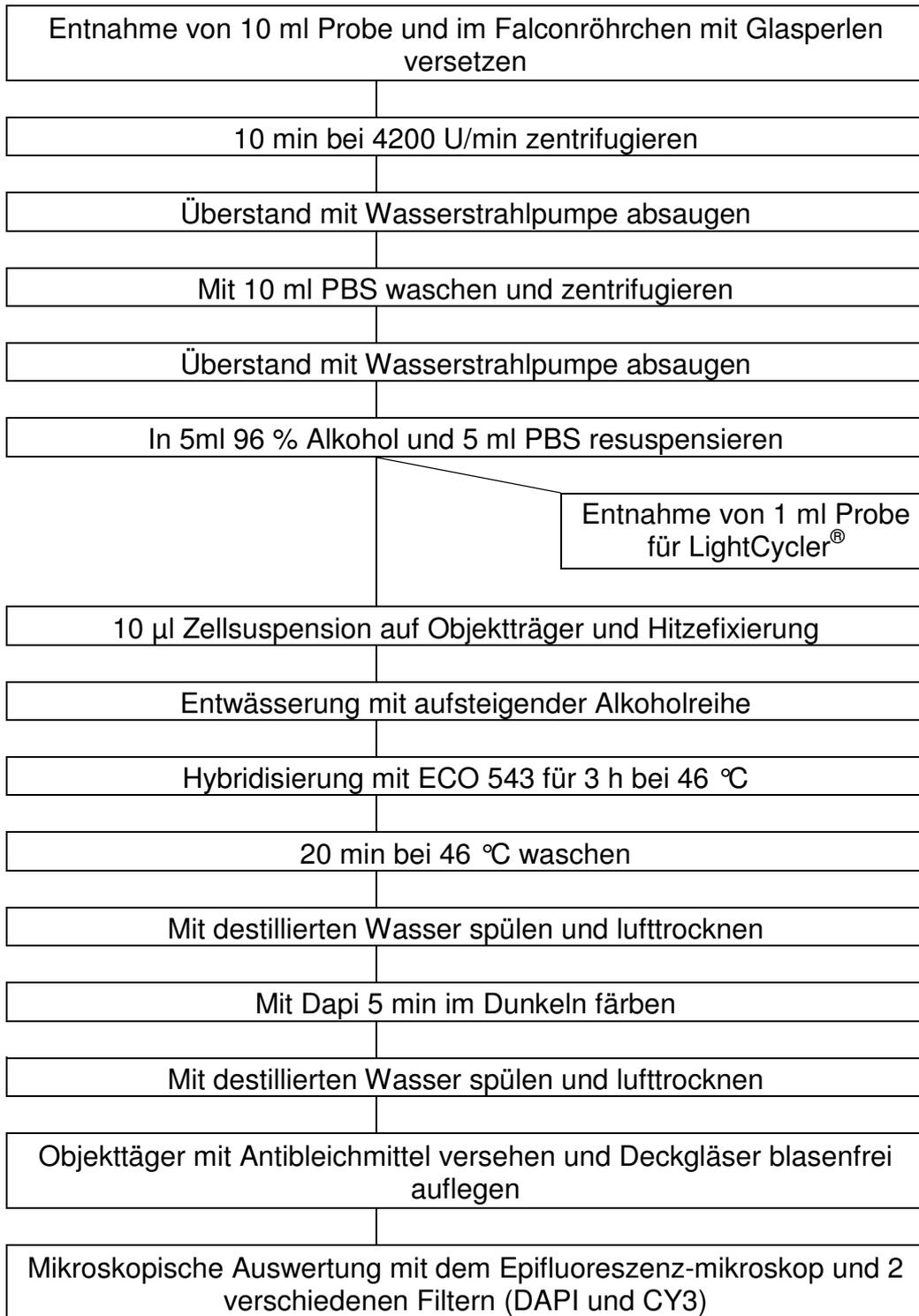


Abbildung 4: Arbeitsanweisung FISH-Technik

#### **3.4 Nachweis von *E. coli* mit der Mikrokoloniehybridisierung auf Endo- und Tergitolagar**

Meine Untersuchungen beruhen auf der Arbeitsanweisung von Bohnert, Hübner, Botzenhart (2000). Allerdings wurde sie für die hier folgenden Untersuchungen modifiziert, indem Tergitol-, Endoagar und kleinere Mikrofilter verwendet werden. Die hier benutzte Sonde ist mit der unter der FISH-Technik beschriebenen identisch.

Zur Untersuchung wurden 90 ml der Wasserproben aus den HDPE - Behältern in 250 ml Glasflaschen gefüllt und mit einer 10ml *E. coli*-Lösung versetzt – die ca. 500 *E. coli* enthält. So sind in 10 ml Wasserprobe etwa 50 *E. coli* (1 ml *E. coli*-Lösung) vorhanden. Auch hier erfolgte eine Wachstumskontrolle der *E.-coli* Lösung mit 100 µl auf Tergitol-7-Agar und Endoagar, die nach 24 h im 36 °C Brutschrank mit dem API 20 E Testsystem durchgeführt wurde.

Nach Verschluss mit einem Deckel wurde die Flasche gut geschüttelt. Aus dieser Flasche wurden 8 mal je 10 ml Probe mit einer 10 ml BD Plastikpak™ Spritze durch Stainless Steel Filter Holders, die mit Isopore™ Membran Filtern bestückt sind gepresst.

Vier der so behandelten Mikrofilter wurden auf Endoagar gelegt, die übrigen vier Mikrofilter auf Tergitolagar und anschließend im 36 °C Brutschrank inkubiert.

Weitere 99 ml Wasserprobe wurden wie oben beschrieben in Glasflaschen gefüllt, denen jetzt eine 1 ml *E. coli*-Lösung – ca. 50 *E. coli* – zugefügt wurde. Bezogen auf 10 ml Probe waren somit nur 5 *E. coli* (0,1 ml *E. coli*-Lösung) - vorhanden.

Acht Mikrofilter wurden, wie oben beschrieben behandelt, von denen 4 auf Tergitol- und die anderen vier auf Endoagar gelegt und im 36 °C Brutschrank bebrütet wurden. Auf dieselbe Art und Weise wurde mit den restlichen 19 Wasserproben verfahren.

Nach 2, 4, 6, und 8 h wurde je ein Mikrofilter vom Endo- und Tergitolagar mit einer Pinzette entnommen. Dieser wurde auf einen Objektträger gelegt, der mit

### 3. Methoden

einem Kreis - aufgemalt mit einem Silikonstift - in den Abmessungen des Mikrofilters versehen wurde. Dies wurde pro Probe einmal durchgeführt.

So erhielt man pro Zeiteinheit und Wasserprobe vier Objektträger mit Mikrofiltern:

zwei Mikrofilter, die auf Endoagar lagen und aus den *E. coli*-Lösungen mit 50 und 5 *E. coli* stammten, sowie zwei Mikrofilter die auf Tergitolagar inkubiert wurden und aus den *E. coli*-Lösungen mit 50 und 5 *E. coli* gewonnen wurden. Nun erfolgte eine Hitzefixierung, bei der die Objektträger zweimal kurz durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wurden. Zur weiteren Fixierung wurden die Objektträger 30 sec in 99 % Alkohol gelegt und nach Entnahme 20 min bei 80 °C im Hybridisierungssofen getrocknet (bei diesem Arbeitsschritt mußte nach einer ersten Versuchsreihe der Filtertyp gewechselt werden, da die vorher verwendeten Cellulose-Filter - MF-Millipore Membrane Filter HAWP01300 - sich in Verbindung mit 99 % Alkohol auflösten).

Währenddessen wurden der Hybridisierungspuffer und der Waschpuffer hergestellt. Der Hybridisierungspuffer wurde wie schon unter der FISH-Technik beschrieben in einer 10 % Stringency angesetzt. Der Waschpuffer wurde ebenfalls angesetzt und zur Temperierung in den 46 °C Brutschrank gestellt. Zur Erstellung der Oligonucleotid-Sondenlösung wurden pro Mikrofilter 72 µl Hybridisierungspuffer und 8 µl Sonde in einem Eppendorf Cup kombiniert. Hierbei entstanden 80 µl Sonden - Lösung wovon 70 µl mittig auf den Mikrofilter pipettiert und der Rest verworfen wurde.

Mit dem Rest des angesetzten Hybridisierungspuffer wurde ein Filterpapier benetzt, das vorher in ein 50 ml Falconröhrchen gelegt wurde. Der Objektträger wurde in das vorbereitete Falconröhrchen platziert, das mit dem Deckel gut verschlossen wurde und für 1,5 – 12 h im 46 °C Brutschrank inkubiert wurde. Nach 1,5 h wurde der Objektträger aus dem Falconröhrchen entnommen, schnell in den Waschpuffer gelegt und für 20 min gewaschen.

Danach wurde der Objektträger entnommen und sorgsam mit destillierten Wasser abgespült und im 36 °C Brutschrank luftgetrocknet.

Anschließend wurden pro Objektträger 10 µl DAPI in einem abgedunkelten Raum auf den Mikrofilter pipettiert und 5 min im Dunkeln stehengelassen. Nach

### 3. Methoden

Ablauf der Zeit wurde der Mikrofilter sorgsam mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet.

Die Mikrofilter wurden mit Antibleichmittel versehen und gedeckelt, so daß die mikroskopische Auswertung unter dem Epifluoreszenzmikroskop mit dem DAPI und CY3 Filtersystem erfolgen konnte. Hier galten dieselben Bedingungen für eine positive Identifizierung, wie unter der FISH-Technik beschrieben.

#### **3.5 Nachweis von *E. coli* mit dem LightCycler®**

Die Polymerase Chain Reaction, auf deren Grundlage der LightCycler® beruht, wurde 1983 von Karry Mullis (zitiert aus: PCR Applications Manual 2<sup>nd</sup> edition von Roche 1999) erdacht.

Diese in-vitro Methode synthetisiert bestimmte DNA-Sequenzen mit Hilfe zweier Oligonucleotid-Primern, die am jeweils entgegengesetzten Ende der beiden DNA-Stränge ansetzen. Hierzu muß die zu untersuchende DNA durch Denaturierung in ihre zwei Einzelstränge aufgetrennt werden, an die die Primer binden können. Die Verlängerung der einzelnen Stränge übernimmt eine hitze-stabile Polymerase, die sogenannte Taq DNA Polymerase. Sie wurde früher aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und wird heute rekombinant von *E. coli* produziert.

Werden mehrere solcher Zyklen hintereinander durchgeführt, so erhält man zigtausendfache Kopien der zu analysierenden DNA.

Kombiniert mit einem fluoreszierenden Farbstoff – hier speziell SYBR-Green I – können nach einer Schmelzkurvenanalyse die gesuchten Produkte gefunden werden.

Die Wirksamkeit dieser Methode wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Bischoff, Luthy, Altwegg, Baggi (2005); Fukushima, Tsunomori, Seki (2003) und Wellinghausen et al. (2004)).

### 3. Methoden

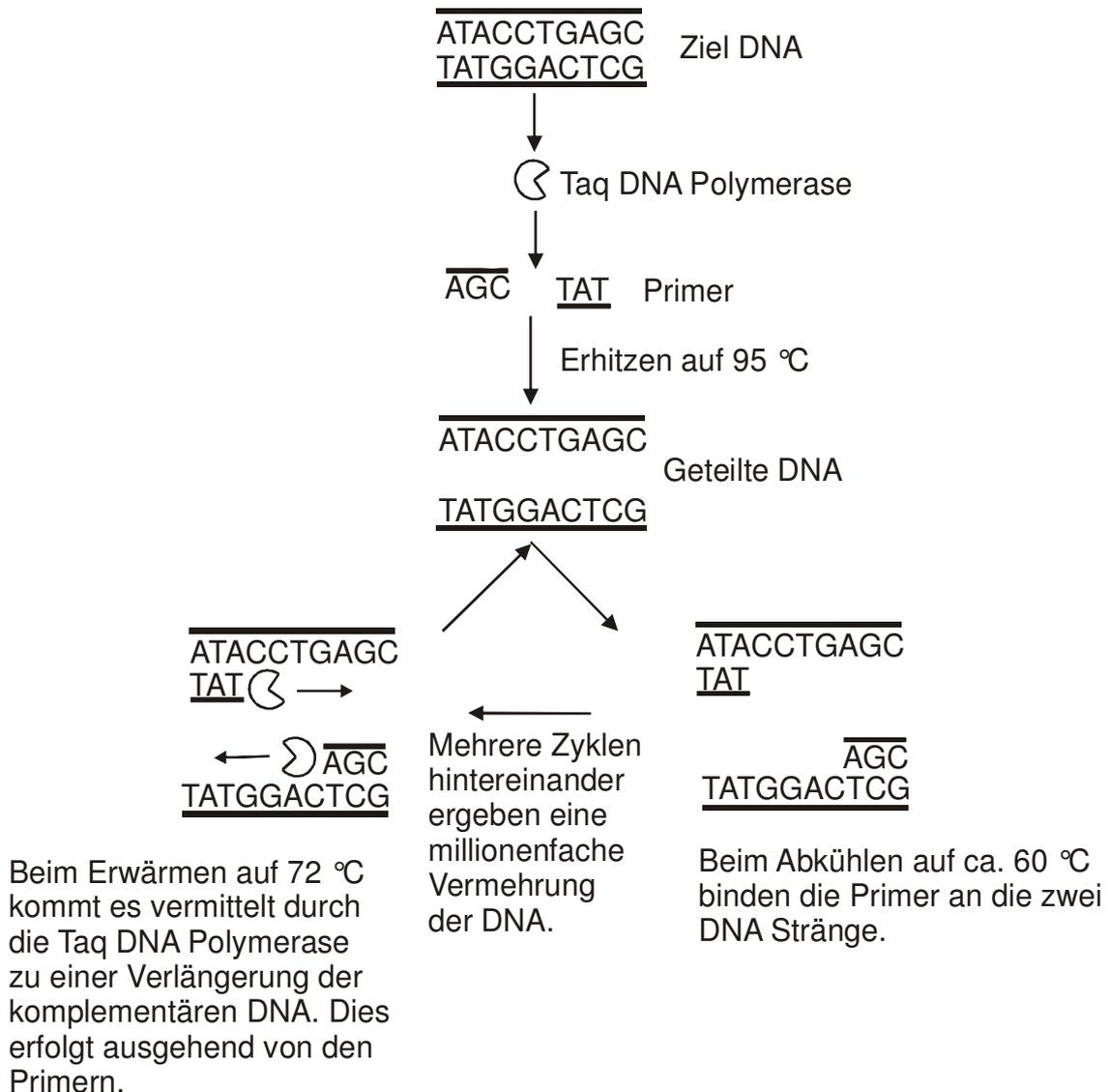


Abbildung 5: PCR Reaktions-Schema (modifizierte Abbildung basierend auf dem PCR Applications Manual 2<sup>nd</sup> edition von Roche 1999)

Die im Abschnitt der FISH-Technik beschriebenen bei -20 °C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und auf dem Vortex gemischt. Um bei der DNA-Extraktion nicht den Überblick zu verlieren, sollten immer nur 16 Proben gleichzeitig behandelt werden.

