

Aus dem Fachbereich Humanmedizin der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität  
Frankfurt am Main

Institut für Hygiene und Umweltmedizin  
(Direktor: Professor Dr. med. R. H. W. Schubert)

# **Quantitativer Nachweis chlorungsvorgeschädigter Escherichia coli**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Peter Kelemen  
Budapest

Frankfurt am Main  
2001

Tag der Disputation : 27.02.2002

Prüfungskommission : Prof. Dr. med. H. Siefert (Vorsitzender)  
Prof. Dr. med. R. H. W. Schubert (Referent)  
Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. Bitter (Koreferent)  
Prof. Dr. med. V. von Löwenich

# Inhaltsverzeichnis

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>1.</b>  | <b>1.1 Abstract</b> .....   | 4  |
|            | <b>1.2 Zusammenfassung</b> .....  | 5  |
| <b>2.</b>  | <b>Einleitung</b> .....   | 6  |
| <b>3.</b>  | <b>Materialien</b>  |    |
|            | 3.1 Bakterienstämme .....   | 11 |
|            | 3.2 Nährmedien, Lösungen und weitere Chemikalien .....  | 12 |
| <b>4.</b>  | <b>Methodik</b>   |    |
|            | 4.1 Allgemeine Vorbereitungen   |    |
|            | 4.1.1 Langzeitlagerung der Bakterienstämme.....   | 21 |
|            | 4.1.2 Herstellung und Lagerung der Subkulturen.....   | 21 |
|            | 4.1.3 Herstellung und Lagerung der Stammsuspensionen .....                                    | 21 |
|            | 4.1.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration .....   | 22 |
|            | 4.2 Vorversuche   |    |
|            | 4.2.1 Bakterienkonzentration in den Vorversuchen .....  | 23 |
|            | 4.2.2 Absterbekinetik in der Stammsuspension .....  | 23 |
|            | 4.2.3 Bestimmung der Chlorkonzentration in der NaOCl-Lösung .....                             | 28 |
|            | 4.2.4 Chlorung .....  | 29 |
|            | 4.2.5 Absterbekinetik in der chlorungsvogeschädigten Suspension.....                          | 35 |
|            | 4.2.6 Bakterienkonzentration in den Hauptversuchen .....                                      | 41 |
|            | 4.3 Hauptversuche   |    |
|            | 4.3.1 Vergleiche zwischen verschiedenen Nährmedien<br>und deren statistische Auswertung ..... | 48 |
| <b>5.</b>  | <b>Ergebnisse</b>   |    |
|            | 5.1 Vergleich zwischen CSL und DEV-LPL.....   | 49 |
|            | 5.2 Vergleich der Komponenten von CSL und DEV-LPL.....  | 54 |
|            | 5.3 Konzentrationsabhängige Wirkung von Bromkresolpurpur.....                                 | 66 |
| <b>6.</b>  | <b>Diskussion</b> .....   | 77 |
| <b>7.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | 81 |
| <b>8.</b>  | <b>Danksagung</b> .....   | 88 |
| <b>9.</b>  | <b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....   | 89 |
| <b>10.</b> | <b>Lebenslauf</b> .....   | 90 |

## 1.1 Abstract

Conscientious dealing with chemicals demands the reduction to the lowest effective doses. The efficacy has to be controlled very carefully especially in the purification of (drinking) water, since too low concentrations are frequently associated with microbial contamination.

Control processes seem to be adequate if only they detect sane organisms. But especially after incomplete disinfection impaired germs remain which can be recovered in good conditions. After resuscitation bacteria can multiply and cause diseases again. Therefore recovery media have to detect these cells as well. Otherwise the results might be false negative.

In the multi-step detection of *Escherichia coli* according to the German standard methods for the examination of water, sewage and sludge (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, DEV) a special lactose-peptone-solution is used as primary medium. But it has already been tested insufficient for membrane filtration. The same problem is confirmed for the alternative German standard method – liquid enrichment – in this paper.

Bromkresol purple turned out to be the reason for lower initial growth rates in the DEV-medium compared with Caso-broth (Oxoid CM 131). In German standard methods it is used in a concentration of 20 µg/l to indicate the metabolism of *E. coli*. Compared to other selective media bromkresol purple had better results for sane microbes and was therefore described as “less toxic”. To the chlorine-injured bacteria investigated in this study it caused significant inhibition.

Following examination showed that a bromkresol purple concentration of 10 µg/l affected only some of the strains and at 5 µg/l it had no negative effect at all. And still – at any of these concentrations, the colours of negative and positive samples were clearly distinguishable.

## 1.2 Zusammenfassung

Zum Schutz von Umwelt und Bevölkerung vor unerwünschten Nebenwirkungen wird vielfach der Einsatz von Chemikalien auf ein notwendiges Minimum reduziert. Gerade in der Trinkwasseraufbereitung muss deren Wirkung sorgfältig und zuverlässig kontrolliert werden, da es bei einer Unterdosierung leicht zur Kontamination mit Mikroorganismen kommt.

Ein Verfahren mag zum Nachweis solcher Mikroorganismen als geeignet erscheinen, wenn es intakte Keime anzeigt. Gerade in vorbehandelten Proben können jedoch nach einer unvollständigen Desinfektion geschädigte Zellen enthalten sein, die sich unter günstigen Bedingungen erholen (Resuscitation), d. h. ihre Vermehrungsfähigkeit wiedererlangen und dadurch Infektionen auslösen können. Also sollten dafür verwendete Medien auch solche Erreger erfassen, da ansonsten falsch negative Ergebnisse die Folge sind.

Im mehrstufigen Nachweis von *Escherichia coli* nach den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser und Schlammuntersuchung (DEV) wird eine Lactose-Pepton-Lösung als Primärkulturmedium beschrieben, die schon für das Membranfilter-Verfahren als nicht optimal eingestuft wurde. Diese Problematik hatte sich in der vorliegenden Arbeit auch für die Flüssigkeitsanreicherung, das zweite Verfahren nach den DEV, gezeigt.

Als Ursache für die verminderten Angehraten im DEV-Medium konnte das darin in einer Konzentration von 20 µg/l enthaltene Bromkresolpurpur identifiziert werden. Um das Wachstum bestimmter Mikroorganismen anhand ihrer spezifischen Stoffwechselleistungen anzuzeigen, werden geeignete Substrate in Kombination mit entsprechenden pH-Indikatoren verwendet, zu denen auch das Bromkresolpurpur zählt. Für ungeschädigte Keime hatte letzteres im Vergleich mit anderen, Selektionsmitteln enthaltenden Nährmedien besser abgeschnitten und wurde als „weniger giftig“ bezeichnet. Bei den in dieser Arbeit untersuchten chlorungsvorgeschädigten Zellen bewirkte es eine signifikante Wachstumshemmung.

Im Zuge der weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Bromkresolpurpur-Konzentration auf 10 µg/l nur noch bei einem Teil und auf 5 µg/l bei keinem der verwendeten Stämme mehr eine signifikante Veränderung der Angehrate bewirkte.

Die Funktion als Farbindikator wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

## 2. Einleitung

Nicht nur die Tatsache, dass vor Milliarden von Jahren die ersten Lebewesen im Wasser entstanden sind, zeigt, wie wichtig dieser bei 101,3 kPa zwischen 0 und 100°C flüssige Stoff für das Leben überhaupt ist. Auch beim heutigen Menschen verläuft der erste Teil der Entwicklung in diesem Element. Alle physiologischen und physiologisch-chemischen Vorgänge können nur in wässrigem Milieu ablaufen, deshalb versucht der Körper auch nach der Geburt – in jetzt „trockener Umgebung“ – den Wassergehalt auf Dauer über 60% zu halten <sup>(28)</sup>. Während der Mensch viele Tage und sogar Wochen ohne Nahrung auskommen kann, wird er nur einige Tage ohne Trinken überleben. Im Rahmen von Erkrankungen wie Cholera oder Diabetes insipidus werden die Folgen einer negativen Wasserbilanz besonders deutlich <sup>(21)</sup>. Schon die Ausscheidung bei Ruhestoffwechsel im physiologischen Rahmen (ohne körperliche Anstrengung oder Krankheit) über Urin, Fäzes, Verdunstung und Atmung beträgt minimal 1700 ml/d. Durch eine durchschnittlichen Ernährung wird aber nur ein Teil dieses Wasserverlustes ausgeglichen, so dass zusätzlich eine ständige Zufuhr von mindestens 1000 ml Wasser nötig ist, um das Fließgleichgewicht im Organismus aufrecht zu erhalten <sup>(10)</sup>. Meist wird dieser Bedarf durch die alltägliche körperliche und geistige Arbeit auf ca. 2000 – 3000 ml erhöht. Daher wird Wasser auch als „das wichtigste Lebensmittel“ bezeichnet <sup>(7)</sup>.

Lange Zeit wurde nur Oberflächen- und Quellwasser, aus Bächen, Flüssen und Seen sowie natürlichen Quellen, für die Wasserversorgung genutzt und später durch den Bau von Brunnen das Grundwasser auch an Orten, an denen es nicht von alleine (als Quelle) zu Tage trat, erschlossen. Die zunehmende Bevölkerungszahl sowie -dichte allgemein und die Ausbildung von Ballungszentren im besonderen führten schon früh dazu, dass die natürlichen Vorkommen in manchen Gebieten einerseits nicht mehr den Bedarf der darin lebenden Menschen decken konnten und andererseits durch die gleichzeitig steigende Menge der anfallenden Fäkalien in ihrer Qualität bedroht waren. Im antiken Rom brachte das ausgeklügelte System aus Aquädukten und Kanälen einen bedeutenden Fortschritt in der Versorgung mit Frisch- und der Entsorgung von Abwasser, angesichts eines Wasserverbrauchs von knapp 70 km<sup>3</sup> nur im Jahr 2000 alleine in Deutschland <sup>(7)</sup> wird aber klar, welche Probleme die Deckung des Bedarfes in erforderlicher Qualität heute bereitet. Obwohl der größte Teil schon längst nicht mehr zum Trinken verwendet, ist es auch für andere Zwecke sinnvoll, ähnliche Anforderung zu stellen. Beim Baden oder Schwimmen kommen die Menschen selbst, bei Lebensmittel verarbeitenden Betrieben ihre Nahrungsmittel in direkten oder indirekten Kontakt mit Wasser, so dass auch hier gleich hohe Ansprüche gestellt werden (siehe unten).

Noch bevor das in den Wolken kondensierte Wasser als Regen die Erde erreicht, hat es Gase und Abgase aus der Luft absorbiert. Als Oberflächenwasser nimmt es neben Mineralien und organischen Substanzen auch schädliche Chemikalien und biologische Abfallstoffe auf. Besonders die Verschmutzung durch Fäkalien birgt bei Genuss ohne Vorbehandlung die Gefahr von schwerwiegenden Infektionen durch Mikroorganismen wie *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* etc. <sup>(12)</sup>. Zwar wirkt das Erdreich beim Versickern als mechanischer und adsorptiver Filter, so dass Grundwasser in 6 bis 8 m Tiefe zumindest einigermaßen sauber und keimfrei, aber auch schon nicht mehr absolut sicher ist <sup>(17)</sup>. Außerdem reichen die natürlichen Grund- und Quellwasservorkommen bei weitem nicht aus. Deshalb wird zur Trinkwassergewinnung auch Uferfiltrat (7%), angereichertes Grundwasser (9%) sowie Fluss-, See- und Talsperrenwasser (11%) herangezogen. Gerade bei letztgenannter Gruppe lässt sich die Kontamination mit unerwünschten oder gar gesundheitsgefährdenden Bestandteilen nicht vermeiden, da es in Mitteleuropa kaum ein Niederschlags-Einzugsgebiet ohne menschliche Ansiedelung und landwirtschaftlich oder industriell genutzte Flächen gibt <sup>(7) (15)</sup>.

Die Anforderungen, denen Trink- und Brauchwasser genügen muss, sind in § 11 Abs. 1 Bundesseuchengesetz (BSeuchG) ganz allgemein definiert:

Trinkwasser, sowie Wasser für Betriebe, in denen Lebensmittel gewerbsmäßig hergestellt oder behandelt werden oder die Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr bringen, muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger, nicht zu besorgen ist.

Schwimm- oder Badebeckenwasser in öffentlichen Bädern oder Gewerbebetrieben muss so beschaffen sein, dass durch seinen Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist <sup>(14)</sup>.

Außerdem werden aus hygienischer Sicht angenehmer Geruch und Geschmack sowie farbloses kristallklares Aussehen gefordert <sup>(8)</sup>.

Um all diesen Ansprüchen zu genügen, muss das sogenannte Rohwasser zum Teil sehr aufwendig aufbereitet werden. Physikalische und chemische Verfahren wie Filterung, Sedimentation, Koagulation (Flockung), Fällung, Belüftung und Ionenaustausch können zwar einen hohen Grad an Reinheit bringen, der sichere Schutz vor gesundheitlichen Schäden durch Krankheitserreger lässt sich jedoch vielfach nur durch Desinfektion erreichen <sup>(7)</sup>.

Die weltweit wohl am meisten verbreitete Methode zur Wasserdeseinfektion ist diejenige mittels Chlorung <sup>(25)</sup>. Ihre Einführung Anfang des 20. Jahrhunderts in den Vereinigten Staaten brachte einen gewaltigen Fortschritt in der Eindämmung von Infektionskrankheiten wie Cholera und Typhus, die zuvor auch über das Trinkwassersystem verbreitet wurden. Darüber hinaus trägt sie zur Beseitigung von störendem Geruch und Geschmack, Verhinderung von Algenwachstum, Entfärbung etc. bei <sup>(27)</sup>. Während die Verwendung anderer Desinfektionsmittel wie Chlordioxid ( $\text{ClO}_2$ ) fachlich höher qualifiziertes Personal erfordert <sup>(8)</sup> oder wie Ozon ( $\text{O}_3$ ) durch höhere Herstellungskosten weniger wirtschaftlich ist, ist der Einsatz von Chlor ( $\text{Cl}_2$ ) ein wirksames und preisgünstiges Verfahren, das im Gegensatz zur Bestrahlung mit ultraviolettem Licht auch bei Trübung wirkt und anders als Ozon, das aufgrund seines raschen Verfalls nicht den Endverbraucher erreicht, zum Schutz des gesamten Wasserversorgungsnetzes vor Verkeimung geeignet ist <sup>(7)</sup>.

Als Nachteil dieses Desinfektionsmittels ist die Bildung von Nebenreaktionsprodukten zu nennen, von denen einige durch ihren charakteristisch unangenehmen Geruch auffallen und andere sogar gesundheitsbeeinträchtigende Wirkung haben <sup>(18) (27) (30) (34)</sup>. Sie entstehen bei der Reaktion von Chlor mit zweiwertigen Ionen (Eisen(II)-, Sulfid-, Nitrit-Ionen etc.) sowie organischen Stoffen selbst bei sachgerechter Anwendung <sup>(19)</sup>. Das daraus resultierende Chlorbindungsvermögen bzw. die Chlorzehrung hängt vom Gehalt des Wassers an diesen Stoffen ab. Bei einer starken Verunreinigung wie zum Beispiel aus korrodierenden Rohren bzw. deren Auskleidung im Ver-/Entsorgungsnetz, durch eingespülte Düngemittel aus der Landwirtschaft oder Urin und Schweiß in Schwimmbädern wird ein Großteil des zugeführten Chlors von diesen Bestandteilen gebunden. Nur das danach noch verbleibende, freie Chlor trägt zur eigentlichen Desinfektion bei <sup>(15) (25)</sup>. Eine Reduktion der Belastung durch oben beschriebene Stoffe lässt sich durch den Einsatz physikalisch-chemischer Aufbereitungsverfahren wie Flockungs-Filtration <sup>(12)</sup>, Ozonung etc. erreichen. Dadurch können weniger Nebenreaktionsprodukte entstehen. Das eingesetzte Chlor wird so direkt und überwiegend zum keimabtötenden Agens und kann schließlich in geringeren Mengen zugegeben werden <sup>(44)</sup>.

Die Toxizität von Chlor selbst zeigt sich bei Überdosierung als Reizung der Schleimhäute und Atemwege bei geringen Konzentrationen bis hin zum Lungenödem nach Einatmen von hohen Konzentrationen <sup>(46)</sup>. Deshalb ist man bestrebt, über das Chlorbindungsvermögen hinaus möglichst wenig (0,2 – 0,3 mg/l bei Trinkwasser <sup>(25)</sup>, 0,2 – 1,0 mg/l bei Badewasser <sup>(3)</sup>) zuzudosieren, ohne jedoch den wirksamen Bereich zu verlassen. Es ist leicht einzusehen, dass die positiv wie negativ so wichtige Konzentration an freiem Chlor von vielen unterschiedlichen Parametern

abhängt, die für die Sicherstellung des hygienischen Standards ständig abgeglichen und gegebenenfalls angepasst werden müssen <sup>(44)</sup>.

Wie die Aufbereitung und vor allem auch die Kontrolle von Trinkwasser zu erfolgen hat, ist durch die „Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe“ (Trinkwasserverordnung, TrinkwV) geregelt. Durch die Vorgaben soll eine gleichbleibend gute Qualität auf der Grundlage des Bundesseuchengesetzes (s. o.) gewährleistet werden. Hier sind die Höchstkonzentrationen von chemischen Stoffen und Mikroorganismen ebenso festgelegt wie der genaue Ablauf und die zeitlichen Abstände der einzelnen Untersuchungen. Da bei den mikrobiologischen Verfahren die Feststellung sämtlicher Bakterien mit einem vertretbaren Aufwand nicht zu bewerkstelligen ist, beschränkt man sich zunächst – im Routinebetrieb – auf die Überprüfung auf sogenannten Leitkeime (Escherichia coli und coliforme Bakterien <sup>(20) (23) (47)</sup>). Ihr Nachweis signalisiert die prinzipielle Möglichkeit des Vorkommens anderer Erreger <sup>(26)</sup>, auf die die Proben dann untersucht werden <sup>(12)</sup>. Als maßgeblicher Indikator für eine Verunreinigung durch menschliche oder tierische Fäkalien dient der Nachweis von E. coli <sup>(2)</sup>, während coliforme Bakterien auch außerhalb des Darmes im Boden, an Pflanzen usw. leben oder dort längere Zeit überleben und so auch aus Abwässern, Schmutzwasser oder Oberflächenwasser stammen können <sup>(1) (25)</sup>. Deshalb beginnt die Trinkwasserverordnung wie folgt:

§1 (1) Trinkwasser muss frei sein von Krankheitserregern. Dieses Erfordernis gilt als nicht erfüllt, wenn Trinkwasser in 100 ml Escherichia coli enthält (Grenzwert). <sup>(13)</sup>

Escherichia coli sind gramnegative Stäbchen der Familie der Enterobacteriaceae, die sich sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen vermehren (fakultative Anaerobier). Sie können Glucose, Lactose und andere Zucker unter Bildung von Gas und Säure spalten und Indol bilden, jedoch kein Harnstoff oder Citrat verwerten und zeigen keine Oxidase-Reaktion. Von Bedeutung ist weiterhin die peritriche, aber nicht obligate Begeißelung, die den Bakterien ihre Beweglichkeit verleiht und die Anheftung an Epithelien wie z. B. im Urogenitaltrakt ermöglicht (Pathogenitätsfaktor). Einige Stämme von E. coli gehören zur physiologischen Flora des Darmes von Warmblütern und werden nur dann, wenn sie in andere Körperregionen verschleppt werden, zu Krankheitserregern (fakultativ pathogene Keime, Opportunisten). Insbesondere Harnwegs- und Gallenblasen- bzw. Gallenwegsentzündungen werden durch derartige endogene Infektionen hervorgerufen. Andere Stämme dieser Gattung (z. B. enteropathogene E. coli = EPEC etc.) sowie andere Gattungen dieser Familie (z. B. Salmonella etc.) gehören nicht zur Standortflora des Darmes, sondern lösen Allgemeininfektionen oder Enteritiden aus – sie sind obligat pathogen <sup>(11) (25) (26) (32)</sup>.

Der Nachweis von E. coli erfolgt nach Anlage 1 der Trinkwasserverordnung durch die Untersuchung der oben genannten Stoffwechselmerkmale in drei Stufen:

1. Flüssigkeitsanreicherung nach direkter Einsaat oder Membranfilter-Verfahren mit gleichzeitiger Kontrolle von „Gas- und Säurebildung“
2. Herstellung von Sub- bzw. Reinkulturen zur
3. Testung weiterer Stoffwechselmerkmale

Bei dem mehrstufigen Verfahren kontrolliert der erste Schritt, die Primär- bzw. Anreicherungskultur, die Empfindlichkeit des Nachweises, da sich hier entscheidet, ob überhaupt Keime für die Differenzierung in den weiteren Schritten angezüchtet werden können. Letztere kontrollieren somit die Trennschärfe des Verfahrens <sup>(42)</sup>.

In den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung ist der Nachweis von E. coli (und coliformen Keimen) standardisiert. Hier sind als DIN 38 411 (Teil 6) die Materialien und Methoden für die einzelnen Schritte (s. o.) festgelegt, so dass die Untersuchungen weitestgehend vom Untersucher unabhängig, d. h. objektiv sind <sup>(20)</sup>.

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung des Nachweises von chlorungsgeschädigten, aber noch vermehrungsfähigen Escherichia coli, wie sie z. B. bei einer unvollständigen Desinfektion entstehen können, mit dem Flüssigkeitsanreicherungsverfahren (DIN 38 411 – K 6 – 1).

### 3. Material

#### 3.1 Bakterienstämme

- (A) Escherichia coli ATCC 11229
- (B) Escherichia coli NCTC 10538
- (C) Escherichia coli 5
- (D) Escherichia coli 6
- (E) Escherichia coli 8
- (F) Escherichia coli B 62
- (G) Escherichia coli B 80
- (H) Escherichia coli M 104
- (I) Escherichia coli MB 160
- (K) Escherichia coli MB 170

Die verwendeten Bakterienstämme wurden alle der Sammlung des Institutes entnommen und werden im Folgenden der Übersichtlichkeit halber teilweise nur mit den Buchstaben der ersten Spalte (A – K) bezeichnet.

## 3.2 Nährmedien, Lösungen und weitere Chemikalien

3.2.1 Ammonium-Eisen(II)-Sulfat Merck Art.-Nr. 1.0379(2).1000  
[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O]

3.2.2 Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung (nach DIN 38408, Teil 4, 6.3.12<sup>(20)</sup>)

Bestandteile pro 1000 ml Lösung:

|                           |          |          |
|---------------------------|----------|----------|
| Schwefelsäure             | (3.2.34) | 5,000 ml |
| Ammonium-Eisen(II)-Sulfat | (3.2.1)  | 19,607 g |

In einem Messkolben, Nennvolumen 1000 ml, wurden etwa 250 ml Aqua destillata mit Schwefelsäure in o. g. Menge versetzt und darin Ammonium-Eisen(II)-Sulfat in angegebener Menge gelöst, mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

Die Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Konzentration der frisch angesetzten Lösung beträgt:

$c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}] = 50 \text{ mmol/l}$ .

Da sich die Lösung unter Lichteinwirkung zersetzt, muss sie im Dunkeln aufbewahrt und ihre aktuelle Konzentration täglich neu bestimmt werden. Dazu wurden in einen Erlenmeyer-Kolben, Nennvolumen 250 ml, in der angegebenen Reihenfolge gegeben:

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung | 50,0 ml             |
| Phosphorsäure                         | (3.2.31) 5,0 ml     |
| Barium-Indikator-Lösung               | (3.2.7) 4,0 Tropfen |

Anschließend wurde die Lösung unter Rühren mit dem Magnetrührer mit der Kalium-Dichromat-Lösung (3.2.19) bis zum Farbumschlag von hellgrün nach kräftig grün-violett titriert und das verbrauchte Volumen als  $V_T$  notiert. Bei einem Volumen  $V_T < 22 \text{ ml}$  wurde die Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung entsprechend der DIN-Vorschrift neu angesetzt. Ihre Konzentration ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$c_s = \frac{V_T \cdot c_D \cdot f}{V_V}$$

Hier bedeuten:

- $c_S$  Stoffmengenkonzentration der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung in mmol/l  
 $V_T$  Volumen der Kalium-Dichromat-Lösung, das zur Titration verbraucht wurde, in ml  
 $c_D$  Stoffmengenkonzentration der Kalium-Dichromat-Lösung = 16,67 mmol/l  
 $f$  Äquivalenz-Faktor = 6  
 $V_V$  vorgelegtes Volumen an Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung = 50 ml

### 3.2.3 Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standardlösung

Herstellung durch Verdünnung der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung (3.2.2):

In einem Messkolben, Nennvolumen 200 ml, wurden in etwa 50 ml Aqua destillata 10 ml Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung pipettiert, bis zur Marke mit Aqua destillata aufgefüllt und durchmischt. Die Konzentration der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standard-Lösung ( $c_A$ ) ergibt sich entsprechend der Verdünnung:  $c_A = 0,05 \cdot c_S$

3.2.4 Bacto Nutrient Broth Dehydrated                      Difco                      Art.-Nr. 0003-17-8

3.2.5 Bacto Agar    Difco                      Art.-Nr. 0140-01

3.2.6 Barium-N-Phenylsulfanilat                                      Riedle-de Haën      Art.-Nr. 33916  
[C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>BaN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>]

3.2.7 Barium-Indikator-Lösung                                      (nach DIN 38408, Teil 4, 6.3.10 <sup>(20)</sup>)

Bestandteile pro 100 ml Lösung:

|                           |         |          |
|---------------------------|---------|----------|
| Barium-N-Phenylsulfanilat | (3.2.6) | 0,3 g    |
| Aqua destillata           |         | 100,0 ml |

In einem Messkolben, Nennvolumen 100 ml, wurde in etwa 30 ml Aqua destillata Barium-N-Phenylsulfanilat in o. g. Menge gelöst, mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.2.8 Bromkresolpurpur Merck Art.-Nr. 1.03025.0025  
[C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S]

3.2.9 Bromkresolpurpur-Lösung (nach DIN 38411, Teil 6, 5.22 <sup>(20)</sup>)

Bestandteile pro 100 ml Lösung:

|                  |         |          |
|------------------|---------|----------|
| Bromkresolpurpur | (3.2.8) | 1,0 g    |
| Aqua destillata  |         | 100,0 ml |

In einem Messkolben, Nennvolumen 100 ml, wurde in etwa 30 ml Aqua destillata Bromkresolpurpur in o. g. Menge gelöst, mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.2.10 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar Oxoid Art.-Nr. CM 131  
(CSA; Caso-Agar)

Typische Zusammensetzung von 40 g des Fertignährbodens für 1000 ml Agar

|                  |        |
|------------------|--------|
| Casein-Pepton    | 15,0 g |
| Sojamehl-Pepton  | 5,0 g  |
| Natriumchlorid   | 5,0 g  |
| Agar             | 15,0 g |
| -----            |        |
| Fertignährmedium | 40,0 g |

Pro 1000 ml Aqua destillata wurden 40 g des Fertignährmediums suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt – ca. 20 Minuten bei 100°C. Anschließend wurde der Agar 15 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 50-60°C in sterile Petri-Schalen gefüllt. Nach dem Erstarren wurden diese umgedreht für 24 h bei 37°C getrocknet. Nebenbei wuchsen so eventuelle mikrobielle Verunreinigungen zu einer sichtbaren Größe heran, so dass entsprechende Schalen aussortiert werden konnten. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4°C für höchstens 4 Wochen.

3.2.11 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung Oxoid Art.-Nr. CM 129  
(CSL; Caso-Bouillon)

Typische Zusammensetzung von 30 g des Fertignährmediums für 1000 ml Bouillon

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Casein-Pepton             | 17,0 g |
| Sojamehl-Pepton           | 3,0 g  |
| Natriumchlorid            | 5,0 g  |
| Dikalium-Hydrogenphosphat | 2,5 g  |
| Glucose                   | 2,5 g  |
| <hr/>                     |        |
| Fertignährmedium          | 30,0 g |

Pro 1000 ml Aqua destillata wurden 30 g des Fertignährmediums suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt – ca. 20 Minuten bei 100°C. Anschließend wurden Reagenzgläser mit jeweils 5 ml Bouillon befüllt und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4°C für höchstens 4 Wochen.

3.2.12 DEV-Lactose-Pepton-Bouillon Merck Art.-Nr. 1.10690.5000  
(DEV-Lactose; Lactose-Bouillon)

Typische Zusammensetzung von 35,02 g des Fertignährmediums für 1000 ml Bouillon

|                  |         |
|------------------|---------|
| Casein-Pepton    | 17,0 g  |
| Sojamehl-Pepton  | 3,00 g  |
| Lactose          | 10,00 g |
| Natriumchlorid   | 5,00 g  |
| Bromkresolpurpur | 0,02 g  |
| <hr/>            |         |
| Fertignährmedium | 35,02 g |

Pro 1000 ml Aqua destillata wurden ca. 35,02 g des Fertignährmediums suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt – ca. 20 Minuten bei 100°C. Anschließend wurden Reagenzgläser mit jeweils 5 ml Bouillon befüllt und 20 Minuten bei 115°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4°C für höchstens vier Wochen.

3.2.13 D(+)-Glucose-Monohydrat Merck Art.-Nr. 1.08342.1000  
[C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> · H<sub>2</sub>O]

3.2.14 Dikalium-Hydrogenphosphat                      Merck                      Art.-Nr. 1.05109.0100  
[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]

3.2.15 Dinatrium-Hydrogenphosphat                      AppliChem                      Art.-Nr. A1046  
[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]

3.2.16 DPD-Reagenz-Lösung                                      (nach DIN 38408, Teil 4, 6.3.6)

Bestandteile pro 1000 ml Lösung:

Schwefelsäure                      (3.2.34)      2,0 ml

Na-EDTA                              (3.2.17)      0,2 g

DPD                                      (3.2.29)      1,1 g

In einem Messkolben, Nennvolumen 1000 ml, wurden etwa 250 ml Aqua destillata mit Schwefelsäure und EDTA in angegebener Menge versetzt, anschließend DPD hinzugefügt, mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.2.17 Ethylen-Dinitrilo-Tetra-Acetat,                      Merck                      Art.-Nr. 1.12029.0100  
Dinatriumsalz [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O]  
(Na-EDTA, Triplex<sup>®</sup>)

3.2.18 Kalium-Dichromat                                      Merck                      Art.-Nr. 1.04864.0500  
[K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>]

3.2.19 Kalium-Dichromat-Lösung                                      (nach DIN 38408, Teil 4, 6.3.11)

Bestandteile pro 500 ml:

Kalium-Dichromat                      (3.2.18)      2,452 g

Aqua destillata                                      500,0 ml

In einem Messkolben, Nennvolumen 500 ml, wurde in etwa 150 ml Aqua destillata Kalium-Dichromat in angegebener Menge gelöst, mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt. Aus diesem Mengenverhältnis ergibt sich eine Kalium-Dichromat-Konzentration  $c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 16,67 \text{ mmol/l}$ . Die Lösung ist in braunen Flaschen haltbar.