### 3. Methoden

Von ihnen wurden je 200 µl in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, 5 µl Lysozym zugefügt und für 15 min im 37 °C Brutschrank inkubiert. Der andere Teil der Proben wurde wieder bei –20 °C eingefroren.

Währenddessen wurden pro Probe 100 µl Elution Buffer in ein Standardreaktionsgefäß pipettiert und zum Vorwärmen in einen 70 °C Heizblock gestellt.

Nach Ablauf von 15 min wurden der Probe 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase K hinzugegeben, kurz gemixt und nochmals für 10 min im Hybridisierungsofen bei 72 °C inkubiert.

Nach 10 min wurden 100 µl Isopropanol hinzugefügt und die Probe kurz auf dem Vortex gemixt.

Die so entstandene Proben-Lösung wurde in das obere Reservoir eines kombinierten Filter Tube - Collection Tube aus dem PCR Template Preparation Kit pipettiert und 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Dieses Collection Tube mit der hindurchzentrifugierten Proben-Lösung wurde verworfen und das Filter Tube mit einem neuen Collection Tube versehen. Nun wurden in das obere Reservoir 500 µl Inhibitor Removal Buffer pipettiert und bei 8000 U/min 1 min lang zentrifugiert. Das Collection Tube wurde erneut verworfen und das Filter Tube mit einem neuen Collection Tube versehen.

Daraufhin wurde dem oberen Reservoir 500 µl Waschpuffer hinzugefügt und bei 8000 U/min 1 min lang zentrifugiert. Das Collection Tube wurde verworfen und das Filter Tube nochmals mit einem neuen Collection Tube bestückt und wieder mit 500 µl Waschpuffer bei 8000 U/min 1 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme der Zentrifuge bei 14.000 U/min für 10 Sekunden der Rest des Waschpuffers aus dem Filter Tube entfernt.

Das Filtertube wurde entfernt und in ein 1,5 ml Standardreaktionsgefäß gesetzt - das Collection Tube wurde verworfen - und für 5 min in den Heizblock bei 70 °C gestellt.

Nach 5 min wurden 100 µl des bei 70 °C vorgewärmte Elution Buffer zugefügt und 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Das Filter Tube wurde verworfen, da sich nun im Standardreaktionsgefäß die extrahierte und gewaschene DNA befindet. Dieses Gefäß wurde mit der

### 3. Methoden

Nummer der zu untersuchenden Wasserprobe beschriftet und bis zur weiteren Untersuchung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Pro DNA-Extraktion mußte eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Positivkontrolle besteht aus der auch bei der FISH-Technik verwendeten Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde Ampuwa<sup>®</sup> zur Reagenzienkontrolle eingesetzt.

Für die folgende Untersuchung mit dem LightCycler<sup>®</sup> wurden pro DNA - Probe  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  Primer,  $0,8\text{ }\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2,7\text{ }\mu\text{l}$  steriles  $\text{H}_2\text{O}$  und  $1\text{ }\mu\text{l}$  DNA Master SYBR Green I in ein  $0,5\text{ ml}$  Eppendorf-Cup pipettiert und gemixt. So erhielt man pro extrahierter DNA  $5\text{ }\mu\text{l}$  Ansatz. Auch hier wurde für 2 DNA - Proben mehr angesetzt, da wiederum ein Teil des Ansatzes adhären im Cup zurückbleibt. Die Proben mit der extrahierten DNA wurden aufgetaut und kurz mit dem Vortex gemischt.

Hieraus wurden  $5\text{ }\mu\text{l}$  entnommen und in eine LightCycler<sup>®</sup> - Kapillare pipettiert, zu der noch  $5\text{ }\mu\text{l}$  des oben beschriebenen Ansatzes gegeben wurden. Die Kapillaren wurden mit dem beiliegenden Deckel verschlossen und für 5 Sekunden bei  $2000\text{ U/min}$  zentrifugiert.

Es erfolgte eine erneute Reagenzienkontrolle durch Zugabe von  $5\text{ }\mu\text{l}$  sterilem Wasser und  $5\text{ }\mu\text{l}$  Ansatz in eine leere LightCycler<sup>®</sup> - Kapillare.

Die Kapillaren wurden in das LightCycler<sup>®</sup> - Karussell gesetzt und die Amplifikation gestartet. Nach Ablauf von 45 Amplifikationen mit anschließender Schmelzkurve gab es nach ca. 50 min die Ergebnisse. Diese wurden an den angeschlossenen Computer übermittelt und auf einer Diskette gespeichert. Hierbei mußte man bei der Auswertung beachten, daß das gesuchte Produkt eine höhere Schmelztemperatur als die Primer Dimere besitzt. Verbunden mit der Kontrolle aus  $\text{H}_2\text{O}$  konnte das gesuchte Produkt schnell anhand der Schmelzkurve identifiziert werden, da bei  $\text{H}_2\text{O}$  nur Primer Dimere „amplifiziert“ wurden.

### 3. Methoden

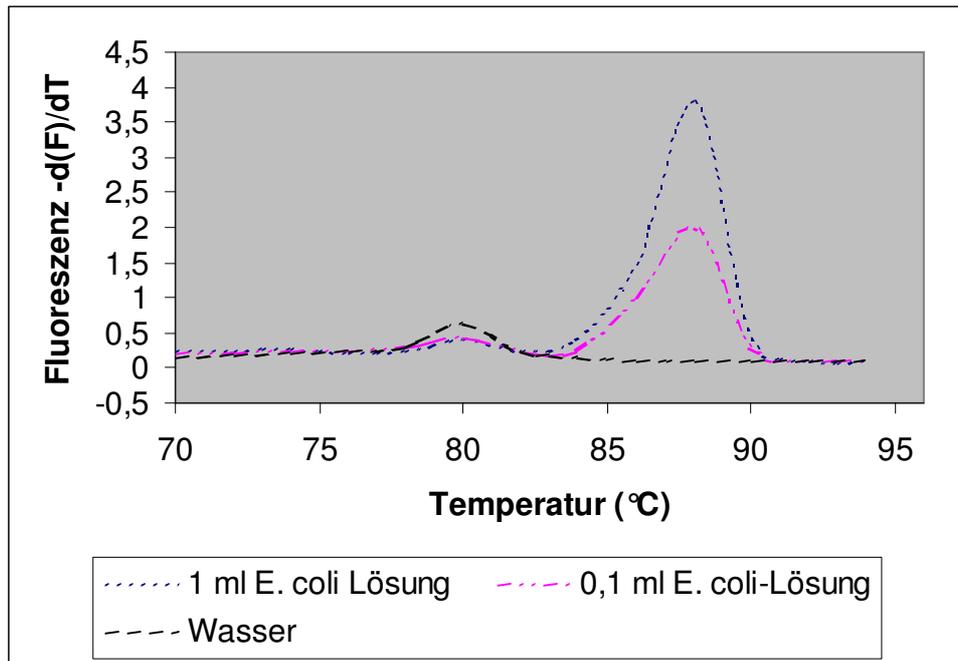


Abbildung 5: Schmelzkurve

Wenn allerdings die Negativkontrollen einen Peak aufweisen, so sind die verwendeten Chemikalien mit *E. coli* kontaminiert und es muß eine erneute DNA - Extraktion mit reinen Chemikalien verbunden mit einer Auswertung mit dem LightCycler® erfolgen.

Dieser Fall trat bei meinen Untersuchungen nicht auf, sodaß kein erneuter Kontrolllauf gestartet werden mußte.

### 3. Methoden

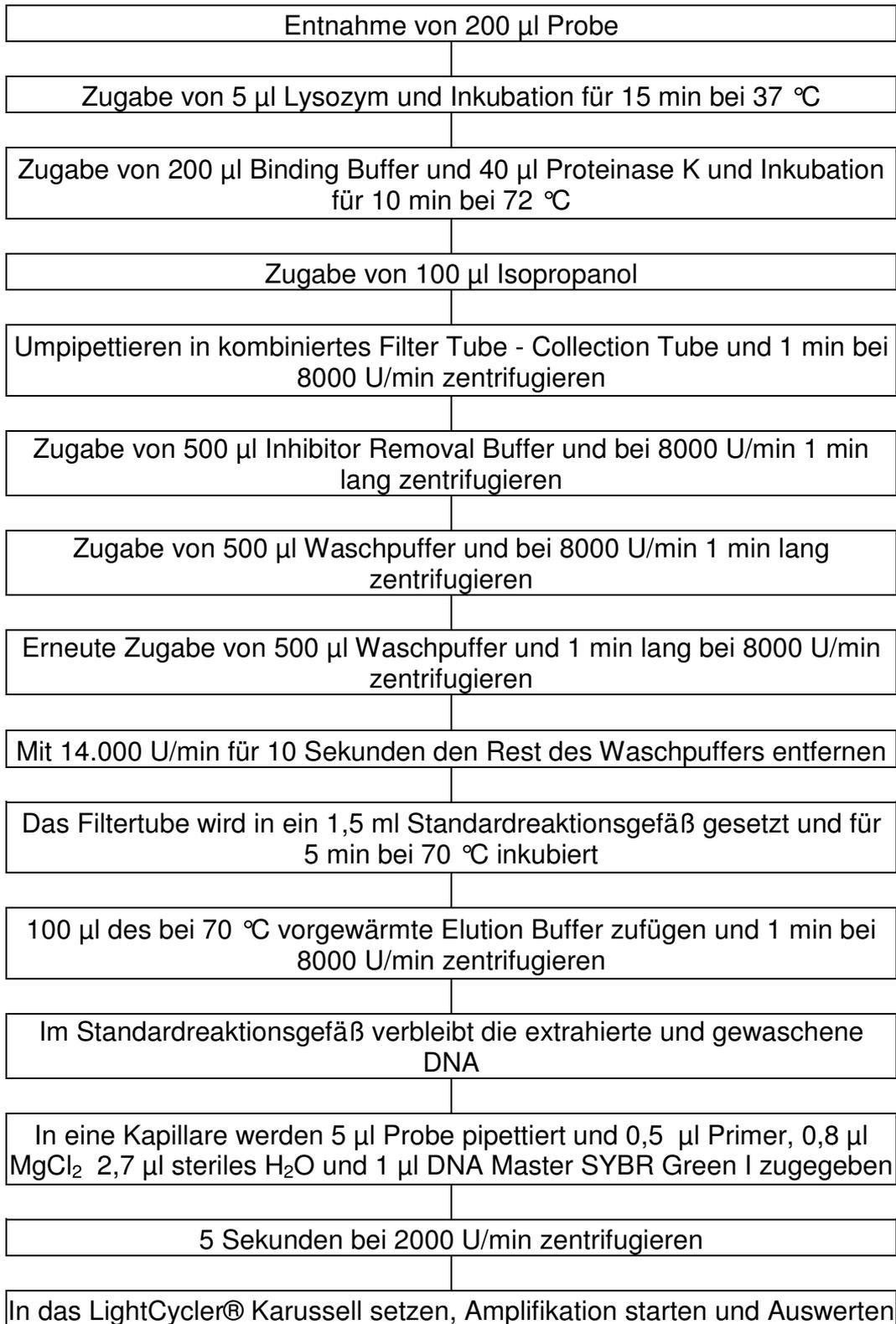


Abbildung 6: Arbeitsanweisung LightCycler®



## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Anfangskontrolle durch Readycult<sup>®</sup>, bunte Reihe und FISH-Technik (n=20)

Die Anfangskontrolle der Wasserproben zeigte, daß sämtliche Proben negativ waren in Bezug auf *E. coli*, wobei kein Unterschied festzustellen war, ob Readycult<sup>®</sup> oder die FISH-Technik benutzt wurde. Auch die Routineuntersuchung der Wasserproben durch das Wasserlabor konnte keine Belastung der Proben mit *E. coli* oder Coliformen feststellen.

##### 4.1.1 Anfangskontrolle mit Readycult<sup>®</sup> (n=20)

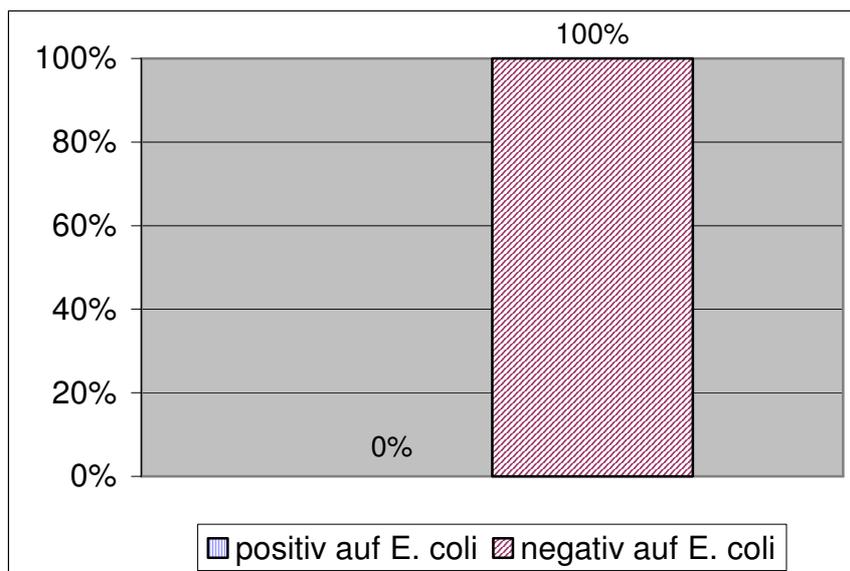


Diagramm 1

Anhand des obenstehenden Diagramms kann das Vorkommen von *E. coli* in den Proben ausgeschlossen werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1.2 Anfangskontrolle FISH ECO 543 (n=20)

Probe \ Technik	FISH	
	Dapi	CY 3
Positivkontrolle <i>E. coli</i>	positiv	positiv
Negativkontrolle <i>Pseudomonas aer.</i>	negativ	negativ