3.2.20 Kalium-Dihydrogenphosphat                      Merck                      Art.-Nr. 1.04873.1000  
[KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]

3.2.21 Lactose-Monohydrat                              Merck                      Art.-Nr. 1.07657.5000  
[C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> · H<sub>2</sub>O]

3.2.22 Mac Conkey Agar Nr. 3                              Mast Diagnostics Art.-Nr. DM 143

Typische Zusammensetzung von 44,231 g des Fertignährbodens für 1000 ml Agar

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Pepton              | 14,600 g |
| Lactose             | 10,000 g |
| Natrium-Chlorid     | 5,000 g  |
| Gallensalze (RM 25) | 0,600 g  |
| Neutralrot          | 0,030 g  |
| Kristallviolett     | 0,001 g  |
| Agar (RM 10)        | 14,000 g |
| <hr/>               |          |
| Fertignährmedium    | 44,231 g |

Pro 1000 ml Aqua destillata wurden ca. 44,231 g des Fertignährmediums suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt – ca. 20 Minuten bei 100°C. Anschließend wurde der Agar 15 Minuten bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 50-60°C in sterile Petri-Schalen gefüllt. Nach dem Erstarren wurden diese umgedreht für 24 h bei 37°C getrocknet. Nebenbei wurden so eventuelle Verunreinigungen sichtbar. Die Lagerung erfolgte bei ca. 4°C für höchstens 4 Wochen.

3.2.23 NaCl-Puffer (pH 7,3)

Bestandteile pro 1000 ml NaCl-Puffer:

|                 |          |         |
|-----------------|----------|---------|
| Natrium-Chlorid | (3.2.24) | 8,5 g   |
| Phosphat-Puffer | (3.2.30) | 20,0 ml |

In einem Messkolben, Nennvolumen 1000 ml, wurden in etwa 300 ml Aqua destillata die angegebenen Bestandteile gelöst, anschließend bis zur Marke mit Aqua destillata aufgefüllt und durchmischt.

- |        |  |                |                       |
|--------|--|----------------|-----------------------|
| 3.2.24 | Natrium-Chlorid<br>[NaCl] (Kochsalz)                                   | Riedle-de Haën | Art.-Nr. 33916        |
| 3.2.25 | Natrium-Dihydrogenphosphat<br>[NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]      | AppliChem      | Art.-Nr. A1047        |
| 3.2.26 | Natrium-Hypochlorit-Lösung<br>[NaOCl]                                  | Merck          | Art.-Nr. 1.05614.2500 |
| 3.2.27 | Natrium-Thiosulfat<br>[Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ] | Merck          | Art.-Nr. 1.06512.1000 |

3.2.28 Natrium-Thiosulfat-Lösung 0,75 %

Bestandteile pro 200 ml Lösung:

|                    |          |          |
|--------------------|----------|----------|
| Natrium-Thiosulfat | (3.2.27) | 1,5 g    |
| Aqua destillata    |          | 200,0 ml |

In einem Messkolben, Nennvolumen 200 ml, wurde in etwa 50 ml Aqua destillata die angegebenen Menge an Natrium-Thiosulfat gelöst, anschließend bis zur Marke mit Aqua destillata aufgefüllt und durchmischt. Da die geringe Thermostabilität dieser Lösung eine Sterilisierung im Autoklaven nicht zuließ, wurde die Keimfreiheit durch Filtration erreicht.

- |        |  |       |                       |
|--------|--|-------|-----------------------|
| 3.2.29 | N,N-Diethyl-p-Phenyl-Diamin-Sulfanoat<br>[C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S] (DPD) | Merck | Art.-Nr. 1.03792.0100 |
|--------|--|-------|-----------------------|

3.2.30 Phosphat-Puffer

Bestandteile pro 1000 ml Puffer:

|                            |          |          |
|----------------------------|----------|----------|
| Natrium-Dihydrogenphosphat | (3.2.25) | 28,82 g  |
| Dinatrium-Hydrogenphosphat | (3.2.15) | 125,00 g |

In einem Messkolben, Nennvolumen 1000 ml, wurden in etwa 300 ml Aqua destillata die angegebenen Bestandteile gelöst, anschließend bis zur Marke mit Aqua destillata aufgefüllt und durchmischt.

3.2.31 Phosphor-Säure, 85%,  $\rho = 1,70 \text{ g/ml}$  Merck Art.-Nr. 1.00573.1000  
[H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]

3.2.32 Puffer-Lösung (pH 6,5) (nach DIN 38408, Teil 4, 6.3.5<sup>(20)</sup>)

Bestandteile pro 1000 ml Puffer:

|                            |          |         |
|----------------------------|----------|---------|
| Dinatrium-Hydrogenphosphat | (3.2.15) | 24,00 g |
| Kalium-Dihydrogenphosphat  | (3.2.20) | 46,00 g |
| Na-EDTA                    | (3.2.17) | 0,80 g  |
| Quecksilber-(II)-Chlorid   | (3.2.33) | 0,02 g  |

In einem Messkolben, Nennvolumen 1000 ml, wurden in etwa 300 ml Aqua destillata die angegebenen Bestandteile gelöst, anschließend mit Aqua destillata bis zur Marke aufgefüllt und durchmischt.

3.2.33 Quecksilber(II)-Chlorid Merck Art.-Nr. 1.04419.0050  
[HgCl<sub>2</sub>]

3.2.34 Schwefelsäure, 95-97 %,  $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$  Merck Art.-Nr. 1.00731.1000  
[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]

3.2.35 Stich-Agar (Nutrient Agar)

Bestandteile pro 1000 ml Agar:

|                                 |          |       |
|---------------------------------|----------|-------|
| Bacto Nutrient Broth Dehydrated | (3.2.4)  | 8,0 g |
| Bacto Agar                      | (3.2.5)  | 8,0 g |
| Natrium-Chlorid                 | (3.2.24) | 8,0 g |

Pro 1000 ml Aqua destillata wurden die oben angegebenen Bestandteile suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt – ca. 20 Minuten bei 100°C. Anschließend wurden Reagenzgläser (Volumen 4 ml) mit jeweils 2 ml der auf ca. 50-60°C abgekühlten Lösung befüllt und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgt nach Verschluss mit paraffinierten Korkstopfen bei Raumtemperatur ggf. auch für mehrere Monate.

## 4. Methodik

### 4.1 Allgemeine Vorbereitung

#### 4.1.1 Langzeitlagerung der Bakterienstämme

Sollten Bakterienstämme über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, so geschah dies in sogenanntem Stichagar (3.2.35). Dafür wurde ein kleines mit Nutrient Agar (= NA = Stichagar) befülltes Reagenzglaschen mit einer ausgeglühten Platinnadel stichartig (daher der Name) beimpft. Um die Kulturen vor dem Austrocknen und vor Verunreinigungen z. B. durch Fremdkeime zu schützen, wurde der Korkstopfen vor dem Einsetzen mit verflüssigtem Paraffin getränkt - daraus resultierten ein luftdichter Verschluss und eine Haltbarkeit von Jahren.

#### 4.1.2 Herstellung und Lagerung der Subkulturen

Für die Arbeit mit den Bakterienstämmen wurden diese „vom Stich geholt“, das heißt mit einer ausgeglühten Platinöse von der oben genannten, haltbaren Lagerform, dem Stichagar, entnommen und auf den weniger dauerhaften, aber für den weiteren Versuchsablauf handlicheren CSA-Platten (3.2.10) fraktioniert ausgestrichen. Nach 24 Stunden bei 37°C konnten einzelne Kolonien entnommen und weiterverarbeitet werden.

#### 4.1.3 Herstellung und Lagerung der Stammsuspensionen

Für die Versuche mussten aus den Subkulturen Gebrauchslösungen, sogenannte Stammsuspensionen, hergestellt werden. Dazu wurde mit einer ausgeglühten Platinöse pro Stamm eine Einzelkolonie von den oben genannten CSA-Platten entnommen, auf ein Reagenzglas mit CSL (3.2.11) überimpft und auf dem elektrischen Rüttler durchmischt. Diese Bouillons wurden für ca. 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C gelagert. Anschließend wurden pro Stamm zwei CSA-Platten mit jeweils 0,1 ml der entsprechenden Lösung beimpft, gleichmäßig ausgestrichen und für ca. 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Der in dieser Zeit entstandene Bakterienrasen konnte mit einem Glasspatel und 4,5 ml NaCl-Puffer (3.2.23) (beides steril) pro CSA-Platte abgeschwemmt

werden. Die so gewonnene Stammsuspension wurde in ein Reagenzglas pipettiert und bei ca. 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt. Damit Schäden durch die Lagerung in nährstofffreiem NaCl-Puffer (3.2.23) weitestgehend ausgeschlossen werden konnten, wurde keine Stammsuspension länger als sieben Tage aufbewahrt bzw. verwendet.

#### 4.1.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Im Grunde wurden zur Bestimmung der Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) Suspensionen gleichmäßig auf CSA-Platten (3.2.10) ausgestrichen und nach 24 Stunden bei 37°C die Kolonien gezählt. Bei den Stammsuspensionen lag jedoch die Bakterienkonzentration so hoch, dass es zweckmäßiger war, nicht die zu untersuchende Suspension selbst, sondern eine daraus hergestellte Verdünnungsreihe auszustreichen. Dazu wurden 0,5 ml der betreffenden Suspension in ein Reagenzglas mit 4,5 ml sterilem NaCl-Puffer (3.2.23) pipettiert und durchmischt. In der ersten Verdünnungsstufe verteilten sich so die Bakterien, die in 0,5 ml der Ausgangs-Suspension enthalten waren, auf 5 ml der neuen Suspension. Das ergab eine Verdünnung von 1:10 oder auch  $10^{-1}$ . Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt und bei jedem Schritt die Verdünnung auf das Zehnfache erhöht. Da pro CSA-Platte (3.2.10) „nur“ 0,1 ml einer Suspension ausgestrichen wurden, lag die hier ablesbare Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten bei 1/10 der Bakterienkonzentration der ausgestrichenen Suspension in KbE/ml. Letztere betrug in der Regel bei den Stammsuspensionen etwa  $10^{10}$  KbE/ml, so dass es ausreichte, von den Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  Platten zu beimpfen, die 1/100.000.000 ( $10^{-8}$ ) bzw. 1/1.000.000.000 ( $10^{-9}$ ) der Bakterienkonzentration erkennen und eine Kolonienzahl im zwei- bis dreistelligen Bereich erwarten ließen. Bei anderen Suspensionen lagen z. T. wesentlich geringere Konzentrationen vor, so dass eine entsprechend kürzere Verdünnungsreihe ausreichte.

## 4.2 Vorversuche

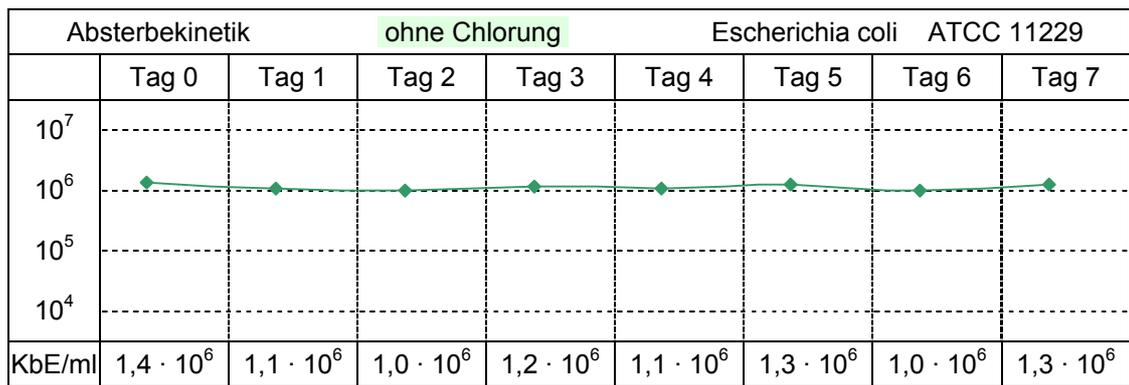
Im Rahmen der Vorversuche sollten reproduzierbare Bedingungen entwickelt werden, unter denen die Untersuchung der Fragestellung dieser Dissertation erfolgen konnte.

### 4.2.1 Bakterienkonzentration in den Vorversuchen

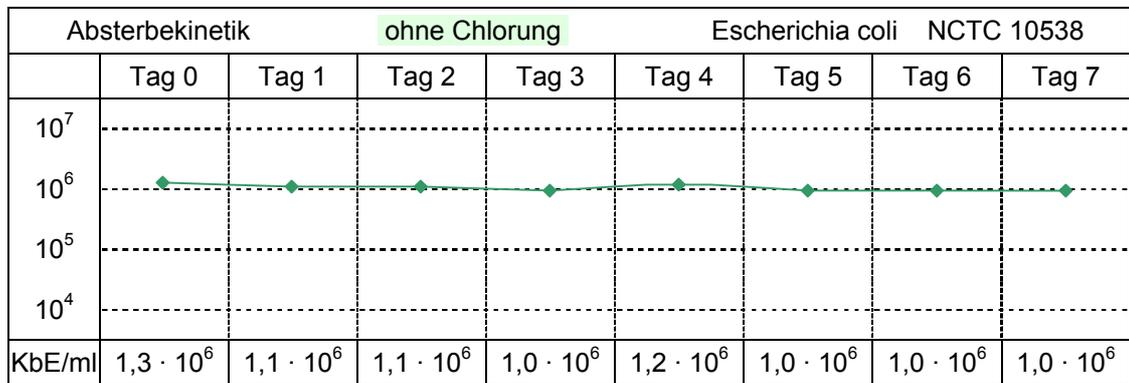
Die in der labortechnischen Anzucht entstandene Keimkonzentration von  $10^{10}$  KbE/ml wird in der Natur meist nicht erreicht. Selbst im menschlichen Körper – wie eingangs erläutert gehört *E. coli* zur Standortflora des Darmes – liegt die Konzentration beispielsweise im Stuhl bei „nur“  $10^5$  bis  $10^9$  KbE/ml <sup>(23) (25) (47)</sup> und in durch Fäkalien verunreinigten Gewässern durch die Verdünnung entsprechend noch niedriger. Da im Laufe eines Versuches trotz Reduktion der Keimzahl durch Chlorung noch vermehrungsfähige Bakterien verbleiben sollten, mit denen die Angherate bestimmt werden konnte, wurde eine Ausgangskonzentration von etwa  $10^6$  KbE/ml gewählt. Nachdem die Konzentration der Stammsuspension bestimmt wurde (s. o.) und das Volumen der „Wasserprobe“ im Versuch bei 500 ml lag, konnte die erforderliche Impfmenge an Stammsuspension durch eine einfache Dreisatzrechnung bestimmt und die Konzentration auf den festgelegten Wert eingestellt werden.