Tabelle 3

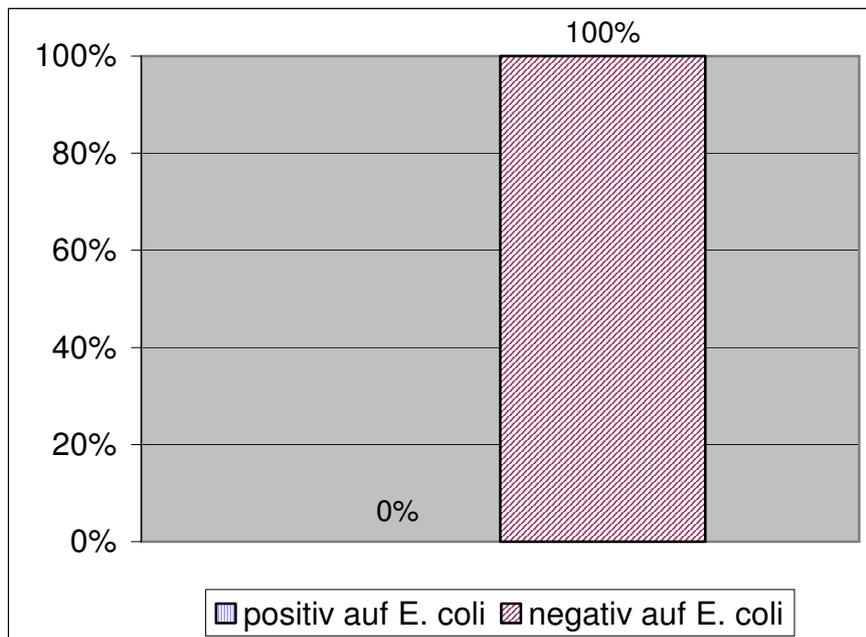


Diagramm 2

Die Anfangskontrolle mit der FISH-Technik zeigt keine Vorbelastung mit *E. coli*

## 4. Ergebnisse

### 4.1.3 Anfangskontrolle der Wasserproben durch das Wasserlabor (n=20)

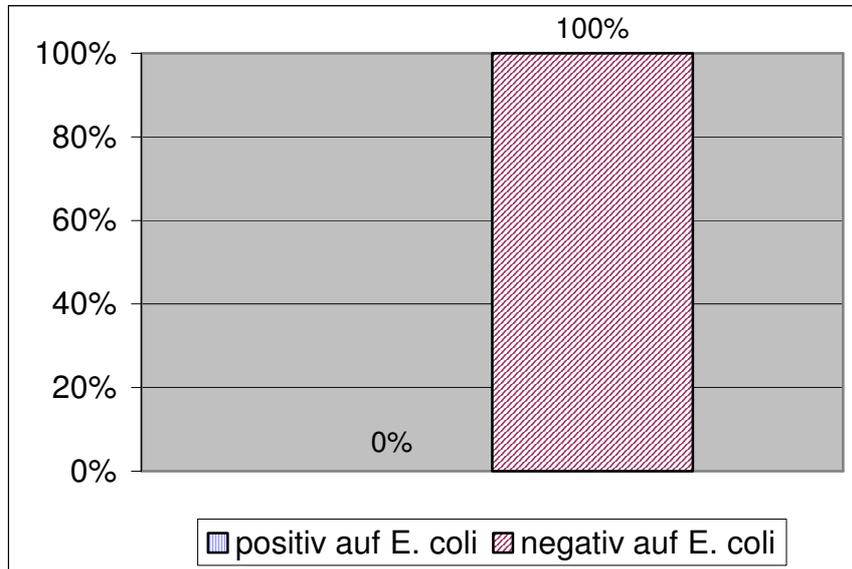


Diagramm 3

Wie man oben stehender Abbildung entnehmen kann, sind sämtliche durch das Wasserlabor untersuchten Wasserproben frei von *E. coli*.

### 4.2 Nachweis von *E. coli* mit Readycult®

Nach Zugabe von 0,1 bzw. 1 ml *E.coli*-Lösung (5 bzw. 50 *E. coli*) in die Wasserprobe à 100 ml zeigte sich beim Nachweis mit Readycult®, daß erst nach 24 h eine verlässliche Aussage über die Kontaminierung von Wasser mit *E.coli* getroffen werden kann. Eine Tendenz hierzu ist aber auch schon nach 18h sichtbar.

#### 4.2.1 Wachstumskontrolle mit API 20 E (n=20) nach 24 h

Untersuchungsart	Agar	Tergitol-7-agar	Endoagar
Nachweis von <i>E. coli</i> mit API 20 E		positiv	positiv

Tabelle 4

## 4. Ergebnisse

### 4.2.2 Ergebnisse Readycult® nach 4 h Voranreicherungszeit (n jeweils 20)

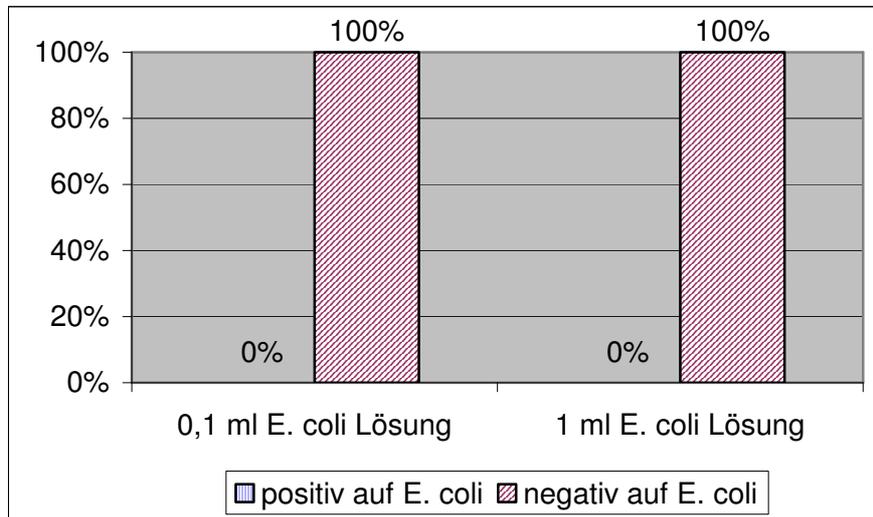


Diagramm 4

Hier ist deutlich zu erkennen, daß eine Voranreicherungszeit von 4 h zu gering ist, um ein Ergebnis bezüglich einer Belastung von Wasser mit *E. coli* zu erhalten.

### 4.2.3 Ergebnisse Readycult® nach 8 h Voranreicherungszeit (n jeweils 20)

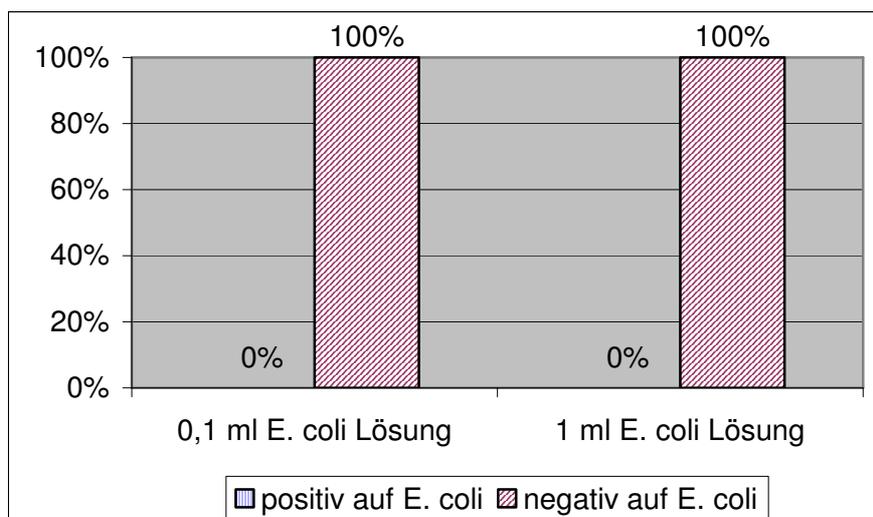


Diagramm 5

## 4. Ergebnisse

Auch die hier (Diagramm 5) gewählten 8 h sind zu gering um ein positives Ergebnis erwarten zu können.

### 4.2.4 Ergebnisse Readycult® nach 18 h Voranreicherungszeit (n jeweils 20)

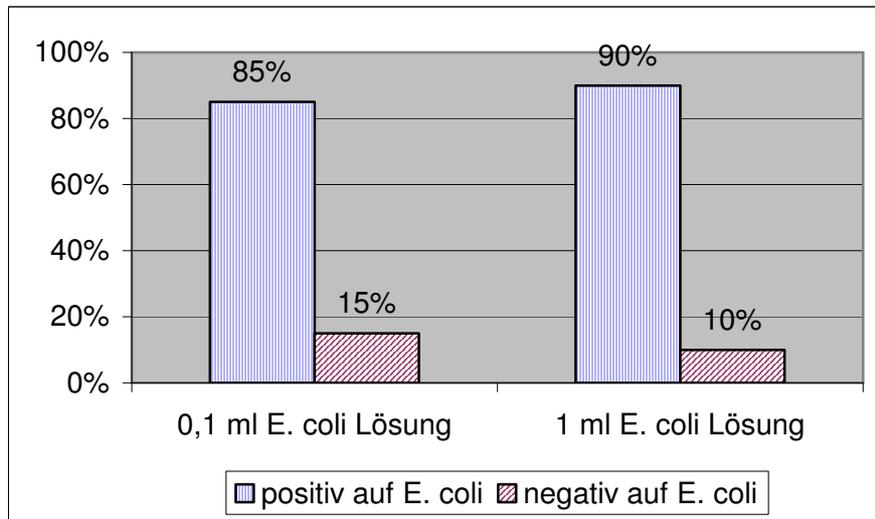


Diagramm 6

Die Auswertung dieser Abbildung (Diagramm 6) lässt eine deutliche Tendenz einer Belastung der Proben mit *E. coli* schon nach 18 h sichtbar werden. Außerdem ist ein deutlicher Unterschied der Nachweisrate zwischen den beiden *E. coli*-Konzentrationen erkennbar. Die durchschnittliche Nachweisrate beträgt hier 87,5 %.

## 4. Ergebnisse

### 4.2.5 Ergebnisse ReadyCult® nach 24 h Voranreicherungszeit (n jeweils 20)

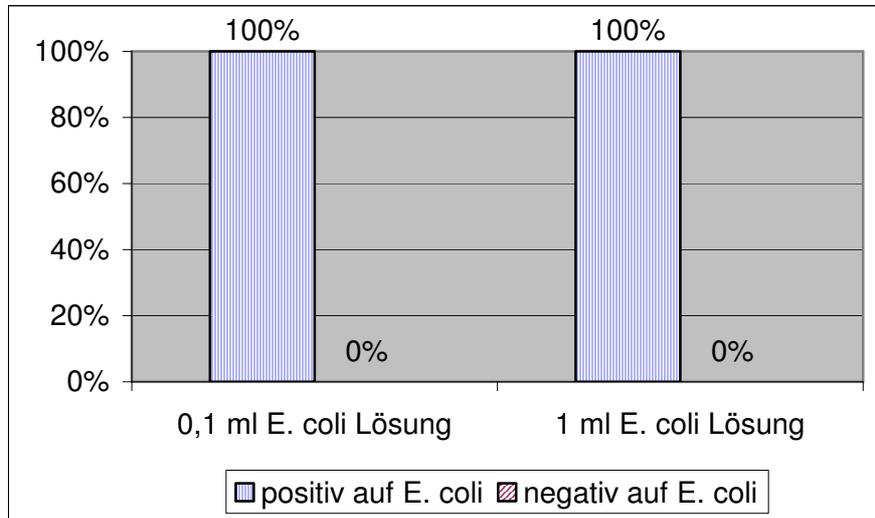


Diagramm 7

Wie aus dieser Abbildung (Diagramm 7) deutlich wird, haben sich die Nachweisraten der beiden *E. coli* Konzentrationen angeglichen und betragen jeweils 100 %.

Eine zusätzliche Überprüfung mit Kovac's Indolreagenz erbrachte in allen Proben eine Belastung mit *E. coli*.

## 4. Ergebnisse

### 4.3 Nachweis von *E. coli* mit der FISH-Technik

Der Nachweis von *E. coli* über eine Anreicherungsbouillon (Lactose-Bouillon) und Entnahme von bestimmten Mengen der Probe nach 4, 8, 18 und 24 h mit anschließender FISH-Technik zeigt auch hier, daß eine Mindestzeit von 24 h eingehalten werden muß um eine ausreichend sichere Aussage der Belastung mit *E. coli* zu treffen.

Hier benötigt die Anreicherung von *E. coli* Zeit, wenn es in geringen Mengen in Wasser enthalten ist.

#### 4.3.1 Wachstumskontrolle mit API 20 E nach 24 h

	Agar	Tergitol-7-agar	Endoagar
Untersuchungsart			
Nachweis von <i>E. coli</i> mit API 20 E		positiv	positiv

Tabelle 5

#### 4.3.2 FISH mit ECO 543 nach 4h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

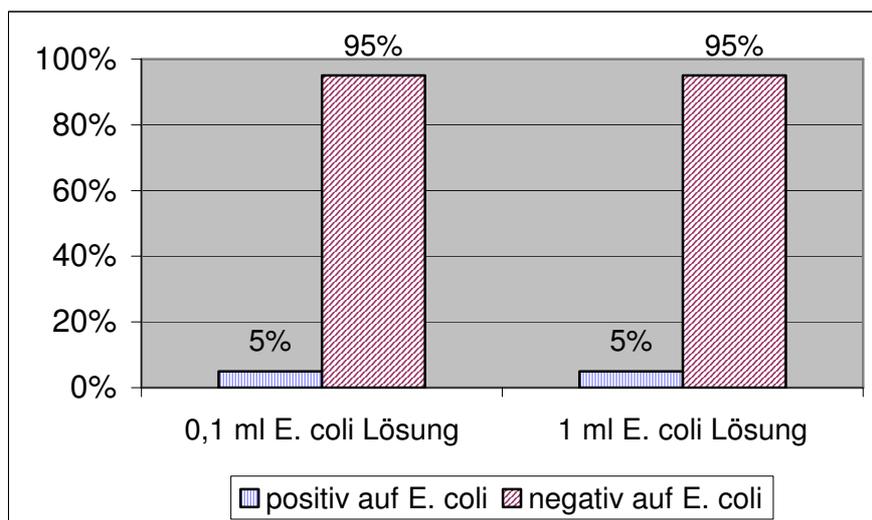


Diagramm 8

Nach 4 h ist keine signifikant höhere Nachweisrate zwischen den zwei eingesetzten *E. coli*-Konzentrationen erkennbar. Sie beträgt im Durchschnitt

## 4. Ergebnisse

5 %. Somit ist nach dieser Zeit kein exakter Nachweis mit der FISH-Technik möglich.

### 4.3.3 FISH mit ECO 543 nach 8h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

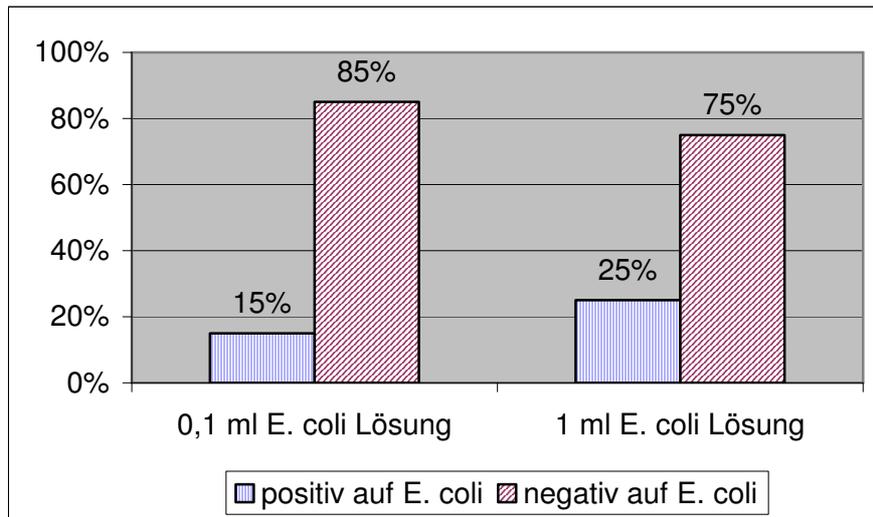


Diagramm 9

Nach einer Voranreicherungszeit von 8 h ist die Nachweisrate bei einer stärkeren Belastung mit *E. coli* deutlich höher verglichen mit einer niedrigeren Belastung. Dieser Unterschied beträgt 10 %.

Die durchschnittliche Nachweisrate nach 8 h beträgt 20 %.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.4 FISH mit ECO 543 nach 18h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

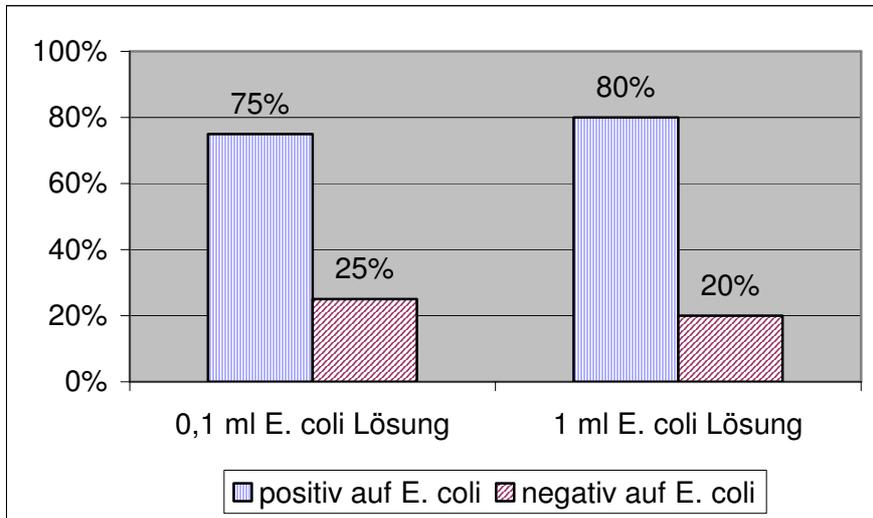


Diagramm 10

Nach 18 h haben sich die Nachweisraten wieder fast angeglichen und betragen im Durchschnitt 77,5 %.

### 4.3.5 FISH mit ECO 543 nach 24h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

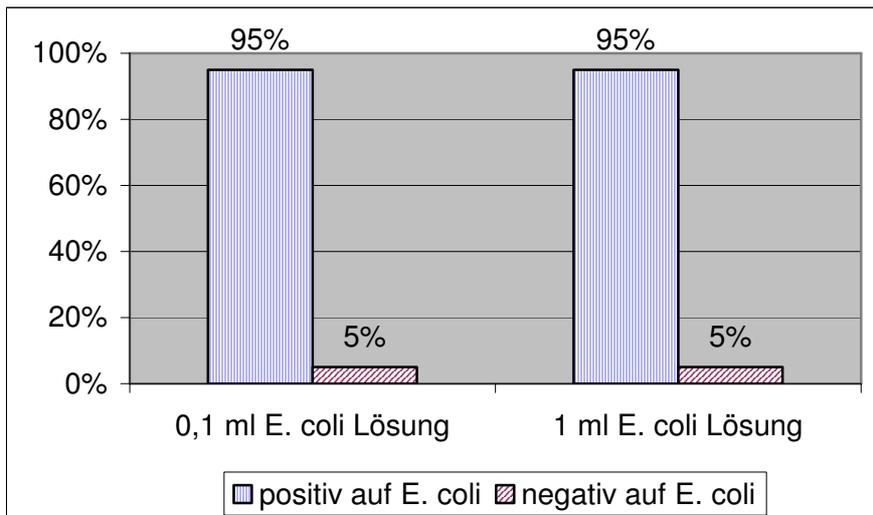


Diagramm 11

## 4. Ergebnisse

Nach 24 h ist zwischen beiden eingesetzten Konzentrationen kein Unterschied mehr feststellbar. Die Nachweisrate beträgt hier im Durchschnitt 95 %.

### 4.4 Nachweis von *E. coli* mit der Mikrokoloniehybridisierung auf Endo- und Tergitolagar

Die Untersuchung der Wasserproben (10 ml Probe, in der 5 bzw. 50 *E. coli* vorhanden sind) über die Mikrokoloniehybridisierung lässt ein Problem dieser Methode augenscheinlich werden. Hier kommt es zu einer unzureichenden Adhäsion von *E. coli* an den Mikrofiltern. Dies konnte durch eine stichprobenartige Untersuchung des Waschpuffers mit der FISH-Technik, der mit *E. coli* kontaminiert war, ermittelt werden.

Man bemerkt bei der Auswertung, daß der Nachweis mit Mikrofiltern auf Tergitolagar nach 6 h tendenziell etwas bessere Ergebnisse liefert.

Dies ändert jedoch nichts daran, das auf diese Art und Weise zu wenig *E. coli* nachgewiesen werden konnte. Somit ist diese Methode kein verlässliches Verfahren für die Trinkwasseruntersuchung.

#### 4.4.1 Wachstumskontrolle mit API 20 E nach 24 h

Untersuchungsart \ Agar	Tergitol-7-agar	Endoagar
Nachweis von <i>E. coli</i> mit API 20 E	positiv	positiv

Tabelle 6

## 4. Ergebnisse

### 4.4.2 Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 2 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

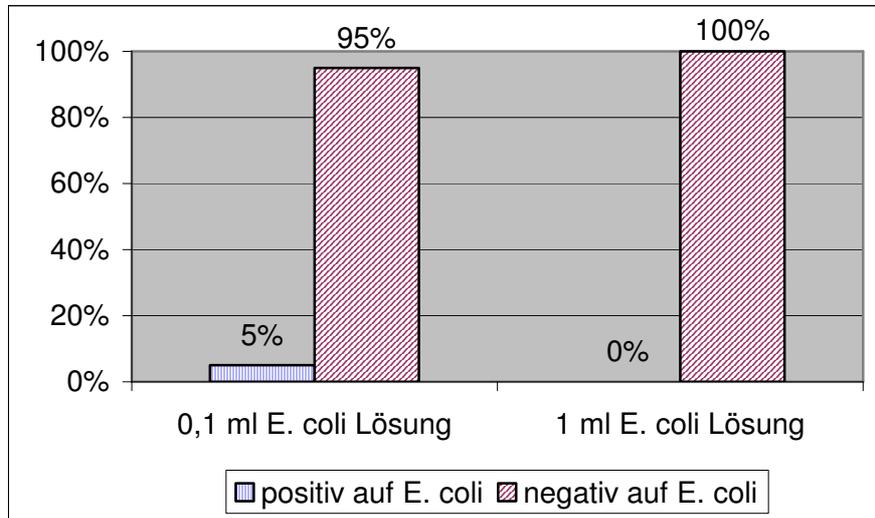


Diagramm 12

Das oben stehene Diagramm 12 lässt keinen anderen Schluß zu, als daß keine sichere Aussage über eine Keimbelastung getroffen werden kann. Die durchschnittliche Nachweisrate beträgt nur 2,5 %.

### 4.4.3 Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 4 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

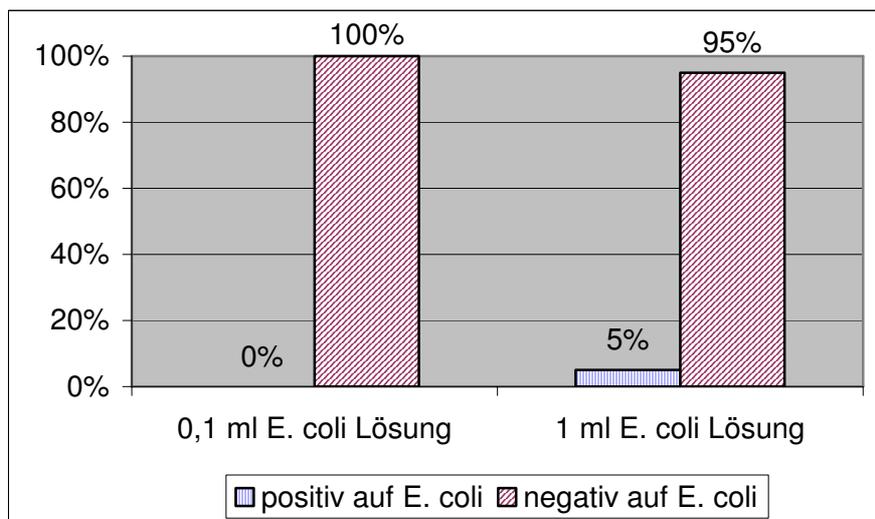


Diagramm 13

## 4. Ergebnisse

Hier (Diagramm 13) kann man nur zum selben Schluß kommen, wie unter 4.4.1. Auch hier beträgt die durchschnittliche Nachweisrate 2,5 %.

### 4.4.4 Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 6 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

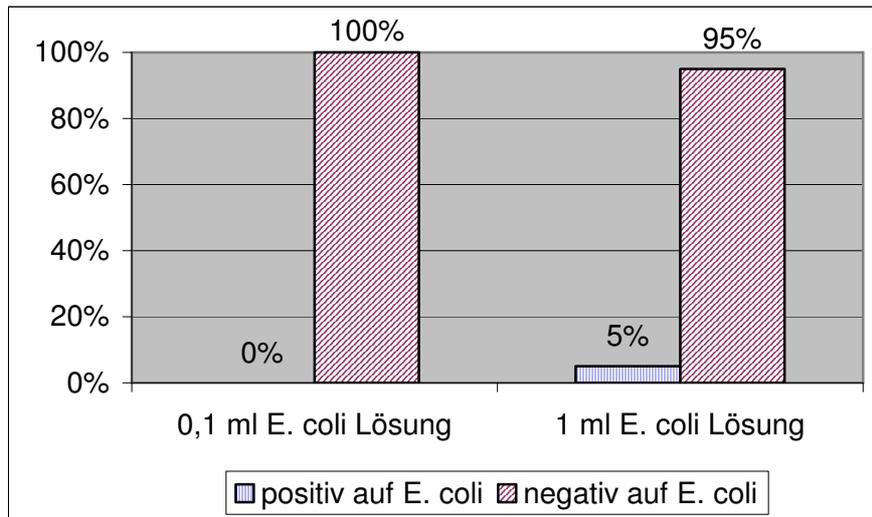


Diagramm 14

Die Nachweisrate beträgt wie vorher nur 2,5 % im Durchschnitt.

## 4. Ergebnisse

### 4.4.5 Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 8 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

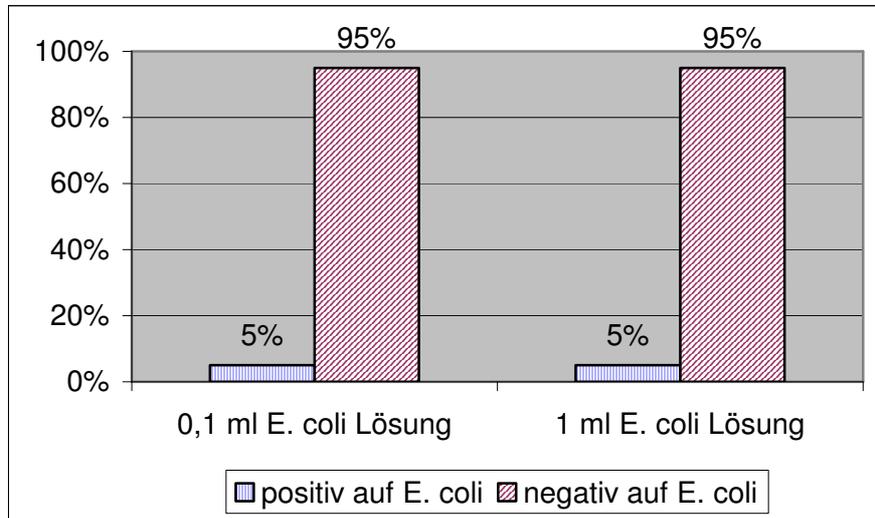


Diagramm 15

Die Nachweisrate ist auf 5 % angestiegen, was aber zu einer sicheren Diagnose nicht ausreicht.

### 4.4.6 Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 2 h Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

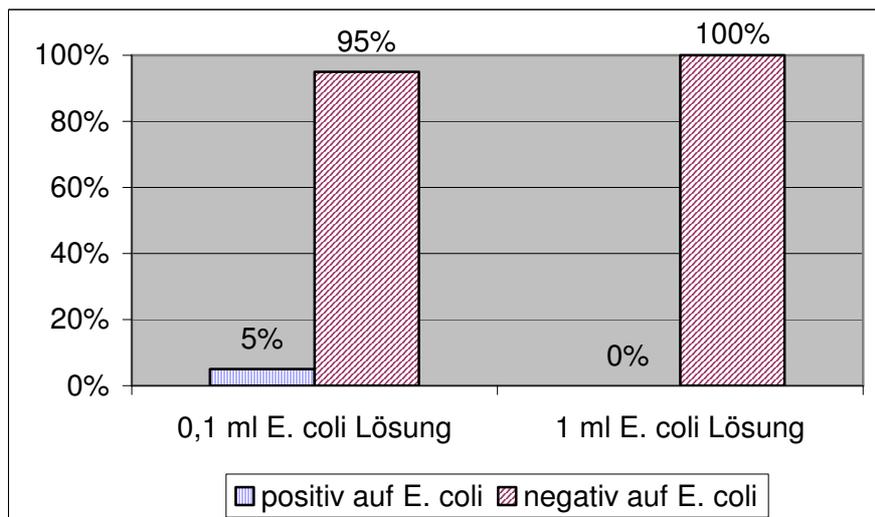


Diagramm 16

Nach 2 h Voranreicherungszeit beträgt die durchschnittliche Nachweisrate

## 4. Ergebnisse

2,5 % und ist damit zur sicheren Analyse zu gering.