### 4.2.2 Absterbekinetik in der Stammsuspension

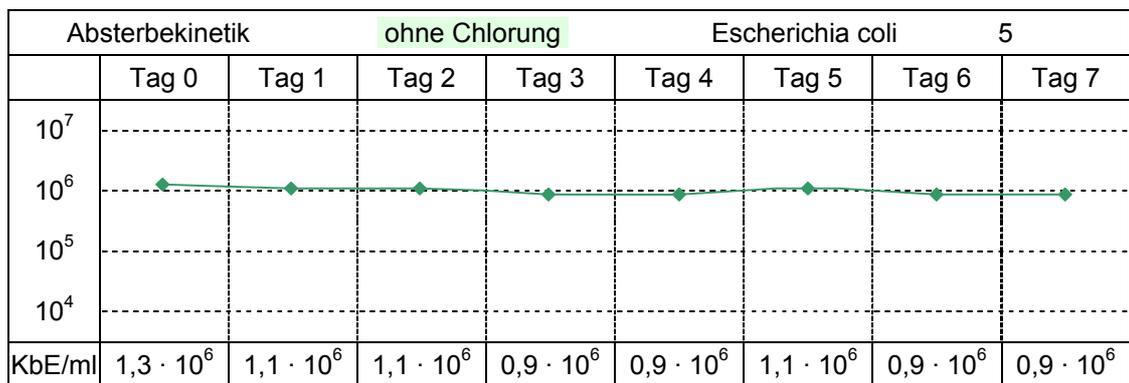
Für alle nachfolgend beschriebenen Vor- und Hauptversuche mussten Tag für Tag verwendbare Bakterien suspensionen mit bekannter Konzentration verfügbar sein. Da deren Bestimmung immer 24 Stunden in Anspruch nimmt, konnte jeweils nur der Wert des Vortages im nachhinein ermittelt werden. Um den am Versuchstag aktuellen Wert „vorhersagen“ zu können, wurde von jedem Bakterienstamm eine Suspension entsprechend denen der Versuchsreihen mit  $10^6$  KbE/ml angesetzt und die Konzentration eine Woche lang täglich wie oben beschrieben bestimmt. Nach spätestens sieben Tagen wurde eine jede Suspension verworfen und neu angesetzt, so dass die Beobachtung der Absterbekinetik über diesen begrenzten Zeitraum ausreichend war. Wie den Tabellen und Diagrammen (Tab. 1.1 – 1.10) zu entnehmen ist, war in dieser Zeit bei Lagerung bei ca. 4°C keine wesentliche Änderung der Bakterienkonzentration zu beobachten.



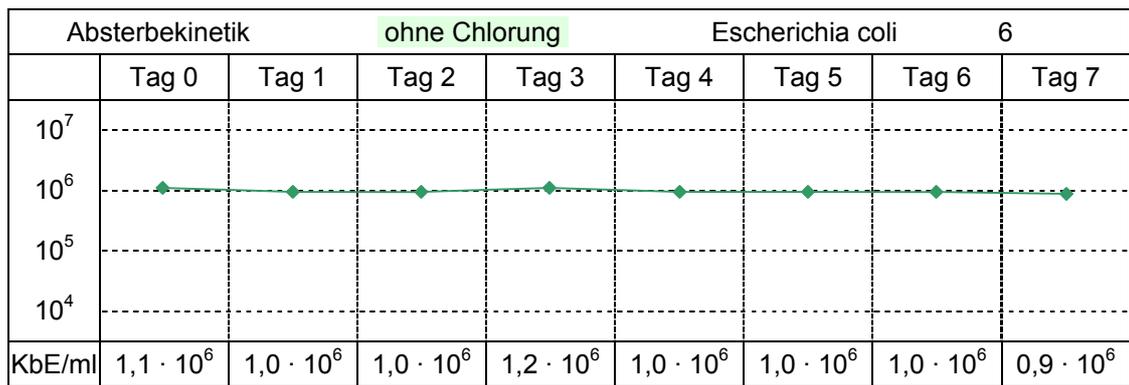
Tab. 1.1



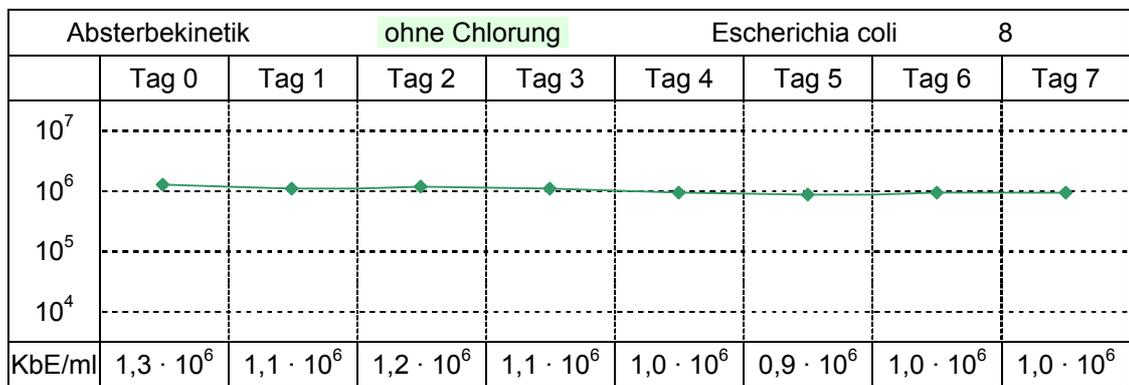
Tab. 1.2



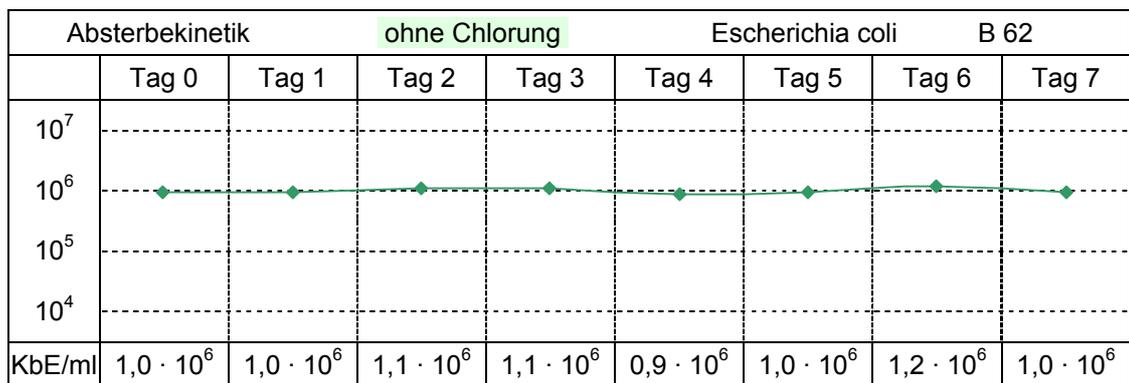
Tab. 1.3



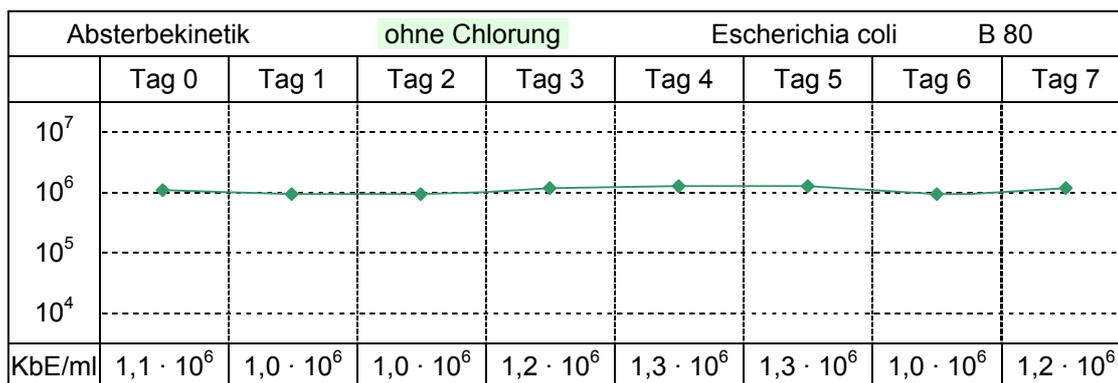
Tab. 1.4



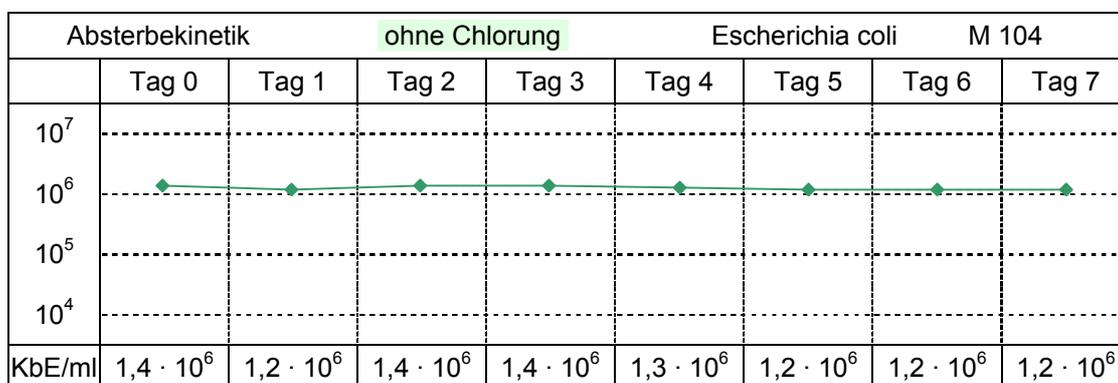
Tab. 1.5



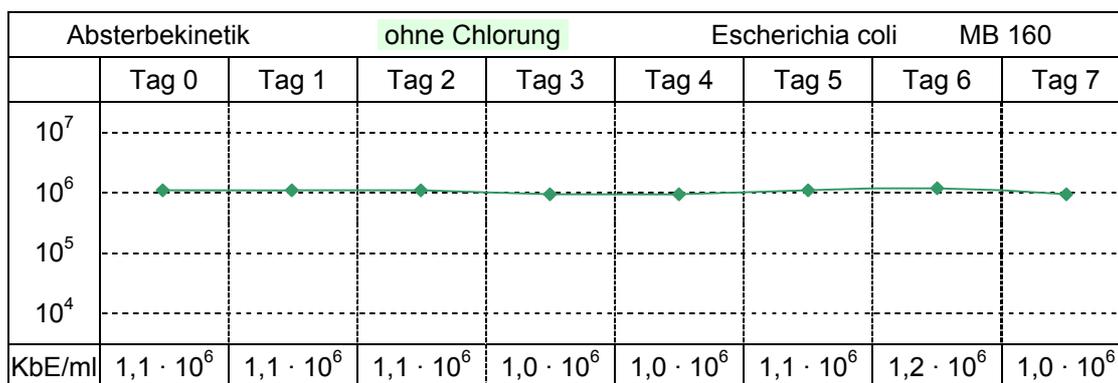
Tab. 1.6



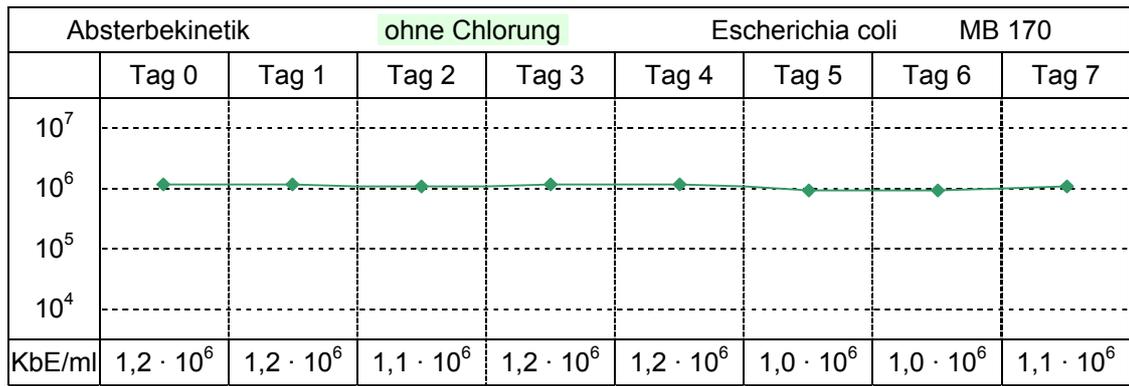
Tab. 1.7



Tab. 1.8



Tab. 1.9



Tab. 1.10

#### 4.2.3 Bestimmung der Chlorkonzentration in der Natrium-Hypochlorit-Lösung

Um die Chlorkonzentration im Versuchsaufbau exakt reproduzierbar einstellen zu können, musste die Konzentration der Natrium-Hypochlorit-Lösung (3.2.26) täglich entsprechend DIN 38408 Teil 4 (DEV) neu bestimmt werden. Nach der DIN-Vorschrift werden weitere Störfaktoren (Mangandioxid u. ä.) und Untersuchungsumstände (pH<6,2 o. pH>6,5 u. ä.) berücksichtigt, die jedoch unter den Versuchsbedingungen im Labor ausgeschlossen werden konnten. Deshalb wird hier auf entsprechende Teile bzw. Teilschritte des Verfahrens verzichtet.

Freies Chlor reagiert bei einem pH-Wert von  $\pm 6,5$  mit N,N-Diethyl-p-phenylendiamin (3.2.29) zu einem roten Farbstoff, der durch Titration mit Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standard-Lösung (3.2.3) entfärbt wird. Aus dem Verbrauch an Titrier-Lösung wurde die Konzentration der Wasserprobe an freiem Chlor bestimmt.

Dazu wurden unter Kühlung in einen Erlenmeyer-Kolben, Nennvolumen 250 ml, schnell in der angegebenen Reihenfolge gegeben:

|                                 |          |          |
|---------------------------------|----------|----------|
| Puffer-Lösung                   | (3.2.32) | 5,0 ml   |
| DPD-Reagenzlösung               | (3.2.16) | 5,0 ml   |
| NaCl-Puffer                     | (3.2.23) | 100,0 ml |
| Natrium-Hypochlorit-Stammlösung | (3.2.26) | 1,0 ml   |

Anschließend wurde die Lösung sofort unter Rühren mit dem Magnetrührer mit der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standardlösung (3.2.3) bis zu ihrer Entfärbung titriert und das verbrauchte Volumen als  $V_A$  notiert.