### 4.4.7 Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 4 h

Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

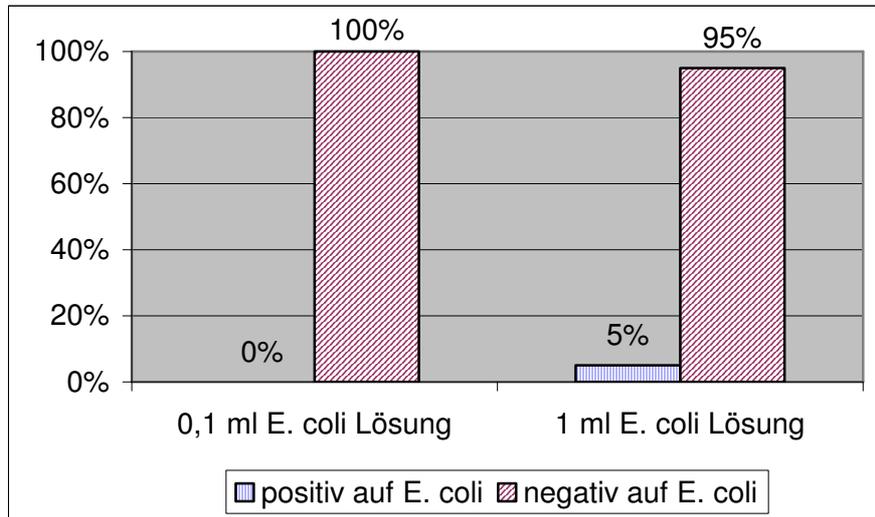


Diagramm 17

Die Auswertung dieses Ergebnisdiagramms ergibt eine unzureichende Sicherheit im Nachweis von *E. coli*. Die Nachweisrate beträgt wie vorher im Durchschnitt 2,5 %.

## 4. Ergebnisse

### 4.4.8 Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 6 h

Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

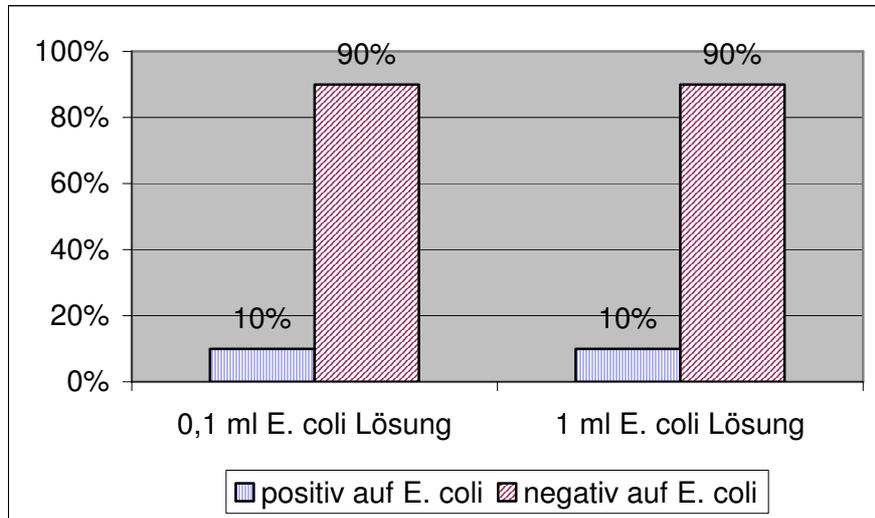


Diagramm 18

Auch hier lässt sich keine zutreffende Aussage über eine Keimbelastung treffen. Tendenziell ist der Nachweis von *E. coli* auf Tergitolagar besser als auf Endoagar.

### 4.4.9 Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 8 h

Voranreicherungszeit mit der Sonde ECO 543 (n jeweils 20)

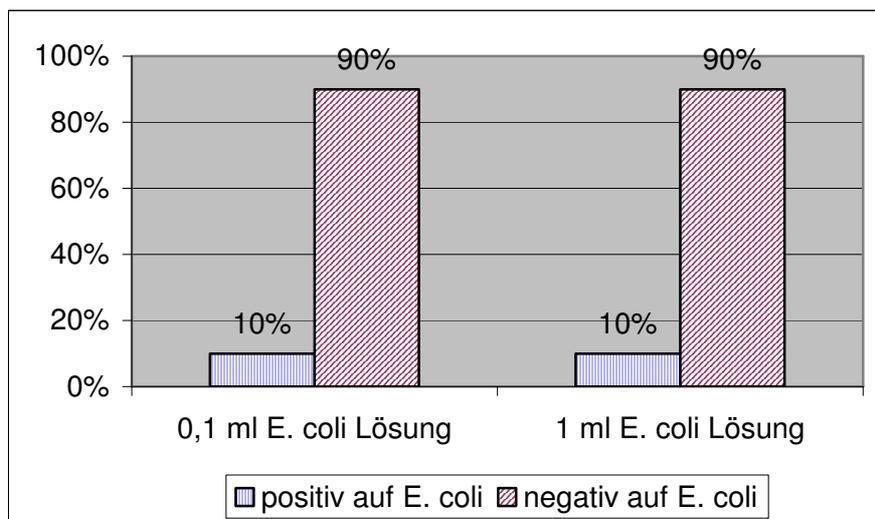


Diagramm 19

## 4. Ergebnisse

Hier (Diagramm 19) kann nur dieselbe Aussage wie unter 4.4.7 getroffen werden.

### 4.5 Nachweis von *E. coli* mit dem LightCycler®

Mit der LightCycler®-PCR sollte es möglich sein, in einem Bruchteil der sonst üblichen Zeit ein verlässliches Ergebnis der Keimbelastung zu erhalten. Mit dieser Methode können sehr geringe Spuren der DNA von *E. coli* nachgewiesen werden.

#### 4.5.1 Ergebnisse LightCycler® nach 4 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

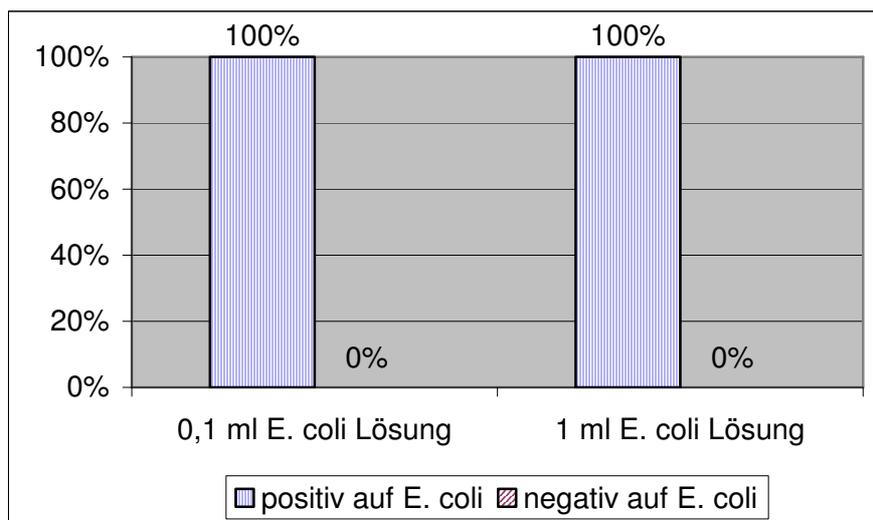


Diagramm 20

Nach 4 h Voranreicherungszeit ist zwischen den beiden eingesetzten *E. coli* Konzentrationen kein Unterschied feststellbar. Die Nachweisrate beträgt bei beiden 100 %. Es können also bereits nach 4 h DNA-Spuren von *E. coli* eindeutig nachgewiesen werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.5.2 Ergebnisse LightCycler® nach 8 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

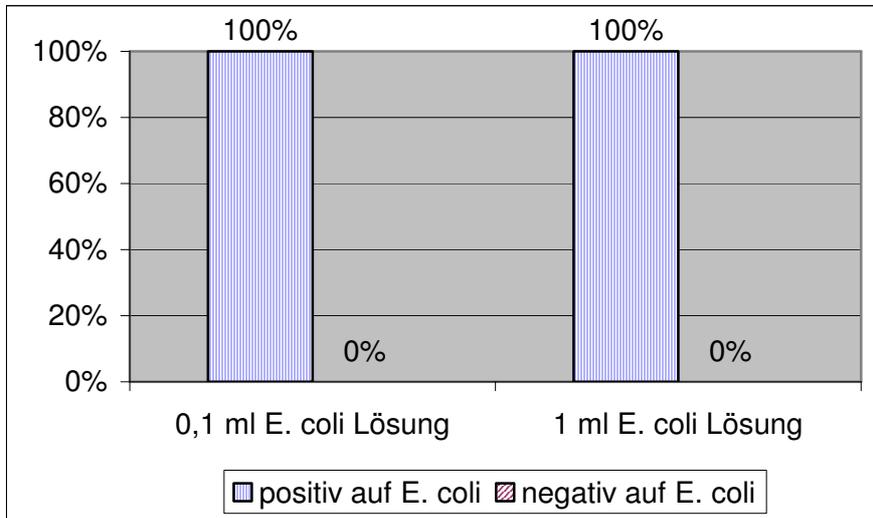


Diagramm 21

Hier (Diagramm 21) kann dieselbe Aussage wie unter den Ergebnissen von 4 h Voranreicherungszeit getroffen werden.

### 4.5.3 Ergebnisse LightCycler® nach 18 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

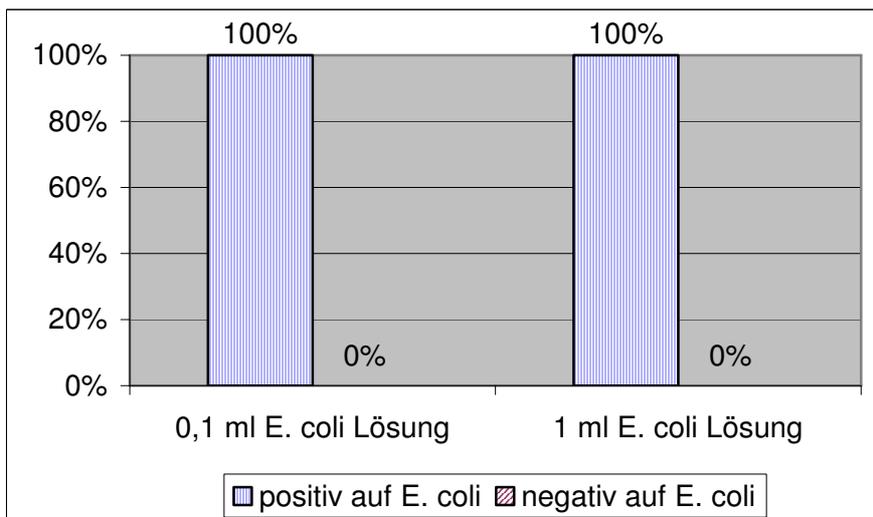


Diagramm 22

## 4. Ergebnisse

Auch hier (Diagramm 22) kann dieselbe Aussage wie unter den Ergebnissen von 4 h Voranreicherungszeit getroffen werden.

### 4.5.4 Ergebnisse LightCycler® nach 24 h Voranreicherungszeit in Lactose-Bouillon (n jeweils 20)

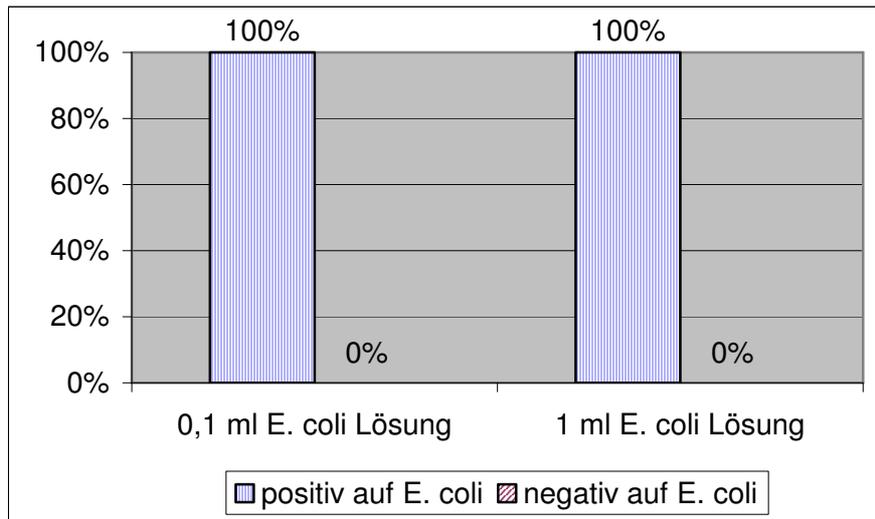


Diagramm 23

Wiederum kann auch hier (Diagramm 23) dieselbe Aussage wie unter den Ergebnissen von 4 h Voranreicherungszeit getroffen werden.

### 5. Diskussion

#### 5.1 Methoden

Untersuchungen von Wasserproben auf *E. coli* gehören seit mehr als 100 Jahren zum Repertoire der heutigen Trinkwasseraufbereitung (Feuerpfeil, I und Szewzyk, R 2003).

Schon kleinste Verunreinigungen mit Fäkalien können verheerende Auswirkungen auf die Versorgung der Bevölkerung mit sauberem Trinkwasser haben. Eine Kontamination mit *E. coli* ausgelöst durch Düngen der Felder mit Gülle, oder aber auch Naturkatastrophen wie im Jahr 2004 der Tsunami in Südostasien und im Jahr 2005 der Hurrikan in New Orleans mit Hurrikan Katrina mit den folgenden riesigen Überschwemmungen können die Entstehung von Epidemien begünstigen. Um diese zu verhindern, ist eine möglichst genaue Untersuchungsmethode gefragt, die auch in puncto Schnelligkeit überzeugen kann.

Um eine vorherige Kontamination der Wasserproben auszuschließen, wurden die Proben wie im Wasserlabor des Hygieneinstituts gehandhabt genommen und zur Sicherheit vor ihrer Verwendung auf *E. coli* untersucht.

Erst nach vollständiger Überprüfung wurden diese eingesetzt und mit *E. coli* Referenzmaterial in verschiedenen Konzentrationen versetzt, sodaß ein genauer Vergleich der verschiedenen Methoden möglich war.

Der Nachteil bei dieser Art der Untersuchung bestand darin, daß für die einzelnen Untersuchungen jeweils eine neue *E. coli* Lösung angesetzt werden mußte. Hierbei konnte nicht ausgeschlossen werden, daß es von einem zum anderen Ansatz zu einer leicht unterschiedlichen *E. coli* Konzentration kommen kann. Dies ist durch die *E. coli* 500 Tabletten bedingt, die unterschiedliche Mengen an *E. coli* und unterschiedliche Mengen an kultivierbaren *E. coli* enthalten können.

### 5.2 Untersuchung mit Readycult®

Untersuchungen, die mit Readycult® durchgeführt werden, beruhen auf zwei grundlegenden enzymatisch vermittelten Reaktionen.

Zum einen erfolgt der Nachweis von Gesamcoliformen und *E. coli* über das chromogene Substrat X-GAL. X-GAL ist Substrat der  $\beta$ -Galactosidase, die durch Spaltung des Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl freisetzt. Das enzymatisch abgespaltene Indoxyl wird zum unlöslichen Indigo oxidiert und führt zu einen blau-grünen Farbumschlag.

Der spezifische Nachweis von *E. coli* erfolgt über das *E. coli* spezifische Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase, daß das fluorogene Substrat MUG spaltet. Dieses Enzym besitzen etwa 97 % der Stämme von *E. coli* (Kilian und Bülow, 1976) und sind somit ein Charakteristikum von *E.coli* und einigen Shigellen unter den Enterobakterien und Vibrionaceen (Kilian und Bülow, 1979). Hierbei entsteht 4-Methylumbelliferon was durch Fluoreszenz - MUG selbst fluoresziert nicht – mit der UV-Lampe nachgewiesen werden kann.

Diese Methode weist eine Empfindlichkeit von über 85 % Methoden- und Medienabhängig (Papasian, CJ; Hertlein, G (1987)) auf, und macht sie damit zu einer schnellen und einfachen Untersuchungsmöglichkeit.

Kilian und Bülow konnten 1979 bei ihren Untersuchungen von Urinproben sogar 94 % ihrer *E. coli* Kulturen über einen PGUA-Agar - der die  $\beta$ -Glucuronidase Aktivität nachweist - identifizieren. Eine noch höhere Spezifität von 98.6 % fanden Sarhan, Williams und Foster (1991) bei ihrer Untersuchung von Molkereiprodukten zum Nachweis von *E. coli* auf MUG-7 Medien. Die geringe Anzahl von Keimen, die falsch-positive Ergebnisse lieferten, wurden als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert. Das Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen lag hierbei bei ca. 2 %. Dabei fanden Sarhan, Williams und Foster heraus, daß MUG-7 Medien sowohl für Plattengussverfahren (pour plate), Ausspatel-Verfahren (spread plate) als auch Membranfiltrationsmethoden geeignet sind.

Dies deckt sich auch mit meinen Untersuchungen, bei denen ein 100 %iger Nachweis von *E. coli* erfolgte.

## 5. Diskussion

Hierbei handelte es sich um Trinkwasserproben, die aber zur Untersuchung mit *E. coli* in verschiedenen Konzentrationen versetzt wurden.

Da sich die hierbei erzielten Ergebnisse nur auf diesen speziellen *E. coli* Stamm beziehen, kann es unter Umständen mit anderen *E. coli* Stämmen zu einem anderen Ergebnis kommen. Wie bereits erwähnt besitzen etwa 97 % der *E. coli* Stämme das spezifische Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase.

Trotz dieses Nachteils eignet sich diese Methode hervorragend zum Nachweis von Coliformen um mit geringen Aufwand aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, soweit sich die sogenannten Coliformen durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase definieren lassen. Zur Auswertung ist lediglich eine UV-Lampe erforderlich. Im Notfall kann auch auf einen Brutschrank verzichtet werden. Die Inkubationszeit erhöht sich in diesem Fall dann auf 48 h bei Raumtemperatur (20-25 °C).

Dies ist in Krisengebieten mit zerstörter Infrastruktur ein entscheidender Vorteil.

### 5.3 Untersuchung mit der FISH-Technik

Die FISH-Technik benutzt Oligonucleotid-Sonden, die an komplementären Sequenzen speziell an den 16S rRNA und 23S rRNA Molekülen von Enterobacteriaceae koppelt (Rompre, A et al. (2002)). Somit kann über speziell angefertigte Sonden z.B. *E. coli* nachgewiesen werden. Hierbei besteht allerdings das Problem, daß kleine Mengen von *E. coli* nicht sofort nachgewiesen werden können, sondern erst nach Anreicherung in einem Kulturmedium.

Eine weitere zeitliche Verzögerung ergibt sich aus der Notwendigkeit die gesamte Probe durchzumikroskopieren – ein Zeitaufwand von ca. 5 min bei *E. coli* je Objektträger.

Diese Punkte mußten schon von Ootsubu et al. (2003) bei der Entwicklung einer 7 Stunden FISH-Technik zur Zählung von Entero-bacteriaceae in Speisen und Umweltwasserproben beachtet werden.

## 5. Diskussion

Nach den Untersuchungen von Rompre, A et al. (2002) ist die FISH-Technik durchaus eine Alternative zur konventionellen Methode um *E. coli* in relativ kurzer Zeit nachzuweisen. Sie weisen aber gleichzeitig daraufhin, daß auf diesem Gebiet weiter geforscht werden müsse.

Daß hierbei systematisch höhere Ergebnisse erzielt werden als bei einer kulturelle Methode fanden Garcia-Armisen und Servais bei Ihrer Untersuchung von Flüssen und Schmutzwasser (2004) heraus.

Dies beruhte auf einer höheren Anzahl von lebenden aber nicht kultivierbaren *E. coli*, wobei sie dann die Hypothese aufstellten, daß Stressfaktoren wie Ernährungsstreß und Sonnenlicht dafür verantwortlich sein könnten.

Bei meinen Untersuchungen zeigte sich, daß bei dieser Methode erst nach einer Kultivierung von 18 h in 77,5 % der Proben *E. coli* nachgewiesen werden konnte. Nach 24 h erhöhte sich der Anteil auf 95 %.

Garcia-Armisen und Servais beschrieben in ihrer Untersuchung, daß eine Mindestzahl von 3000 *E. coli* vorhanden sein müssen um ein genaues Ergebnis zu erhalten.

Bei optimalen Vermehrungsbedingungen besitzt *E. coli* eine Generationszeit von 20 min (Schlegel, HG 1992). Auf meine Untersuchungen bezogen benötigt die Anreicherung von 5 (50) *E. coli* auf 3000 *E. coli* 200 bzw 120 min.

Diese Mindestanzahl kann unter Streß sowie bei zu kurzen Untersuchungszeiten nicht erzielt werden, weshalb die Proben negativ verbleiben.

Der Nachweis von *E. coli* erfolgt dann durch mikroskopischen Nachweis, wobei oft die gesamte 10 µl Probe durchmikroskopiert werden muß um *E. coli* zu entdecken. Dies dauerte bei meinen Untersuchungen bis zu 6 min und deckt sich damit fast mit den Ergebnissen von Ootsubu et al. (2003).

### 5.4 Untersuchung mit der Mikrokoloniehybridisierung

Bei dieser Art der Untersuchung werden spezielle Mikrofilter, mit einer Porengröße von 0,4 µm und einem Durchmesser von 10 mm benutzt. Daß diese Porengröße für die Wasseruntersuchung zweckmäßig ist, zeigen die Veröffentlichungen von Bohnert, Hübner, Botzenhart (2000) sowie von Brenner, Rankin (1990). Bei beiden Untersuchungen wurden Mikrofilter mit einer geringfügig größeren Porengröße von 0,45 µm benutzt um *E. coli* zurückzuhalten.

Ebenfalls muß eine bestimmte Inkubationszeit eingehalten werden, wie es auch bei der anerkannten Membran Filter Methode der U.S. Environmental Protection Agency mit 28 h vorgeschrieben ist.

Desweiteren sind die hier verwendeten Agar-Arten von Bedeutung. Bohnert, Hübner, Botzenhart (2000) verwendeten einen modifizierten Endoagar (10g Pepton, 10g Laktose, 3,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5g Na<sub>2</sub>S, 15g Agar auf 1000ml, pH 7,5 ± 0,2), Brenner, Rankin sogar 5 unterschiedliche Arten. Bei Brenner, Rankin zeigte sich, daß das „*Enterobacter aerogenes*-tryptic soy agar test system detected more MF defects than any other combination did and was superior to the *Escherichia coli*-mFC agar American Society for Testing and Material method for grid line inhibition“. Von 142 von ihnen untersuchten Mikrofiltern waren 30 % akzeptabel, 10 % gerade noch akzeptabel und 61 % unannehmbar.

Bei einer weiteren Untersuchung von Brenner, Rankin, Sivaganesan, Scarpino wurden mit einer neuen Membranfiltermethode - beruhend auf der „MI agar method, containing indoxyl-beta-D- glucuronide and 4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside“ - signifikant höhere Ergebnisse erzielt als mit mEndo Agar und „nutrient agar plus MUG“.

Ein wiederum leicht abgewandelter Agar - 4-methylumbelliferyl-beta-D-glycosides als Enzymsubstrat - wurde von Van Poucke, Nelis (2000) in Verbindung einer UV-Lampe mit Membranfiltern zum Nachweis von fluoreszierenden und chemilumineszierenden Coliformen und *Escherichia coli* benutzt.

## 5. Diskussion

Von Rompre, A et al. (2002) wurden für die MTF - und MF - Methode die Grenzen beschrieben wobei sie hierzu bemerken: „These Methods have limitations, however, such as duration of incubation, antagonistic organism interference, lack of specificity and poor detection of slow-growing or viable but non-culturable (VBNC) microorganisms“.

Die Untersuchungen von Grasso, Sanmarco, Ripabelli, Fanelli (2000) zeigen, daß es hierbei auf ein perfektes Zusammenspiel der verwendeten Materialien ankommt um in 24 h ein Ergebnis zu erhalten. Sie verglichen die „multiple tube fermentation“ Methode (MTF), die „lactose broth“ und Colilert Reagens benutzt, mit der „membrane filter“ Methode, die Les Endo agar (LEA), „m-faecal coliform Agar (mFCA) und chromogenic coliform Agar (CCA)“ benutzt. Dabei konnten sie mit MTF 100 % Gesamtcoliforme/*E. coli* nachweisen, mit MF-mFCA immerhin 75,5 % und mit MF-CCA 86,2 %.

Bei meinen Untersuchungen konnten nur zwischen 2,5 % und 10 % der mit *E. coli* behandelten Mikrofilter als positiv bewertet werden, wobei die Nachweisrate abhängig von der Inkubationszeit, sowie vom verwendeten Agar war. Sie stieg an, je länger inkubiert wurde und bei Inkubation auf Tergitolagar. Es kommt also auf ein genau aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel von Zeit und eingesetzten Materialien an.

Bereits die Untersuchung von Bohnert, Hübner, Botzenhart (2000), auf der meine Untersuchungen beruhen, weisen auf diesen bedeutsamen Umstand hin. Meine Untersuchungen unterscheiden sich nur in der Filtergröße - der Porendurchmesser ist ungefähr gleich - , den verwendeten Agararten, der Inkubationszeit, und der größeren Hybridisierungspufferlösung. Die Mengenanpassung der Hybridisierungspufferlösung wird nötig, da bei meinen Untersuchungen der gesamte Mikrofilter benutzt wird. Dort wurde auch eine andere Sonde - EBAC 1790 anstatt ECO 543 - benutzt, wobei dieser Umstand eher vernachlässigt werden kann, da die von mir benutzte Sonde bei der vorher erfolgten FISH-Technik sowie im Hygieneinstitut Tübingen erfolgreich verwendet worden war. Ebenfalls konnte durch eine Untersuchung des Waschpuffers mit der FISH-Technik eine Kontamination mit *E. coli*

## 5. Diskussion

nachgewiesen werden, was auf eine zu geringe Adhärenz der Bakterien an den von mir verwandten Mikrofiltern zurückzuführen ist.

### 5.5 Untersuchung mit dem LightCycler®

Im PCR Applications Manual 2<sup>nd</sup> edition von Roche (1999) werden für die Untersuchung mit dem LightCycler® einige Grundvoraussetzungen genannt, die beachtet werden müssen.

So kommt es bei den Templates darauf an, daß das Maximum an menschlicher DNA bei 500 ng, bei bakterieller DNA bei 1-10 ng und bei Plasmid DNA bei 0,1 – 1 ng liegen sollte.

Die verwendeten Primer sollten 18 – 24 Basen lang sein und keine interne zweite Struktur enthalten. Die G/C und A/T Verhältnisse sollten in etwa gleich sein, 40-60 % G/C enthalten, am 3´ - Ende nicht komplementär zueinander sein und eine annealing Temperatur zwischen 55-65 °C besitzen.

Die MgCL<sub>2</sub>-Konzentration sollte empirisch ermittelt werden, wobei die meist genutzte Konzentration 1,5 mM beträgt. Sie kann aber auch zwischen 1 mM bis 5 mM variieren.

Der pH des Reaktionspuffers sollte hierbei zwischen 8,3 – 9,0 liegen.

Desweiteren sollte eine Schicht Mineralöl als oberste Schicht im Reaktionsgefäß aufgebracht werden, wenn das verwendete Gerät nicht über eine Heizung in der Gehäuseoberseite verfügt.

Die eigentliche PCR besteht nun darin, das die Bakterien-DNA durch Erwärmen getrennt wird und sich jetzt die spezifischen Gensonden an diese beiden komplementären Stränge anlagern können. Durch Erwärmen werden die so neu entstandenen Stränge wieder getrennt und der Zyklus kann wieder von vorne beginnen. So wird mit mehreren solcher Zyklen eine vieltausendfache Amplifikation der DNA erreicht, die nun mit dem LightCycler® nachgewiesen werden kann.

## 5. Diskussion

Daß der Nachweis von *E. coli* mit dem LightCycler<sup>®</sup>, SYBR Green und anschließender Schmelzkurve eine genaue, schnelle und einfache Möglichkeit ist, konnten Bischoff, Luthy, Altwegg und Baggi (2005) aufzeigen. Hierbei verglichen sie den LightCycler<sup>®</sup> mit der konventionellen PCR und konnten nur eine Abweichung zwischen beiden Untersuchungen finden. Eine ihrer Proben war im LC-PCR positiv aber nicht in der konventionellen PCR. Da der LC-PCR aber empfindlicher ist, kamen sie zum Schluß, daß es sich hierbei um ein falsch negatives Ergebnis der konventionellen PCR handeln muß.

Ein ähnliches Ergebnis konnten Straka, Dela Cruz et al. bei ihrer Untersuchung von Fruchtwasser auf Streptokokken der Gruppe B und *E. coli* erzielen. Bei dieser Untersuchung schlussfolgerten sie, daß die Real-time PCR eine stichhaltige und verlässliche Methode ist, um pathogene Keime im Fruchtwasser nachzuweisen. Die durchschnittliche Zeit des Nachweises betrug 7 h und 40 min verbunden mit Kosten von 8,50 \$ pro Test.

Auch Wellinghausen et al. (2004) meinten, daß der PCR Algorithmus für den Nachweis der meisten Bakterien eine geeignete und schnelle Methode sei. Die Nachweisrate bei ihren Untersuchungen auf pathogene Keime in Blutkulturen betrug 98,3 %, wobei bei Mischinfektionen die Empfindlichkeit geringer war. Hierbei wurden keinerlei falsch positive Ergebnisse gefunden.

Fukushima, Tsunomori und Seki (2003) folgerten, daß die schnelle Amplifikation und der verlässliche Nachweis von spezifischen Genen von mehr als 10(5) pathogenen Bakterien in g pro Probe (in Nahrung und Wasser) die Diagnose und Management von Epidemien vereinfachen würden.