Die Massenkonzentration der Wasserprobe an freiem Chlor wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\beta_C = \frac{V_A \cdot c_A \cdot f}{V_P}$$

Hier bedeuten:

- $\beta_C$  Massenkonzentration der Wasserprobe an freiem Chlor ( $\text{Cl}_2$ ) in mg/l
- $c_A$  Stoffmengenkonzentration der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standard-Lösung (3.2.3) in mmol/l
- $V_A$  Vol. der Ammonium-Eisen(II)-Sulfat-Standard-Lösung (3.2.3), das bei der Titration verbraucht wurde, in ml
- f Äquivalenzfaktor = 35,45 mg/mmol
- $V_P$  Volumen der Wasserprobe = 100 ml

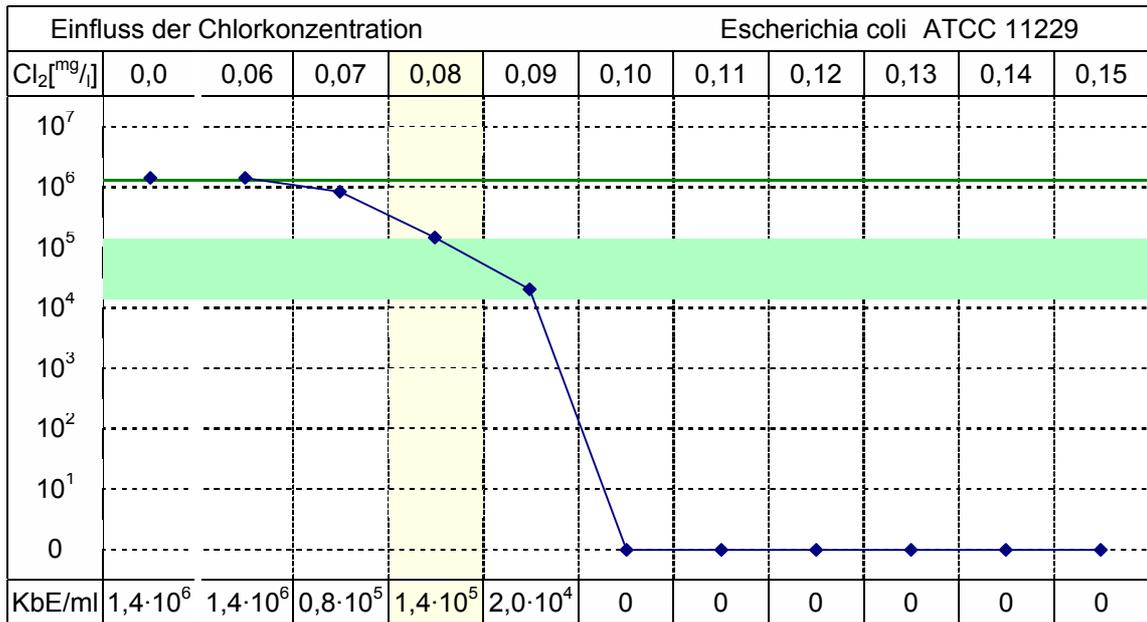
Aus dem Ergebnis dieser Untersuchung konnte durch eine einfache Dreisatzrechnung die für eine bestimmte Chlorkonzentration im Versuchsvolumen (500 ml) erforderliche Menge an Natrium-Hypochlorit-Lösung bestimmt werden.

#### 4.2.4 Chlorung

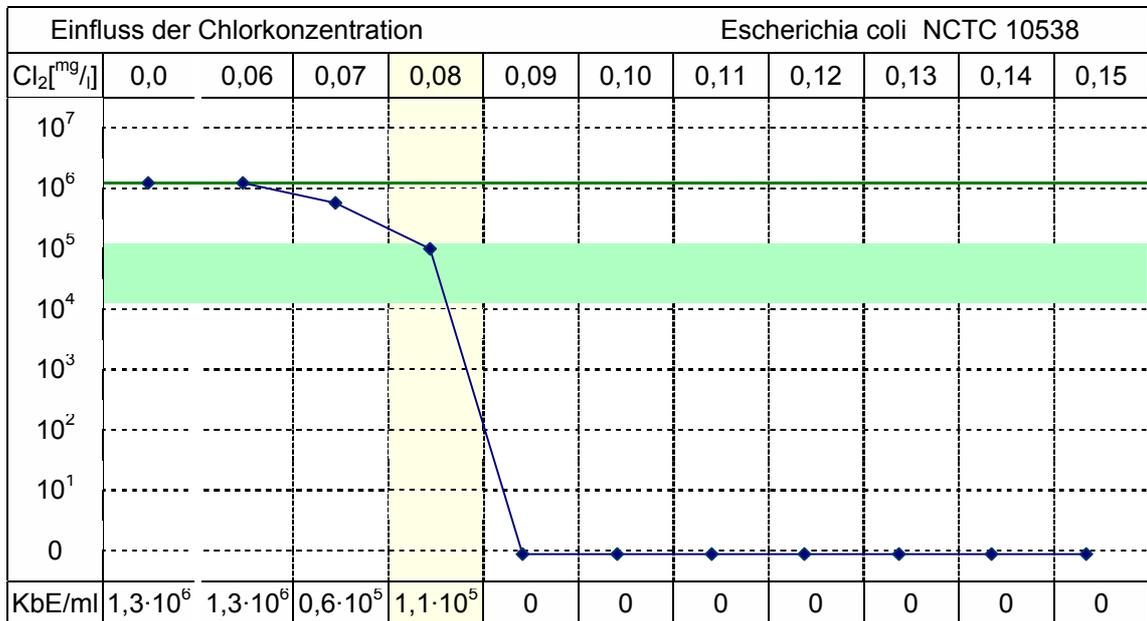
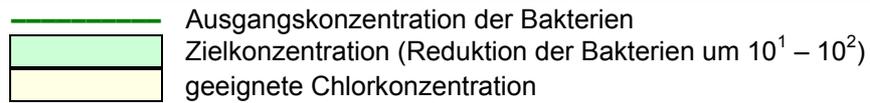
Im Gegensatz zur Desinfektion von Trinkwasser sollten in den Versuchen reichlich vermehrungsfähige Keime überleben. Bei den überlebenden Keimen sollte allerdings von einer Chlorungsschädigung ausgegangen werden können. Um diesen Bedingungen zu genügen, wurde eine chlorungsbedingte Reduktion der Keimzahl um ein bis zwei Zehnerpotenzen angestrebt. Die Reduktion ist nur von den Faktoren Einwirkdauer und Konzentration des desinfizierenden Agens abhängig. Die Dauer wurde willkürlich auf eine Minute festgelegt, so dass als einzige Variable die passende Chlorkonzentration bestimmt werden musste.

Für den Versuchsteil „Chlorung“ wurden pro Stamm jeweils 500 ml Bakteriensuspension mit der zuvor festgelegten Versuchskonzentration von etwa  $10^6$  KbE/ml hergestellt und jeweils zwei Erlenmeyerkolben (Volumen: 100 ml) mit 0,4 ml Natrium-Thiosulfat-Lösung (3.2.28) pro Gefäß vorbereitet. Letztere beendet die Desinfektion zum Zeitpunkt der Zugabe der chlorhaltigen Bakteriensuspension durch Reduktion des verbliebenen freien Chlors („Antichlor-Reaktion“). Pro Stamm wurden zunächst 20 ml der ungechlorten Suspension in den einen Erlenmeyerkolben – dies stellte die Kontrolle dar – und anschließend wiederum 20 ml der gechlorten Suspension nach einer Einwirkzeit des desinfizierenden Agens von 60 Sekunden in den anderen Erlenmeyerkolben gegeben. Aus beiden Proben wurde analog zu 4.1.4 die Keimkonzentration bestimmt. Durch die bis auf die Chlorung identischen Bedingungen für beide Proben eines Stammes konnte gewährleistet werden, dass ein Unterschied in der Quantität bzw. Qualität der Bakterien ausschließlich von der Wirkung des Desinfektionsmittels herrühren konnte. Bei einer bereits in der Kontrolle verminderten Keimdichte hätte man von einer schädigenden Wirkung allein schon durch die anderen Chemikalien ausgehen müssen. Dies war nicht der Fall.

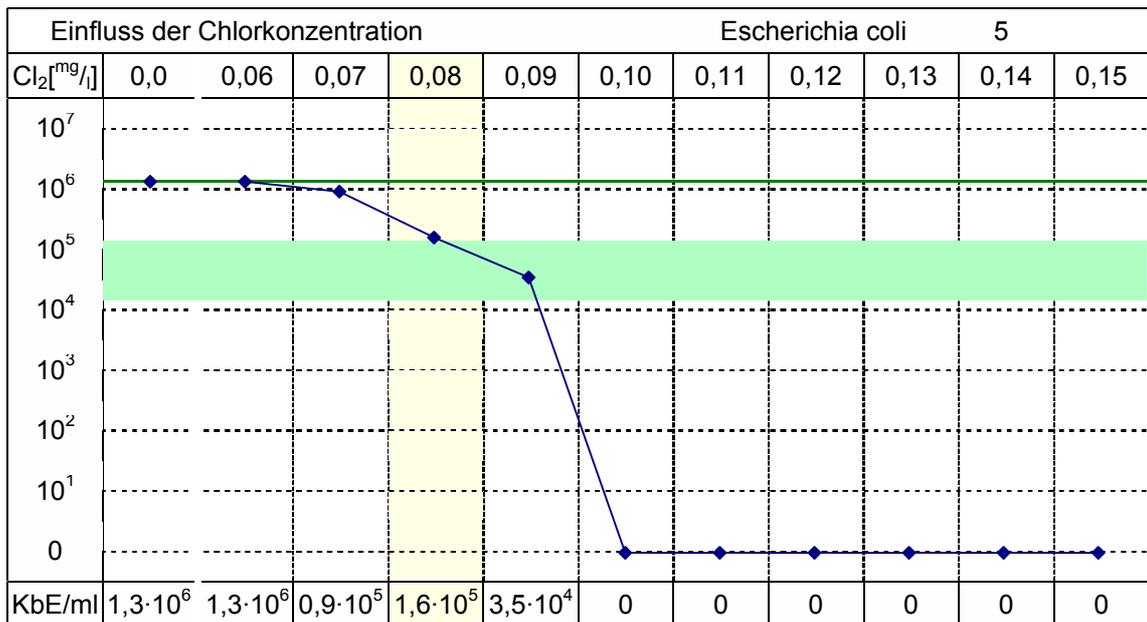
Da die verschiedenen Bakterienstämme unterschiedlich auf das Chlor reagierten, musste die jeweilige Chlor-Konzentration, bei der sich die gewünschte Reduktion der Keimdichte einstellte, einzeln bestimmt werden. Die entsprechenden Werte finden sich in den Tabellen und Diagrammen (Tab. 2.1 – 2.10).



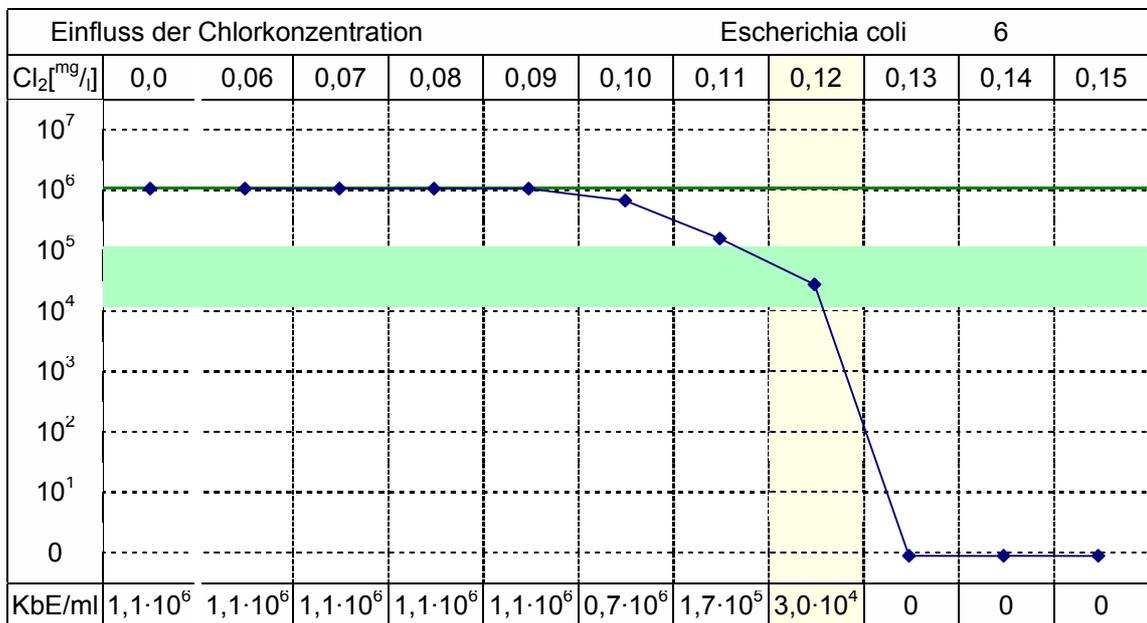
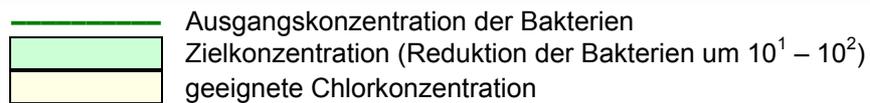
Tab. 2.1