Bellin, Pulz et al. (2001) beschrieben in ihrer Untersuchung zum schnellen Nachweis von *E. coli* mit der real-time PCR mit fluoreszierenden Hybridisierungsproben die schnelle Untersuchungszeit, die bei 32 Proben nur etwa 45 min betrug.

Bei der Auswertung meiner Versuche mit dem LightCycler<sup>®</sup>, SYBR Green und anschließender Schmelzkurve konnte in allen Proben *E. coli* nachgewiesen werden. Die Nachweisrate betrug somit 100 %. Einzig und allein die Negativkontrollen sowie die Reagenzienkontrolle (H<sub>2</sub>O) zeigten in Bezug zur

## 5. Diskussion

Schmelztemperatur keine Fluoreszenz ( $-d(F1)/dT=0$ ) und wurden deshalb als negativ bewertet.

Es waren Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz zu erkennen, was auf die unterschiedliche Konzentration von *E. coli* in den Wasserproben als auch auf die unterschiedlich lange Inkubationszeit zurückgeführt werden kann. Je weniger *E. coli* zugesetzt war, desto geringer war die beobachtete Fluoreszenz. Dasselbe galt für die Inkubationszeit – je weniger Zeit zur Verfügung stand, desto geringer war die Fluoreszenz.

So lassen meine Untersuchungsergebnisse erkennen - wie es auch schon andere Untersuchungen zeigen - , daß in sehr kurzer Zeit geringste Mengen an *E. coli* nachgewiesen werden können. Auf meine Untersuchungen bezogen beträgt die Nachweisgrenze mit der geringsten eingesetzten *E. coli*-konzentration (5 *E. coli*) unter optimalen Vermehrungsbedingungen (Generationszeit 20 min bei 37 °C) nach 4 h ca. 10.240 *E. coli*.

Innerhalb von 50 min kann in 32 Proben der exakte Nachweis von *E. coli* erfolgen. Die Gesamtnachweiszeit beträgt ca. 6 Stunden und setzt sich aus der Laufzeit des LightCyclers® mit 50 min, den Zeiten für die Anreicherung von *E. coli* ca. 4 h und der DNA-Extraktion ca. 1 h zusammen.

Insgesamt gesehen ist der Nachweis von *E. coli* mit der real-time PCR - hier speziell der Nachweis mit dem LightCycler® - eine sehr schnelle und zugleich genaue Methode.

### 5.6 Standardisierung und Statistik

Den in dieser Untersuchung vorgestellten Untersuchungsmethoden ist die fehlende Standardisierung gemein. Für Europa wären dies die wichtigen Standards ISO (Internationale Organisation für Normung), CEN (Comité Européen de Normalisation) sowie DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.). Dies betrifft aber nicht die damit beauftragten Laboratorien, die ISO-zertifiziert sind.

## 5. Diskussion

Bezüglich der Untersuchungen mit ReadyCult<sup>®</sup> ist eine Billigung der US-Environmental Protection Agency noch ausstehend. Wenn diese erfolgen sollte, könnte dies auch in Europa geschehen, sodaß wenigstens hier ein einheitlicher Standard zur Verfügung stünde.

So können die bis jetzt in meiner Arbeit genannten Verfahren - hier sei besonders die LightCycler<sup>®</sup>-PCR genannt - bisher nur als Ergänzung zu den gesetzlich vorgeschriebenen Methoden angesehen werden.

Die fehlende Standardisierung ist vor allem in statistischer Hinsicht von eminenter Bedeutung. Hierbei sind vor allem die Sensitivität und Spezifität der Tests wichtig.

Die Prüfung dieser beiden Kriterien war nicht die zentrale Aufgabe diese Arbeit. Grundsätzlich sind die verwendeten molekularbiologischen Methoden als hochspezifisch anzusehen. Es können aber gravierende Irrtümer dadurch auftreten, daß taxonomisch differierende Gruppen mit den verwendeten Sonden reagieren. Derartige Fehler können bei größerem Untersuchungsmaterial zufällig entdeckt werden oder benötigen bei gezieltem Suchen den Einsatz zahlreicher Isolate von mehr oder weniger nahe verwandten Bakteriengruppen.

Bezüglich der Sensitivität ist bei leicht zu kultivierenden Bakterienarten, wie *E. coli*, die Anreicherungskultur kaum zu überbieten, es sei denn es handle sich um vorgeschädigte Bakterien oder Bakterien, die in einen nicht anzüchtbaren Zustand (viable non culturable) übergegangen sind. Kulturverfahren bieten ferner den Vorteil, auch größere Probevolumina direkt und ohne Voranreicherung oder Einengung verarbeiten zu können. Bei der vorliegenden Untersuchung hat sich jedenfalls gezeigt, daß die FISH-Technik und die Mikrokoloniehybridisierung ohne Voranreicherung für die Zwecke der Trinkwasseruntersuchung keine ausreichende Empfindlichkeit aufweisen.

### 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung zum Nachweis von *E. coli* aus Wasserproben durch in-situ-Hybridisierung erfolgte an Wasserproben, die mit *E. coli*-Kulturen unterschiedlicher Konzentrationen versetzt wurden. Dieses in-vitro System weist deshalb in-vivo Merkmale auf.

Für die folgenden Versuche standen Trinkwasserproben aus den Routineuntersuchungen des Hygieneinstituts Tübingen und selbst gewonnene Trinkwasserproben zur Verfügung.

Die genannten Proben wurden zunächst auf *E. coli* untersucht, um eine vorige Kontamination mit *E. coli* auszuschließen. Nach Abschluß der Untersuchungen wurden sie dann mit *E. coli* Referenzmaterial versetzt und mit vier unterschiedlichen Methoden untersucht. Dies waren ReadyCult<sup>®</sup>, die FISH-Technik, die Mikrokoloniehybridisierung und zum Schluß die Realtime-PCR mit dem LightCycler<sup>®</sup>.

Der Nachweis mit Hilfe von ReadyCult<sup>®</sup> beruht auf der X-GAL Reaktion mit der Gesamtcolifome und der MUG-Reaktion mit der *E. coli* nachgewiesen werden können. Mithilfe des Farbumschlages, der Fluoreszenz und der Indolreaktion kann somit eine verlässliche Aussage über die Belastung von Wasserproben mit *E. coli* gemacht werden. Meine Untersuchungen zeigen, daß nach 24 Stunden ein 100 prozentiger Nachweis von *E. coli* möglich ist und die angegebene Zeit nicht unterschritten werden sollte. Da nur 97 % der *E. coli* Stämme das Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase besitzen, darf auf weitergehende Untersuchungen zum exakten Nachweis von *E. coli* nicht verzichtet werden, da es auch  $\beta$ -D-Glucuronidase negative Stämme gibt.

Die FISH-Technik, die über speziell angefertigte Oligonucleotidsonden den Nachweis von *E. coli* führt, hat bei meinen Untersuchungen ein Problem offenbart, daß auch schon andere Untersuchungen aufgezeigt haben.

Kleine Mengen von *E. coli* können erst nach deren Anreicherung in einem Kulturmedium nachgewiesen werden, was aber mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden ist. So konnte erst nach 24 h Voranreicherungszeit in 95 % der

## 6. Zusammenfassung

Proben *E. coli* nachgewiesen werden, was in Bezug zum Aufwand dieser Methode eindeutig zu lange ist.

Bei der Mikrokoloniehybridisierung erfolgt der Nachweis von *E. coli* über Mikrofilter, durch die bestimmte Mengen von Wasserproben gepresst werden. Danach werden diese Mikrofilter auf Endo- oder Tergitolagar gelegt und für eine gewisse Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Filter wie bei der FISH-Technik mit Oligonucleotidsonden behandelt.

Hier zeigte sich, daß bei meinen Untersuchungen kein perfektes Zusammenspiel meiner verwendeten Materialien erfolgte, und dadurch ein zu geringer Nachweis von *E. coli* erfolgte. Es kam zu einer unzureichenden Adhärenz von *E. coli* an den Filtern, was über die stichprobenartige Untersuchung des Waschpuffers herausgefunden wurde. So konnten maximal 10 % meiner Proben mit Tergitolagar als positiv befunden werden. Die von mir hier durchgeführte Mikrokoloniehybridisierung ist deshalb zum schnellen und sicheren Nachweis von *E. coli* ungeeignet.

Der Nachweis von *E. coli* über den LightCycler<sup>®</sup> beruht auf der Verwendung von Gensonden, die an bestimmte Gensequenzen von *E. coli* binden. Es ist somit möglich geringste Mengen an Bakterien nachzuweisen. Ob es sich dabei um lebende Bakterien oder nur DNA-Bruchstücke handelt, kann hierbei nicht unterschieden werden. Es konnte gezeigt werden, daß bereits nach 4 Stunden Voranreicherungszeit eine Nachweisrate von 100 % erfolgte. Somit ist die LightCycler<sup>®</sup>-Methode die schnellste und genaueste meiner Untersuchungen und eignet sich hervorragend zum schnellen Nachweis von *E. coli*. Ein Abstrich muß allerdings in Bezug auf die Kosten dieser Methode gemacht werden. Angesichts der hohen Anschaffungskosten eines LightCylers<sup>®</sup> und der notwendigen Extraktionskits, kann diese Methode nicht in jedem Labor zur Anwendung kommen.

In Krisenzeiten mit weitgehender Zerstörung der Infrastruktur ist als erste Maßnahme zur Sicherung der Trinkwasserversorgung die Untersuchung mit Readycult<sup>®</sup> geeignet. Diese Methode ist auf Grund ihres geringen Materialbedarfs hierfür geradezu prädestiniert.

## 6. Zusammenfassung

Spielen die Kosten keine Rolle, kann heute nur noch die Untersuchung mit einer RT-PCR empfohlen werden.



## 7. Anhang

**Tabelle 7 zu Diagramm 1 und 2:**  
Anfangskontrolle der Proben mit Readycult<sup>®</sup>, FISH und API 20 E

Wasserprobe \ Technik	Readycult <sup>®</sup>	FISH-Technik		API 20 E
		Dapi	CY 3	
Probe 1	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 2	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 3	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 4	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 5	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 6	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 7	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 8	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 9	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 10	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 11	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 12	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 13	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 14	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 15	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 16	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 17	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 18	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 19	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>
Probe 20	negativ	negativ	negativ	Kein <i>E. coli</i>

## 7. Anhang

**Tabelle 8 zu Diagramm 4 und 5:**  
Ergebnisse Readycult<sup>®</sup> nach 4 und 8h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	4 h		8 h	
	Verfärbung	Fluoreszenz	Verfärbung	Fluoreszenz
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden

## 7. Anhang

**Tabelle 9 zu Diagramm 4 und 5:**  
Ergebnisse Readycult® nach 4 und 8h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	4 h		8 h	
	Verfärbung	Fluoreszenz	Verfärbung	Fluoreszenz
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	gelb	nicht vorhanden

## 7. Anhang

**Tabelle 10 zu Diagramm 6 und 7:**  
Ergebnisse Readycult® nach 18 und 24h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	18 h		24 h	
	Verfärbung	Fluoreszenz	Verfärbung	Fluoreszenz
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	blaugrün	hellblau
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	nicht vorhanden	blaugrün	hellblau
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	blaugrün	hellblau
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau

## 7. Anhang

**Tabelle 11 zu Diagramm 6 und 7:**  
Ergebnisse ReadyCult<sup>®</sup> nach 18 und 24h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	18 h		24 h	
	Verfärbung	Fluoreszenz	Verfärbung	Fluoreszenz
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	blaugrün	hellblau
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	gelb	nicht vorhanden	blaugrün	hellblau
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	blaugrün	hellblau	blaugrün	hellblau

7. Anhang

**Tabelle 12 zu Diagramm 8:**

Ergebnisse FISH-Technik nach 4h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	4 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 13 zu Diagramm 8:**

Ergebnisse FISH-Technik nach 4h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	4 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 14 zu Diagramm 9:**

Ergebnisse FISH-Technik nach 8h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	8 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv

7. Anhang

**Tabelle 15 zu Diagramm 9:**

Ergebnisse FISH-Technik nach 8h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	8 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	trüb	positiv
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	negativ	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 16 zu Diagramm 10:**  
Ergebnisse FISH-Technik nach 18h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	18 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	trüb	positiv
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	negativ	positiv
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	negativ	positiv
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	trüb	positiv
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	trüb	positiv
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 17 zu Diagramm 10:**  
Ergebnisse FISH-Technik nach 18h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	18 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	negativ	negativ	braun	positiv
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 18 zu Diagramm 11:**  
Ergebnisse FISH-Technik nach 24h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	24 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	schwach positiv	gelb	positiv
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 19 zu Diagramm 11:**  
Ergebnisse FISH-Technik nach 24h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Wasserprobe \ Zeit	24 h		optische Kontrolle	
	Dapi	CY 3	Trübung	Gasbildung
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	negativ	trüb	positiv
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	gelb	positiv
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	trüb	positiv
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	braun	positiv

7. Anhang

**Tabelle 20 zu Diagramm 12:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 2 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 6	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 7	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 12	positiv	positiv	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 16	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	positiv	negativ	positiv	negativ
Probe 19	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

## 7. Anhang

**Tabelle 21 zu Diagramm 13:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 4 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 2	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 3	positiv	negativ	positiv	positiv
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 7	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 12	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 16	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 19	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

## 7. Anhang

**Tabelle 22 zu Diagramm 14:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 6 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 7	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 12	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 16	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	positiv	positiv
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

7. Anhang

**Tabelle 23 zu Diagramm 15:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Endoagar nach 8 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	positiv	positiv
Probe 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	positiv	positiv	negativ	negativ
Probe 11	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 12	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 16	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

7. Anhang

**Tabelle 24 zu Diagramm 16:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 2 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 2	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 6	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 8	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 9	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 12	positiv	positiv	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 16	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 17	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

7. Anhang

**Tabelle 25 zu Diagramm 17:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 4 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 2	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 6	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 8	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 11	positiv	negativ	positiv	positiv
Probe 12	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 16	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	positiv	negativ

## 7. Anhang

**Tabelle 26 zu Diagramm 18:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 6 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 6	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 7	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 8	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 9	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 12	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 13	positiv	positiv	negativ	negativ
Probe 14	negativ	negativ	positiv	positiv
Probe 15	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 16	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 17	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 18	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

## 7. Anhang

**Tabelle 27 zu Diagramm 19:**  
Ergebnisse Mikrofilter auf Tergitolagar nach 8 h

Wasserprobe \ Konzentration	0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung		1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	
	Dapi	Cy3	Dapi	Cy3
Probe 1	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 5	negativ	negativ	positiv	positiv
Probe 6	positiv	positiv	positiv	negativ
Probe 7	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 8	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 9	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 10	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 11	negativ	negativ	positiv	negativ
Probe 12	positiv	negativ	negativ	negativ
Probe 13	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 14	positiv	positiv	negativ	negativ
Probe 15	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 16	negativ	negativ	positiv	positiv
Probe 17	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 18	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 19	negativ	negativ	negativ	negativ
Probe 20	negativ	negativ	negativ	negativ