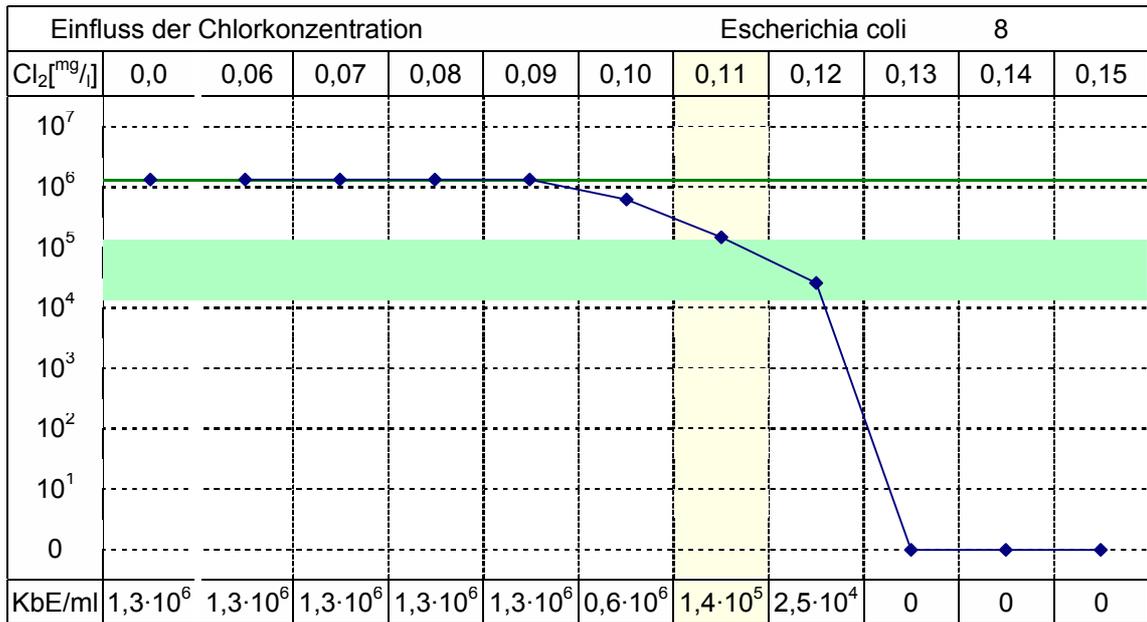
Tab. 2.2



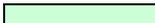
Tab. 2.3

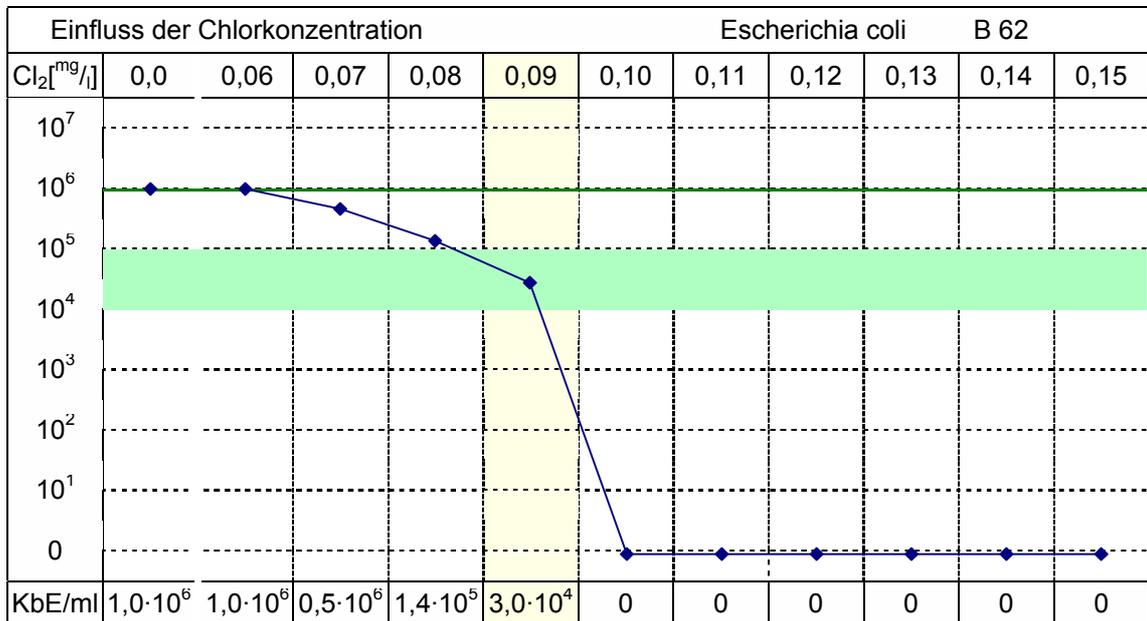


Tab. 2.4

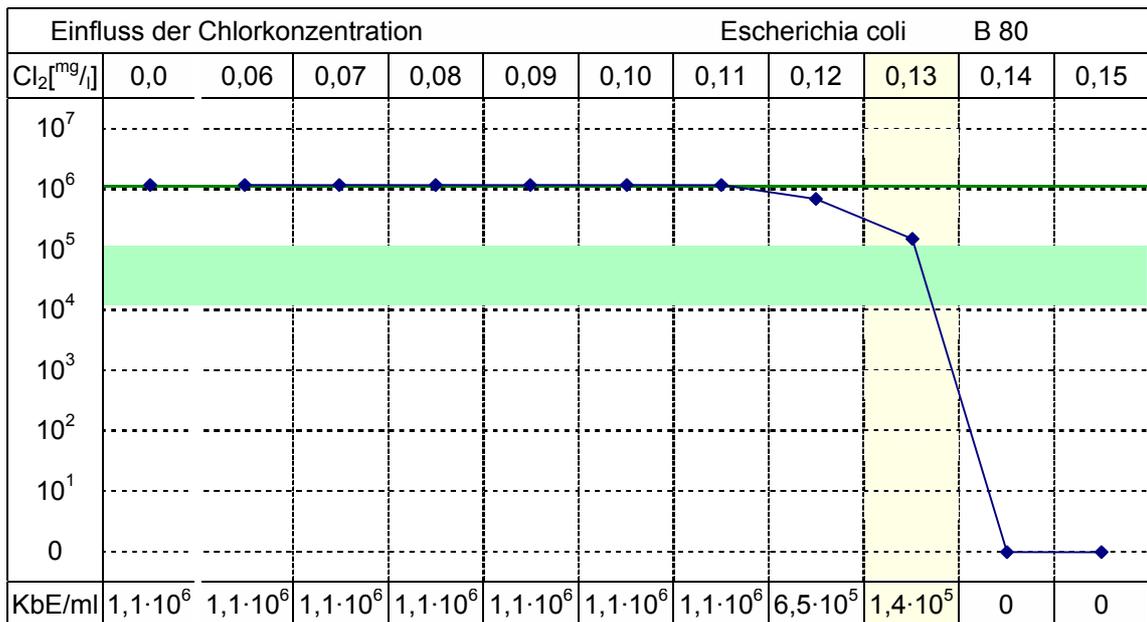


Tab. 2.5

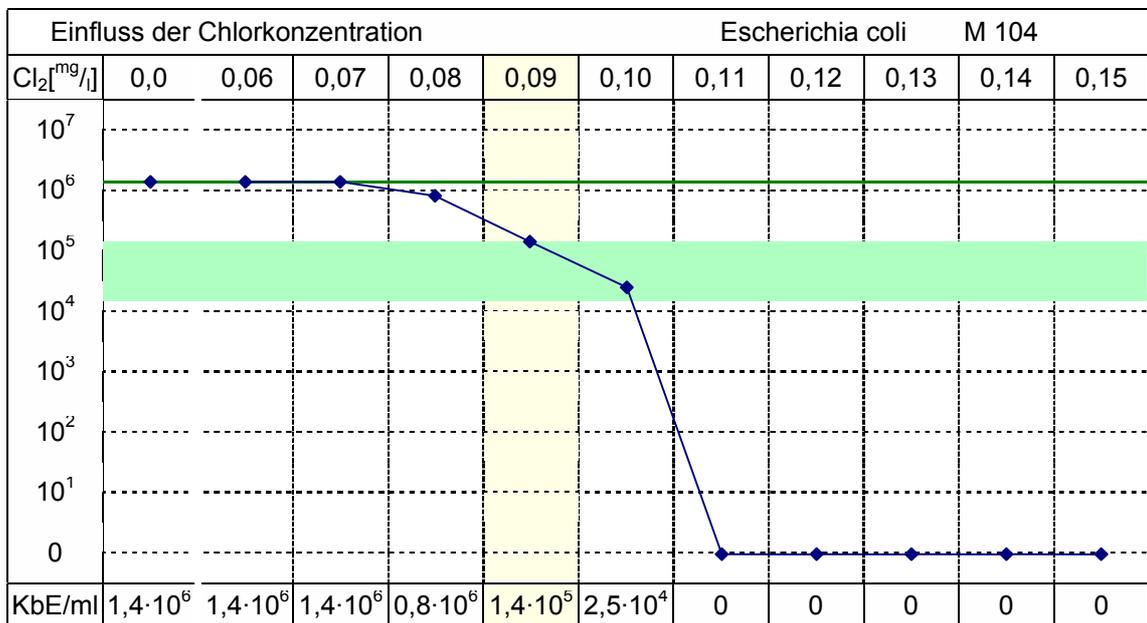
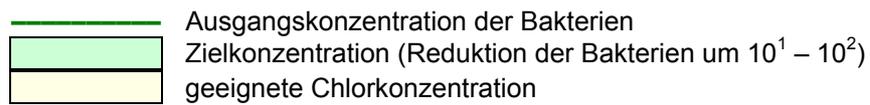
 Ausgangskonzentration der Bakterien  
 Zielkonzentration (Reduktion der Bakterien um 10<sup>1</sup> – 10<sup>2</sup>)  
 geeignete Chlorkonzentration



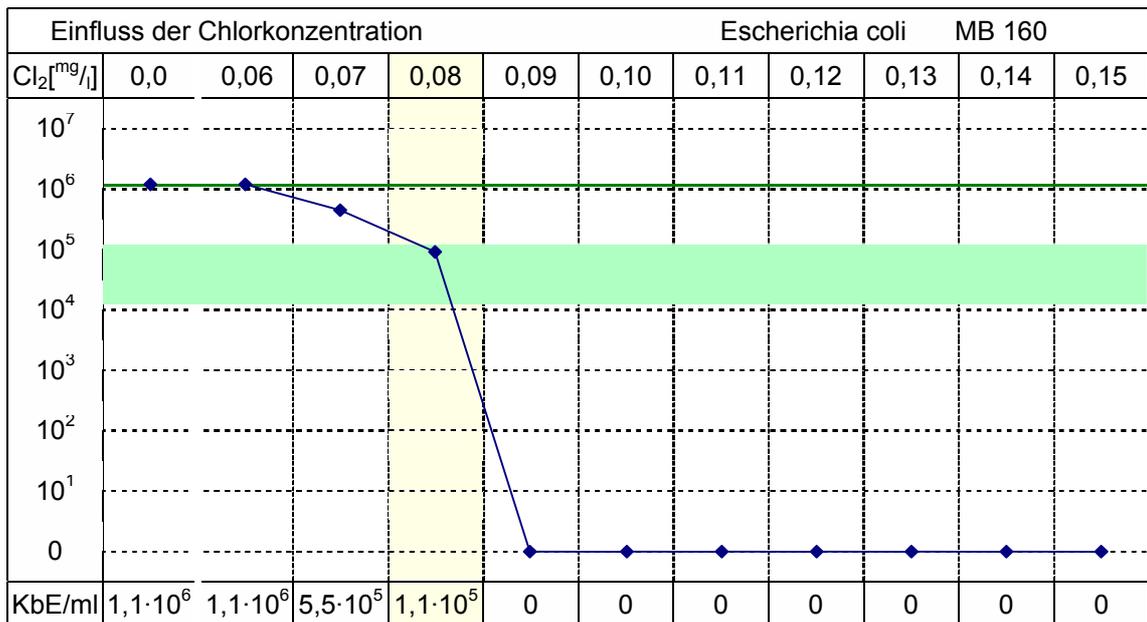
Tab. 2.6



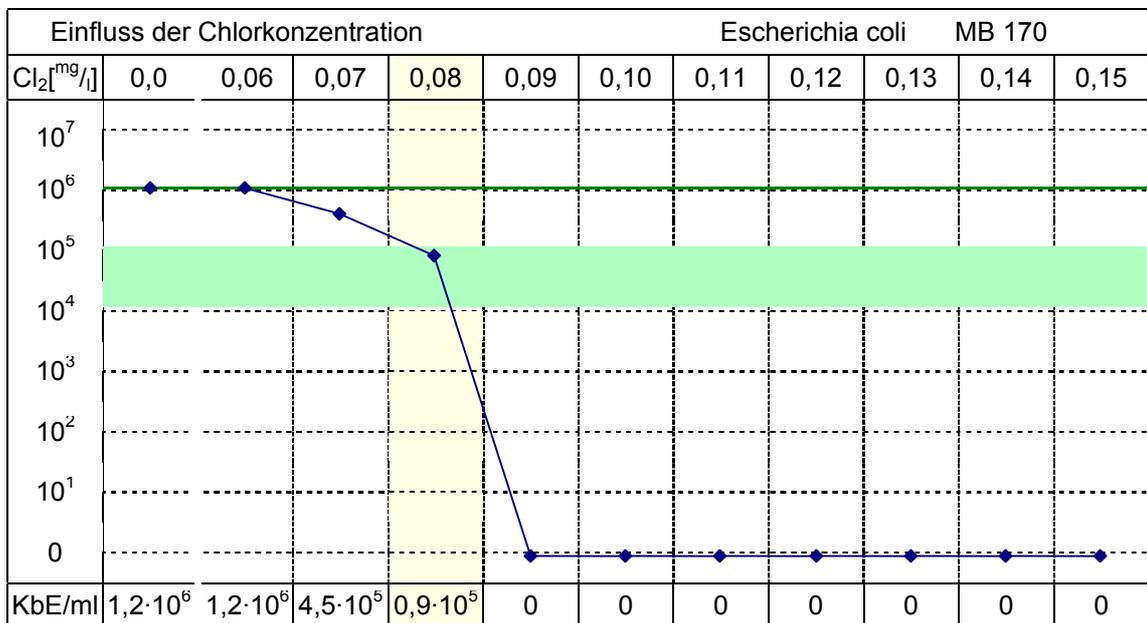
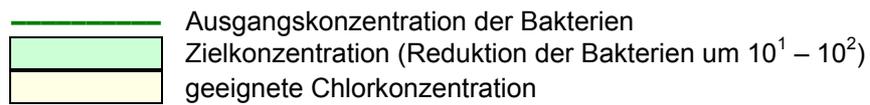
Tab. 2.7