## 7. Anhang

**Tabelle 28 zu Diagramm 20 - 23:**  
Ergebnisse LightCycler® nach 4, 8, 18 und 24h versetzt mit 0,1 ml *E. coli*-Lösung

Zeit Wasserprobe	4 h	8 h	18 h	24 h
Probe 1 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 2 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 3 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 4 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 5 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 6 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 7 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 8 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 9 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 10 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 11 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 12 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 13 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 14 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 15 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 16 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 17 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 18 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 19 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 20 mit 0,1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv

## 7. Anhang

**Tabelle 29 zu Diagramm 20 - 23:**  
Ergebnisse LightCycler® nach 4, 8, 18 und 24h versetzt mit 1 ml *E. coli*-Lösung

Zeit Wasserprobe	4 h	8 h	18 h	24 h
Probe 1 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 2 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 3 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 4 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 5 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 6 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 7 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 8 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 9 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 10 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 11 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 12 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 13 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 14 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 15 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 16 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 17 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 18 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 19 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv
Probe 20 mit 1 ml <i>E. coli</i> -Lösung	positiv	positiv	positiv	positiv



**8. Literaturverzeichnis**

- Abu-Halaweh, M; Bates, J; Patel, BK  
Res. Microbiol. 2005; 156(1): 107-14  
Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR
- Altwegg M  
Eur. J. Clin. Microbiol. 1983; 2(6) : 529-33  
Performance of two four-hour identification systems with atypical strains of Enterobacteriaceae
- Amann RI, Krumholz I, Stahl DA  
J. Bacteriol. 1990; 172(2): 762-70  
Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer KA  
Appl. Environ. Microbiol. 1992; 58(9) :3007-11  
Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH  
Microbiol. Rev. 1995;59(1): 143-69  
Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation
- Armisen TG, Servais P  
Water Sci. Technol. 2004; 50(1): 271-5  
Combining direct viable count (DVC) and fluorescent in situ hybridisation (FISH) to enumerate viable *E. coli* in rivers and wastewaters
- Azad AK, Hafiz Fauzia, Badiar Rahman SM  
Pakistan Journal of Biological Sciences 2003; 6(8): 770-773  
Fluorogenic assays for rapid detection of *Escherichia coli* in tap water and raw milk samples
- Bellin T, Pulz M, Matussek A, Hempen HG, Gunzer F  
J. Clin. Microbiol. 2001; 39(1): 370-4  
Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes
- Bischoff C, Luthy J, Altwegg M, Baggi F  
J. Microbiol. Methods 2005; 61(3): 335-41  
Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR

## 8. Literaturverzeichnis

- Bohnert J, Hübner B, Botzenhart K  
Int. J. Hyg. Environ. Health 2000; 203: 77-82  
Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe
- Brenner K, Rankin CC  
Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(1): 54-64  
New screening test to determine the acceptability of 0,45-microne membrane filters for analysis of water
- Brenner KP, Rankin CC, Sivaganesan M, Scarpino PV  
Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62(1): 203-8  
Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by the MI arag method and the U.S. Environmental Protection Agency-approved membrane filter method
- Brismar H, Ulfhake B  
Nature Biotech. 1997; 15: 373-77  
Fluorescence lifetime measurements in confocal microscopy of neurons labelled with multiple fluorophores
- Ciebin BW, Brodsky MH, Eddington R, Horsnell G, Choney A, Palmateer G, Ley A, Joshi R, Shears G  
Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61(11): 3940-2  
Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water
- Clark JA, Pagel JE  
Can. J. Microbiol. 1977; 23(4): 465-70  
Pollution indicator bacteria associated with municipal raw and drinking water supplies
- Cullander C  
J. Microsc. 1994; 176: 281-86  
Imaging in the far-red with electronic light microscopy: requirements and limitations
- DeLong EF, Wickham GS, Pace NR  
Science 1989; 243(4896). 1360-3  
Phylogenetic stains : ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells
- DeLong EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM  
Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65(12) :5554-63  
Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization

## 8. Literaturverzeichnis

- Denis-Mize K, Fout GS, Dahling DR, Francy DS  
J. Water Health 2004; 2(1): 37-47  
Detection of human enteric viruses in stream water with RT-PCR and cell culture
- Dreier J, Stormer M, Kleesiek K  
J. Clin. Microbiol. 2004; 42(10): 4759-64  
Two novel real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates
- Feuerpfeil I, Szewzyk R  
Grohmann A, Hässelbarth U, Schwerdtfeger W (Hrsg.)  
Erich Schmidt Verlag 2002  
Die Trinkwasserverordnung  
*E. coli*, coliforme Bakterien und Enterokokken. Bedeutung und Bestimmung
- Fitzmaurice J, Glennon M, Duffy G, Sheridan JJ, Carroll C, Maher M  
Mol. Cell. Probes 2004; 18(2): 123-32  
Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in *E. coli* O157:H7
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW  
Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(9): 3336-45  
Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes
- Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R  
J. Clin Microbiol. 2003; 41(11): 5134-46  
Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools
- Garcia-Armisen T, Servais P  
J. Microbiol. Methods 2004; 58(2): 269-79  
Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization.
- Garcia-Armisen T, Lebaron P, Servais P  
Lett. Appl. Microbiol. 2005 ; 40(4): 278-82  
Beta-D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwater
- Grasso GM, Sanmarco ML, Ripabelli G, Fanelli I  
Microbios. 2000;103(405): 119-25  
Enumeration of *Escherichia coli* and coliforms in surface water by multiple tube fermentation and membrane filter methods.

## 8. Literaturverzeichnis

- Higgins JA, Nasarabadi S, Karns JS, Shelton DR, Cooper M, Gbakima A, Koopman RP  
Biosens Bioelectron 2003; 18(9):1115-23  
A handheld real time thermal cyler for bacterial pathogen detection
- Himelbloom BH, Pfitzenreuter RC  
J. Food Prot. 1998; 61(9): 1119-23  
False-positive fluorescence by pink salmon tissue and staphylococci in a rapid test for *Escherichia coli*
- Huang H, Oberkotter E, Blume H  
Pharmazie 1994; 49(6): 428-32  
Determination of *E. coli* with MUG (Fluorocult)-lauryl sulphate broth for the testing of microbial contamination in drugs
- Izard D, Husson MO, Vincent P, Leclerc H, Monget D, Boeufgras JM  
J. Clin. Microbiol. 1984; 20(1): 51-4  
Evaluation of the four-hour rapid 20E system for identification of members of the family Enterobacteriaceae
- Joachimsthal EL, Ivanov V, Tay ST, Tay JH  
Mar. Pollut. Bull. 2004; 49(4): 334-43  
Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH
- Jothikumar N, Griffiths MW  
Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68(6): 3169-71  
Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays
- Kayser Fritz H., Bienz Kurt A.  
Georg Thieme Verlag 1999  
Medizinische Mikrobiologie
- Kilian M, Bülow P  
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1976; 84(5): 245-51  
Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases.
- Kilian M, Bülow P  
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1979; 87(5): 271-6  
Rapid identification of Enterobacteriaceae. II. Use of a beta-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples.

## 8. Literaturverzeichnis

- Kolbeck K, Richter KD, Heinemeyer EA  
Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 1992; 193(3): 224-9  
Comparative study of the detection of *E. coli* after time in seawater with partially modified standard media
- Lepeuple S, Delabre K, Giloupe S, Intertaglia L, de Roubin MR  
Water Sci. Technol. 2003; 47(3): 123-9  
Laser scanning-detection of FISH-labelled *Escherichia coli* from water samples
- Lin, W.-c. et al.  
Cancer Res. 1990; 50: 2808-2817  
Development of micrometastases: earliest events detected with bacterial lacZ gene-tagged tumor cells
- Lojda, Z. et al.  
Histochemie 1973; 34: 361-369  
Synthetic substrates in the histochemical demonstration of intestinal disaccharidases
- Manafi M; Kneifel W  
Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 1989; 189(3): 225-34  
A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water
- Mariscal A, Garcia A, Carnero M, Gomez E, Fernandez-Crehuet J  
Biotechniques 1994; 16(5): 888-93  
New toxicity determination method that uses fluorescent assay of *Escherichia coli*
- McFeters GA, Broadaway SC, Pyle BH, Pickett M, Egozy Y  
Water Sci. Technol. 1995; 31(5-6): 259-61  
Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*
- Mead JAR et al.  
Biochem. J. 1955; 61 : 569-574  
Synthese von 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid und Bestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase.
- Merck  
1-2-3 Fertig Werbeprospekt
- Mujumdar, RB et al.  
Bioconjugate Chem. 1993; 4 :105-11  
Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters

## 8. Literaturverzeichnis

- Neidhardt S, Havemeister G, Holler C, Gundermann KO  
Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 1995; 198(2): 152-64  
Evaluation of MUG-supplemented media for the detection of *E. coli* in recreational water surveillance
- Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, Ezura Y  
J. Appl. Microbiol. 2003; 95(6): 1182-90  
Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample
- Pao S, Davis CL, Friedrich LM, Parish ME  
J. Food Prot. 2002; 65(12): 1943-8  
Utilization of fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in acidic fruit juice
- Papasian CJ, Hertlein G  
Diagn. Microbiol. Infect Dis. 1987; 8(4): 255-8  
Rapid identification of *Escherichia coli* with a fluorogenic beta-glucuronidase assay
- Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Krogfelt KA  
Infect. Immun. 1994; 62(11): 5191-4  
Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization
- Pschyrembel  
Walter de Gruyter Verlag Berlin  
Klinisches Wörterbuch 258. Auflage
- Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, Bellin T, Buer J, Gunzer F  
J. Clin. Microbiol. 2003; 41(10): 4671-5  
Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens
- Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, Roske I, Schreier E  
Arch. Virol. 2005; 150(5): 929-47  
Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters
- Reischl U, Youssef MT, Kilwinski J, Lehn N, Zhang WL, Karch H, Strockbine NA  
J. Clin. Microbiol. 2002; 40(7): 2555-65  
Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

## 8. Literaturverzeichnis

- Reischl U, Youssef MT, Wolf H, Hyytia-Tress E, Strockbine NA  
J. Clin. Microbiol. 2004; 42(9): 4092-100  
Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes from enterotoxigenic *Escherichia coli*
- Roche Molecular Biochemicals 1999  
PCR Applications Manual 2<sup>nd</sup> edition
- Rompere A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P  
J. Microbiol. Methods 2002; 49(1): 31-54  
Detection and enumeration of coliforms in drinking water : current methods and emerging approaches
- Rose RE, Geldreich EE, Litsky W  
Appl. Microbiol. 1975; 29(4): 532-6  
Improved membrane filter method for fecal coliform analysis
- Sarhan HR, Williams LR, Foster HA  
J. Dairy. Res. 1997; 58(4): 477-83  
Evaluation of a rapid fluorogenic method for the detection of *Escherichia coli* in dairy products
- Schlegel HG  
Georg Thieme Verlag 1992  
Allgemeine Mikrobiologie
- Shadix LC, Dunnigan ME, Rice EW  
Can. J. Microbiol. 1993; 39(11): 1066-70  
Detection of *Escherichia coli* by the nutrient agar plus 4-methylumbelliferyl beta-D-glucuronide (MUG) membrane filter method
- Straka M, Dela Cruz W, Blackmoon C, Johnson O, Stassen S, Streitman D, Golden S, Stamilio D  
Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 2004; 12(3-4): 109-14  
Rapid detection of group B streptococcus and *Escherichia coli* in amniotic fluid using real-time fluorescent PCR
- Taylor DE, Rooker M, Keelan M, NG LK, Martin I, Perna NT, Burland NT, Blattner FR  
J. Bacteriol. 2002; 184(17): 4690-8  
Genomic variability of O islands encoding tellurite resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates

## 8. Literaturverzeichnis

- Townsend DE, Irving RL, Naqui A  
J. Food Prot. 1998; 61(4): 444-9  
Comparison of the SimPlate coliform and *Escherichia coli* test with Petrifil, three-tube MPN, and VRBA + MUG methods for enumerating coliforms and *E. coli* in food
- Van Poucke SO, Nelis HJ  
J. Microbiol. Methods 2000; 42(3): 233-44  
Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and *Escherichia coli* on membrane filters
- Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U  
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 48(4): 229-41  
Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes
- Wessendorf MW, Brelje TC  
Histochem. 1992; 98: 81-5  
Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red and cyanine
- Zhao W, Yao S, Hsing IM  
Biosens. Bioelectron. 2005 May 28  
A microsystem compatible strategy for viable *Escherichia coli* detection

## Danksagung

### **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr.

K. Botzenhart für die Überlassung des Themas und der Vermittlung seiner wissenschaftlichen Denkweise.

Herr Professor Botzenhart stand mir stets mit gutem Rat aber auch kritischer Anmerkung hilfsbereit zur Seite.

Ich möchte mich auch bei Herrn Dr. Albrecht Wiedenmann und Frau Dr. Petra Krüger für ihre fachliche Beratung sowie der Interpretation der Ergebnisse bedanken.

Für die Einweisung in die FISH-Technik durch Frau Neu und Frau Merkt im Wasserlabor bin ich sehr dankbar.

Mein Dank gebührt allen Mitarbeitern des Institutes, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben.



## Lebenslauf

### Lebenslauf

**Name:** Andreas Alexander Beyer

**Geb. am:** 02.05.1976

**Geburtsort:** Tübingen

**Eltern:** Dr. Hans-Jürgen Beyer, Zahnarzt  
Christa Beyer, Hausfrau

**Geschwister:** Dr. Christine Beyer, Zahnärztin

**Schulbildung:** von 1982 - 1986 Besuch der Hohenberg-Grundschule in Rottenburg  
von 1986 - 29.06.1995 Besuch des Eugen-Bolz-Gymnasiums in Rottenburg

**Schulabschluss:** Abitur am 29.06.1995

**Wehrdienst:** Von Oktober 1995- 31.Dezember 1995  
Grundausbildung in Bayreuth  
Vom 1. Januar bis 31.Juli 1996 Stabsdienstsoldat im Luftwaffenkommando Süd

**Praktikum:** Von Mai - August 1997 Praktikum bei A. Dorn  
Metallbearbeitung Hirrlingen

**Studium:** WS 1997/1998 Luft- und Raumfahrttechnik an der Universität Stuttgart  
Vom Sommersemester 1998 - 04.06.04 Studium der Zahnmedizin an der Universität Tübingen  
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 12.03.1999  
Zahnärztliche Vorprüfung am 04.04.2001  
Zahnärztliche Prüfung am 04.06.2004  
Approbation als Zahnarzt am 17.06.2004

**Ab Juli 2004:** Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis meines Vaters Dr. Hans-Jürgen Beyer