Tab. 2.8



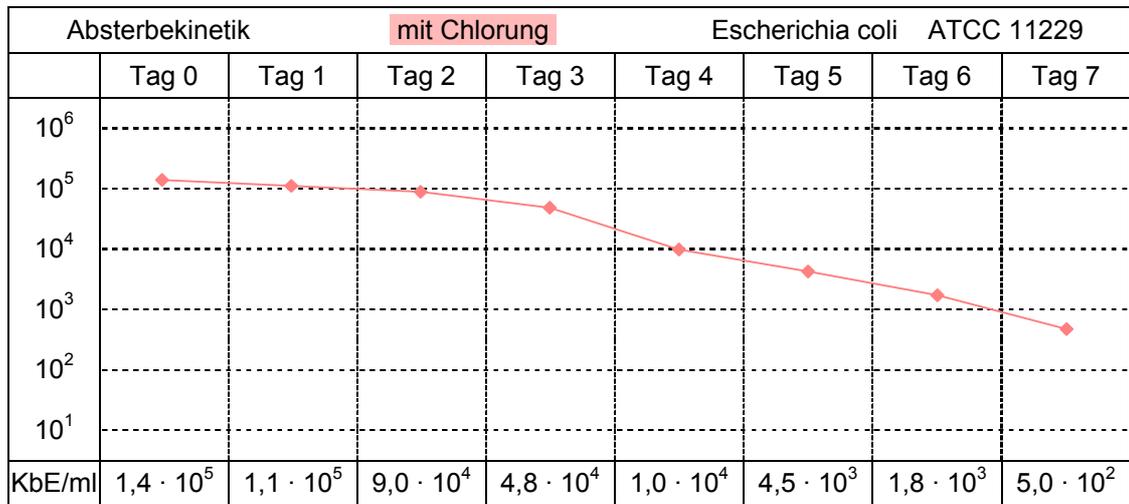
Tab. 2.9



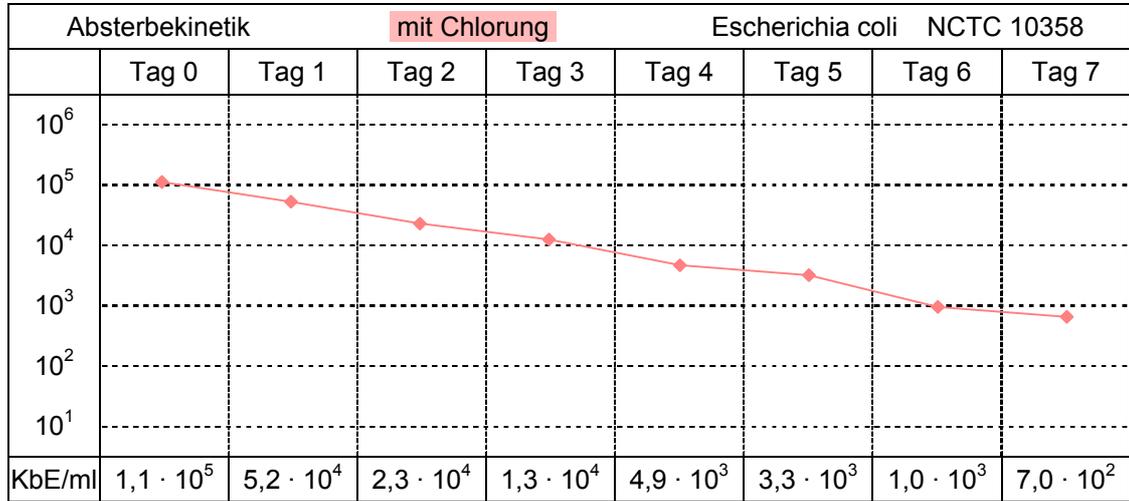
Tab. 2.10

#### 4.2.5 Absterbekinetik in der chlorungsgeschädigten Suspension

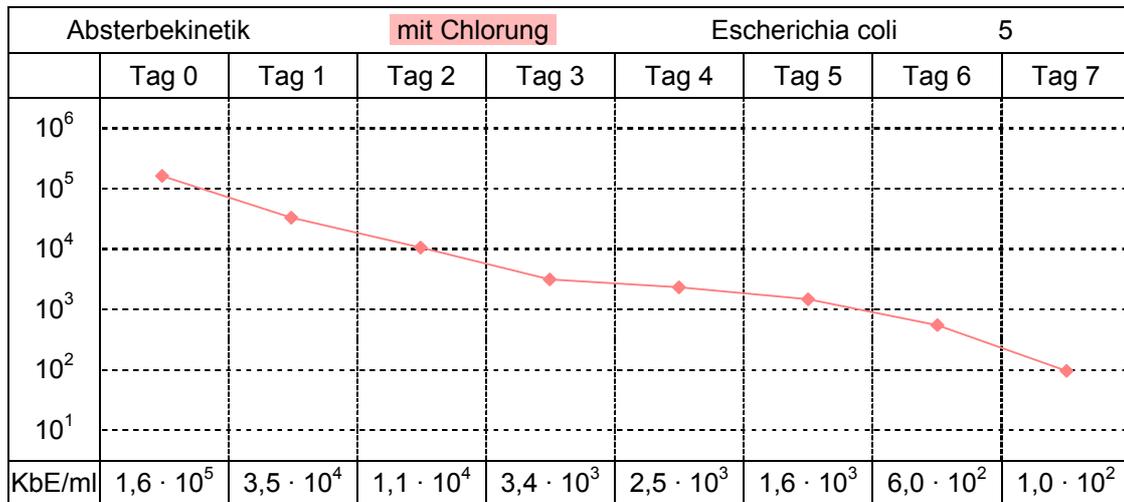
Wie bei den Stammsuspensionen als Ausgangsmaterial für die Vorversuche musste auch bei den Suspensionen der chlorungsgeschädigten Bakterien als Ausgangsmaterial für die Hauptversuche die jeweils aktuelle Bakterienkonzentration bestimmt bzw. durch die Untersuchung der Absterbekinetik vorhersagbar gemacht werden. Nach spätestens sieben Tage wurden auch diese Suspensionen verworfen und neu angesetzt, so dass hier ebenfalls ein begrenzter Beobachtungszeitraum ausreichend war. Die Veränderung der Bakterienkonzentration nach der Chlorschädigung und bei Lagerung bei 4°C ist in den Tabellen und Diagrammen (Tab. 3.1 – 3.10) protokolliert.



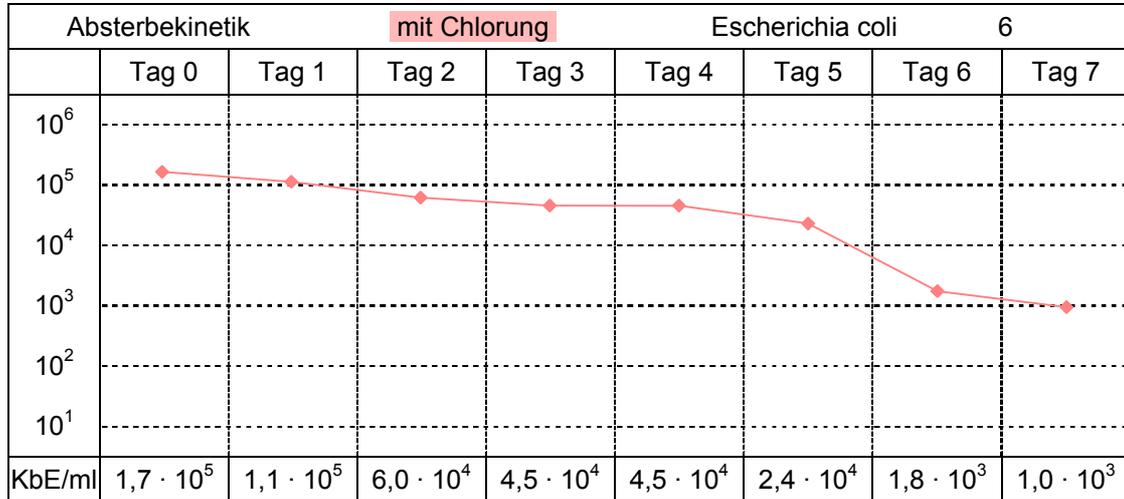
Tab. 3.1



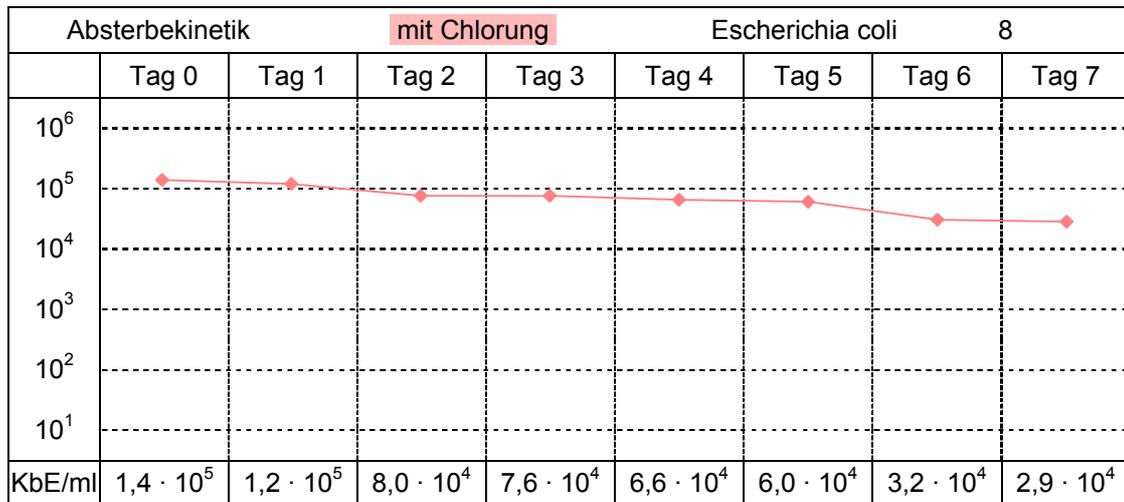
Tab. 3.2



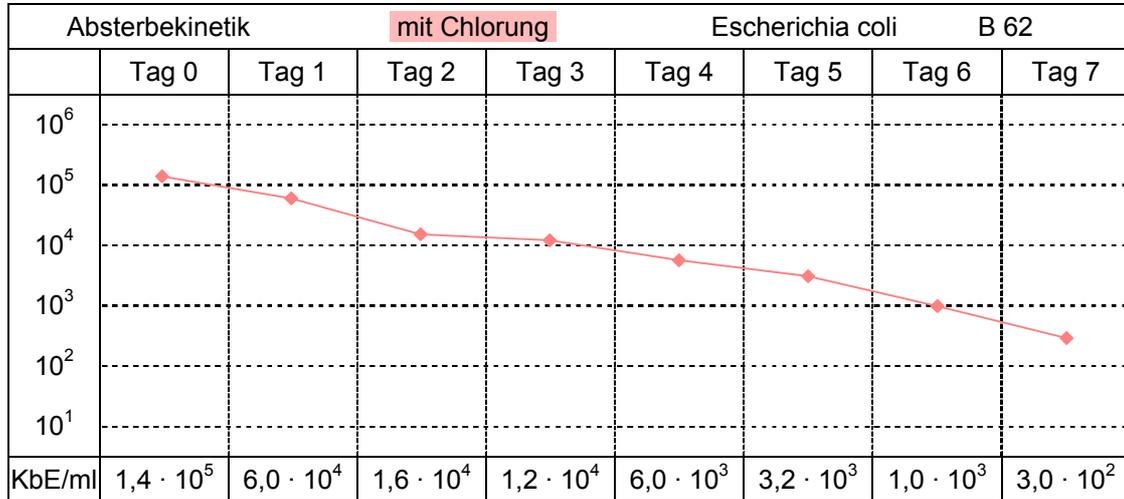
Tab. 3.3



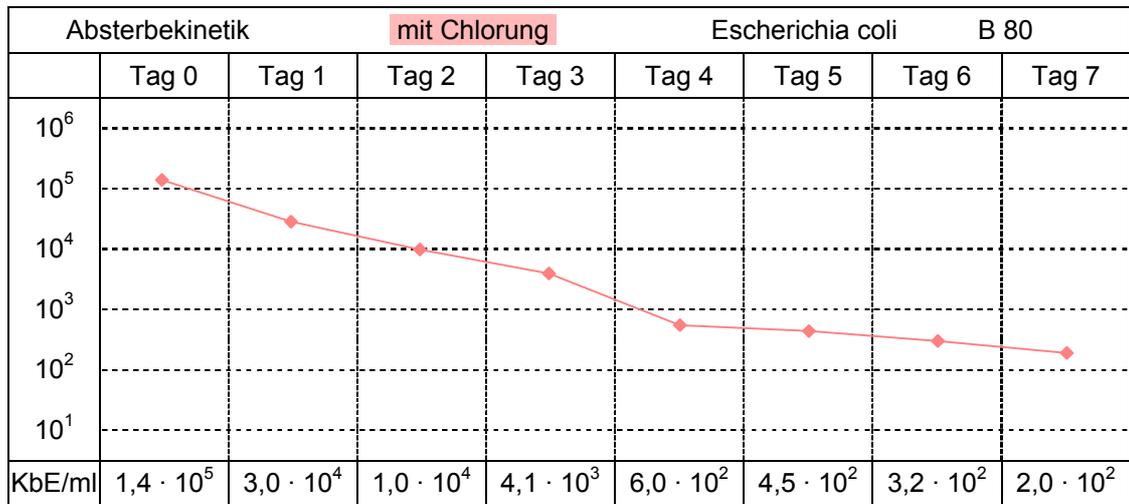
Tab. 3.4



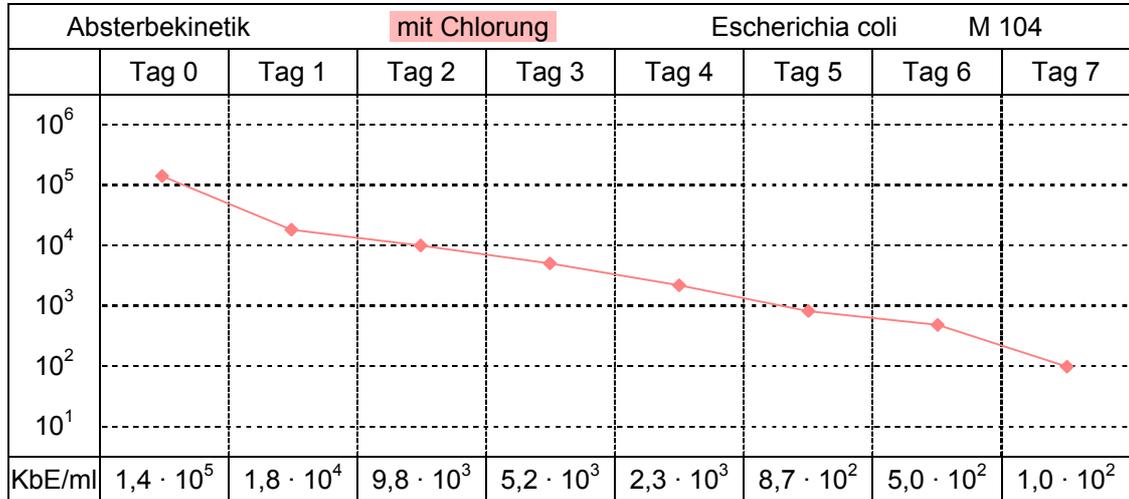
Tab. 3.5



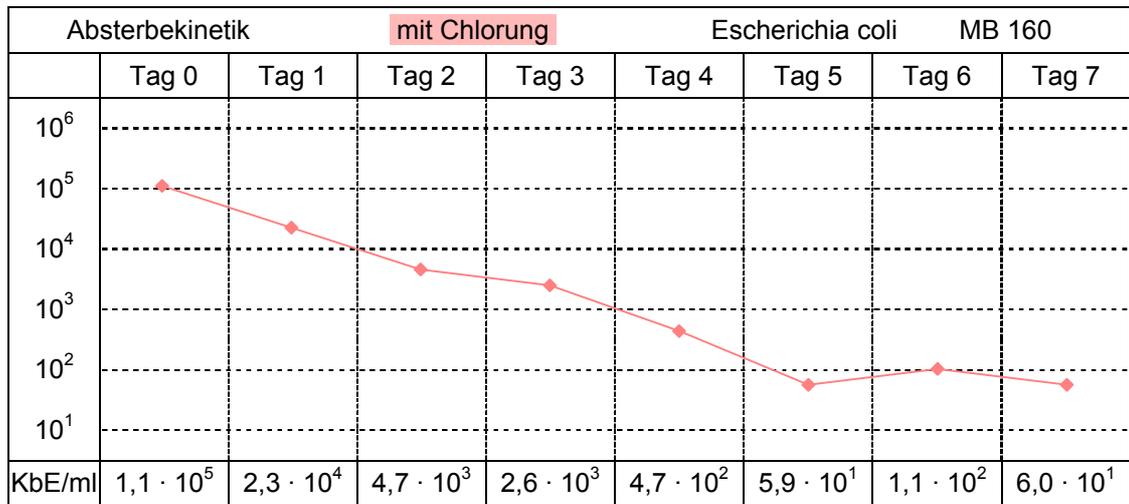
Tab. 3.6



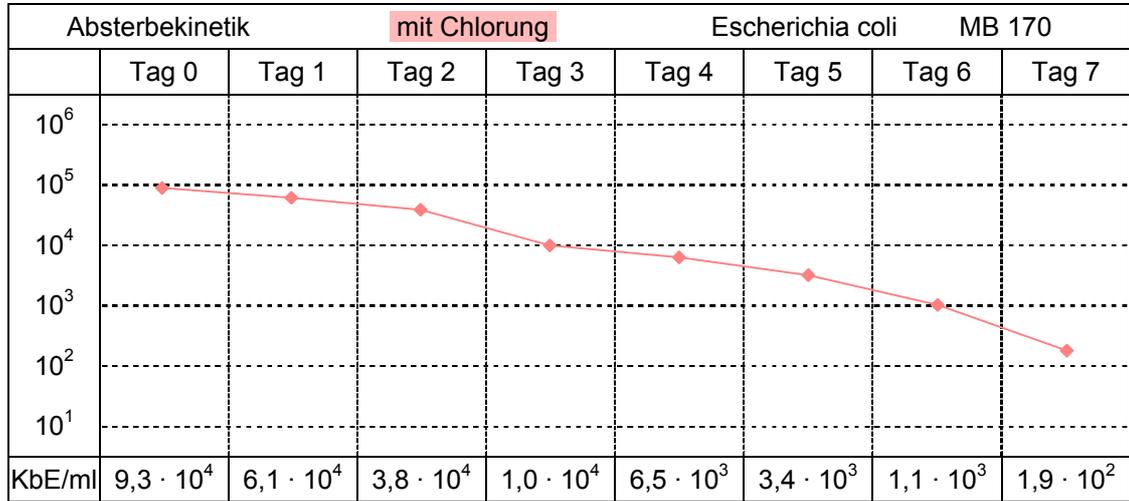
Tab. 3.7



Tab. 3.8



Tab. 3.9



Tab. 3.10

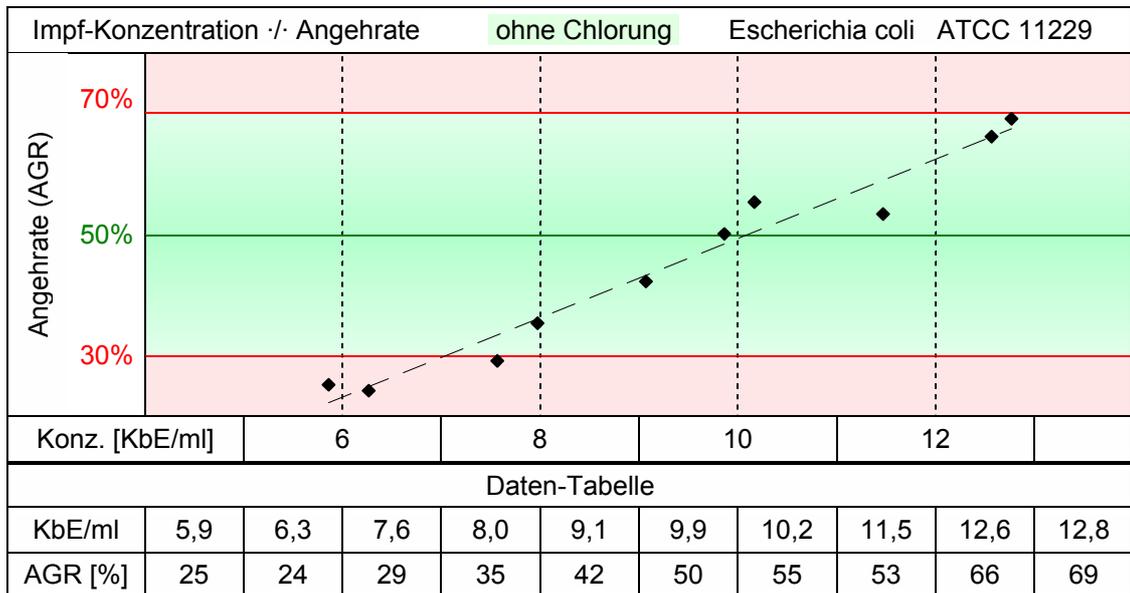
#### 4.2.6 Bakterienkonzentration in den Hauptversuchen

In den Hauptversuchen sollten flüssige Nährmedien durch Beimpfen von jeweils 100 Reagenzgläsern (enth. je 5 ml Nährlösung) pro Stamm und Medium verglichen werden. Dabei sollte die zum Beimpfen verwendete Bakterienkonzentration gerade so hoch sein, dass im Vergleichsnährmedium, CSL (3.2.10), als Referenzwert eine Angehrate von 50% ( $\pm 20\%$ ) erreicht wurde. Bei 100 Reagenzgläsern mit jeweils 0,1 ml Impfsuspension würden theoretisch 10 ml und für eine Angehrate von 50 % insgesamt 50 KbE (entsprechend 5 KbE/ml) reichen. Nach dem Prinzip der Zufallsverteilung (Poisson-Verteilung), die für dünne Bakteriensuspensionen gilt, kann in einem Reagenzglas auch mehr als ein Keim landen, was zwar an der Trübung nichts ändert, aber die Anzahl der bewachsenen Gläschen senkt, denn für jedes Bakterium, das nicht alleine in einem Reagenzglas landet, bleibt ein anderes Glas keimfrei. Schubert und Deutsch <sup>(35)</sup> beschrieben die Abhängigkeit der wahrscheinlichen Gesamtzahl Z der vermehrungsfähigen Einheiten im verimpften Volumen von der Anzahl der N beimpften und der K bewachsenen Gläser sowie wie folgt:

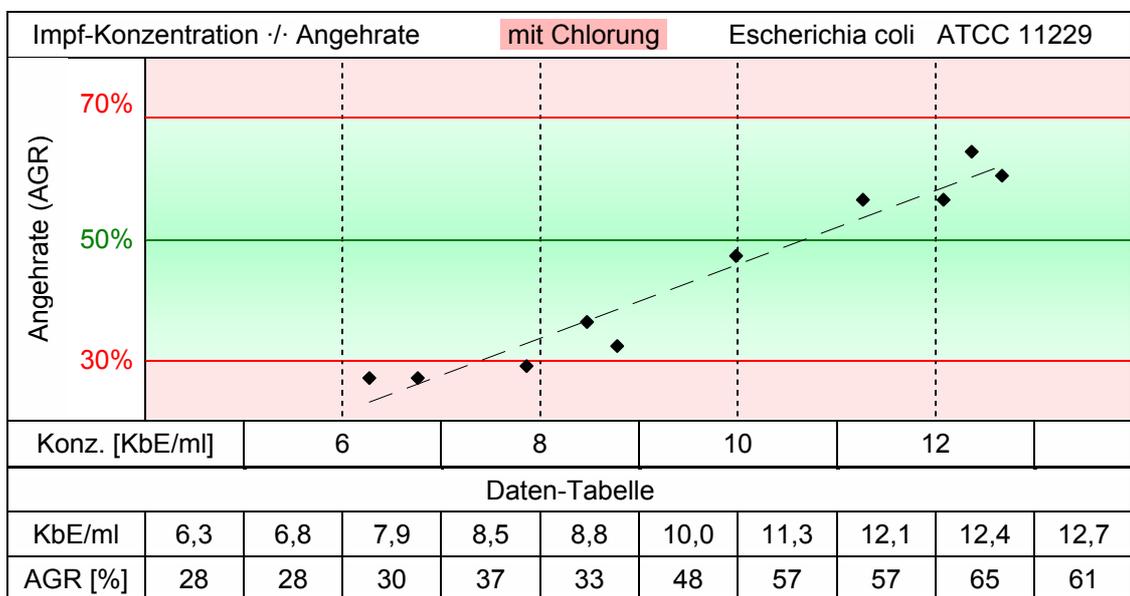
$$Z = -N \cdot \ln \frac{N-K}{N}$$

Beim Verimpfen der oben erwähnten 50 KbE wäre demnach am wahrscheinlichsten eine Angehrate von „nur“ 39 % zu erwarten, die angestrebten 50 % würden sich rein rechnerisch am ehesten aus 69 KbE ergeben. In Versuchen wird jedoch von 100 verimpften KbE berichtet, die zu einer 50 %-igen Angehrate führten <sup>(40)</sup>. Für die Versuche wurden also jeweils 100 ml der Bakteriensuspension angesetzt und diejenige, nach der unter 4.1.4 beschriebenen Methode ermittelte Konzentration bestimmt, bei der die Angehrate im gewünschten Bereich lag. Die Ergebnisse sind in den Tabellen und Diagrammen (4.1 – 4.10) dokumentiert.

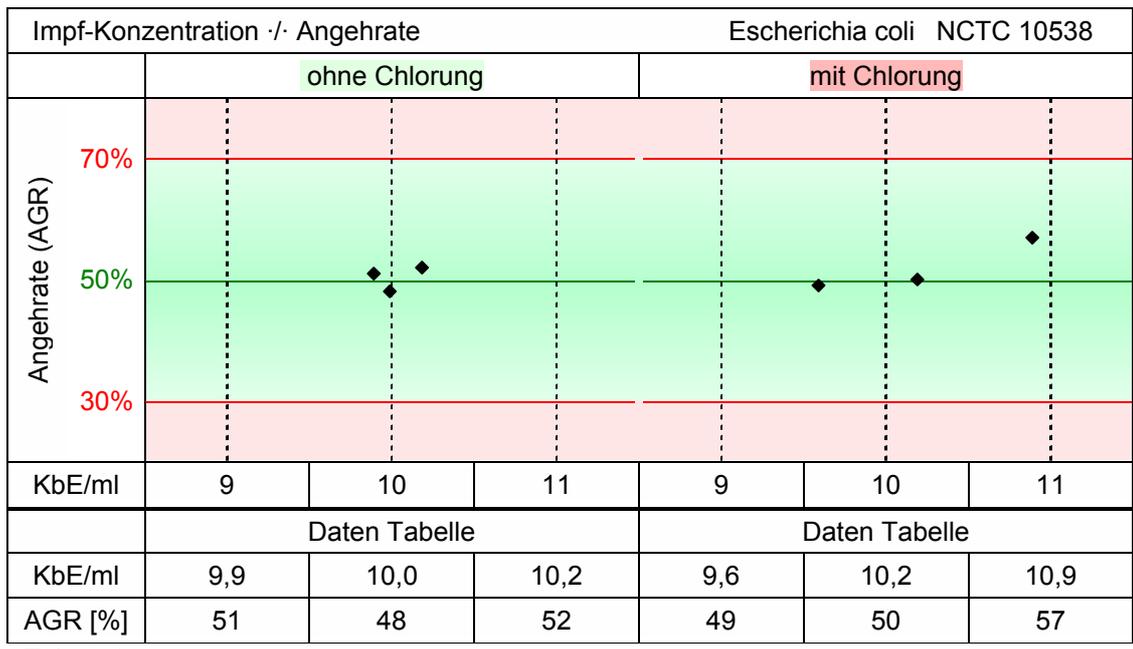
Um einer Verfälschung des Versuchsergebnisses z. B. durch Sedimentation oder Aggregation der Einzeller <sup>(5)</sup> vorzubeugen, wurde die Suspension nach jeweils 10 beimpften Reagenzgläsern durchmischt. Damit auch durch ein eventuelles Absterben der Keime während des Impfvorganges nicht in die zuerst verarbeitete Lösung mehr vermehrungsfähige Bakterien gelangten, als in die andere, wurden jeweils 10 Reagenzgläser der Referenz- (CSL-) und der Versuchslösung im Wechsel beimpft.



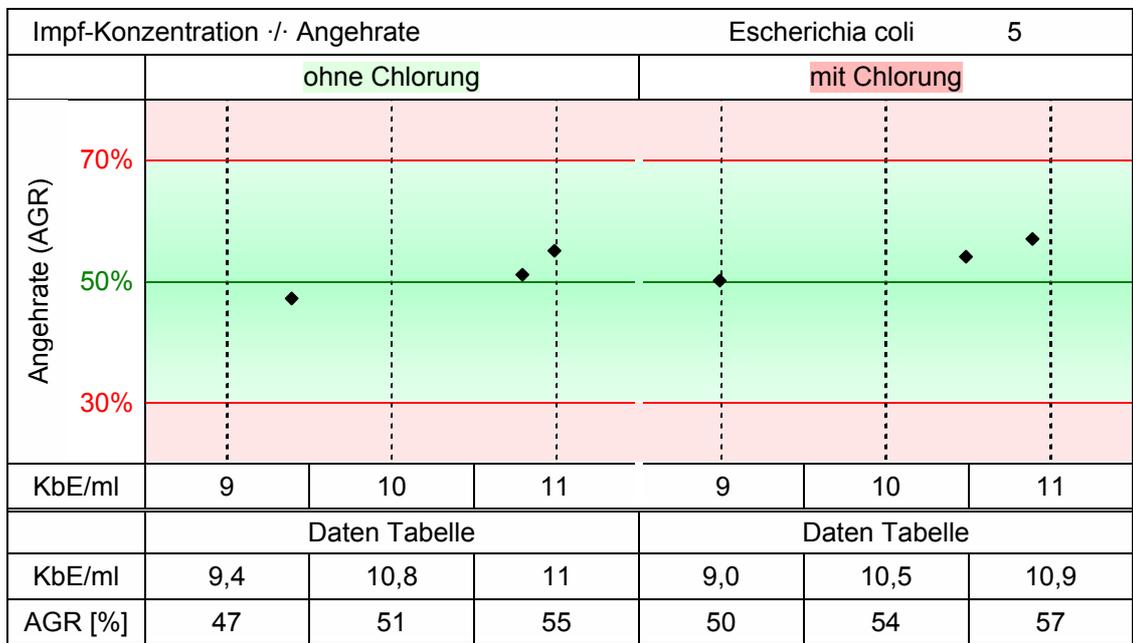
Tab. 4.1.a



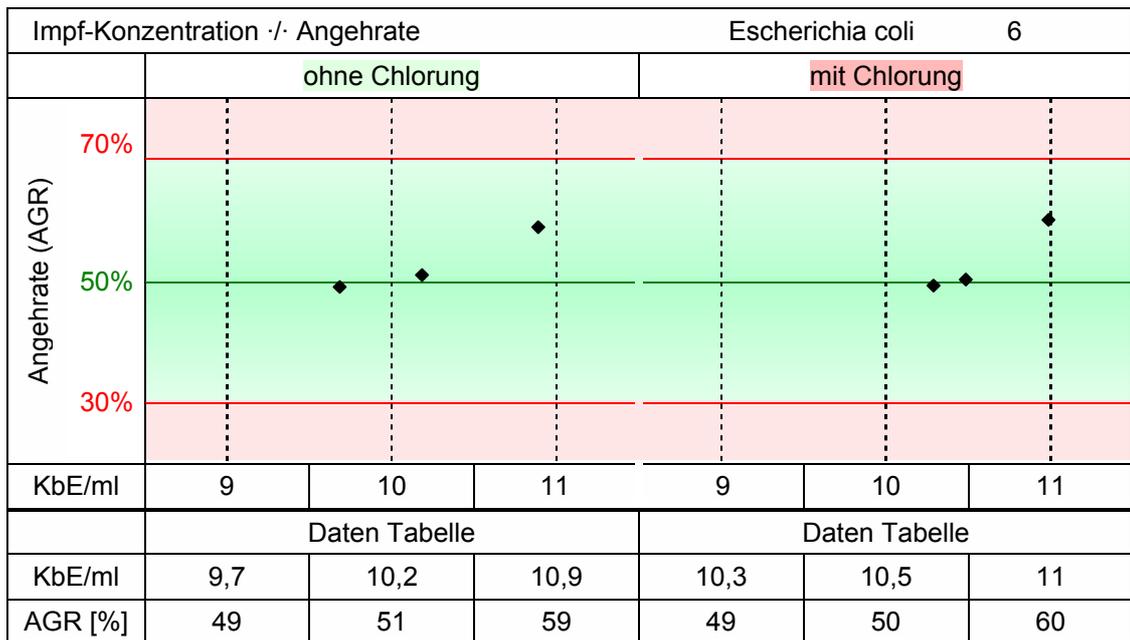
Tab. 4.1.b



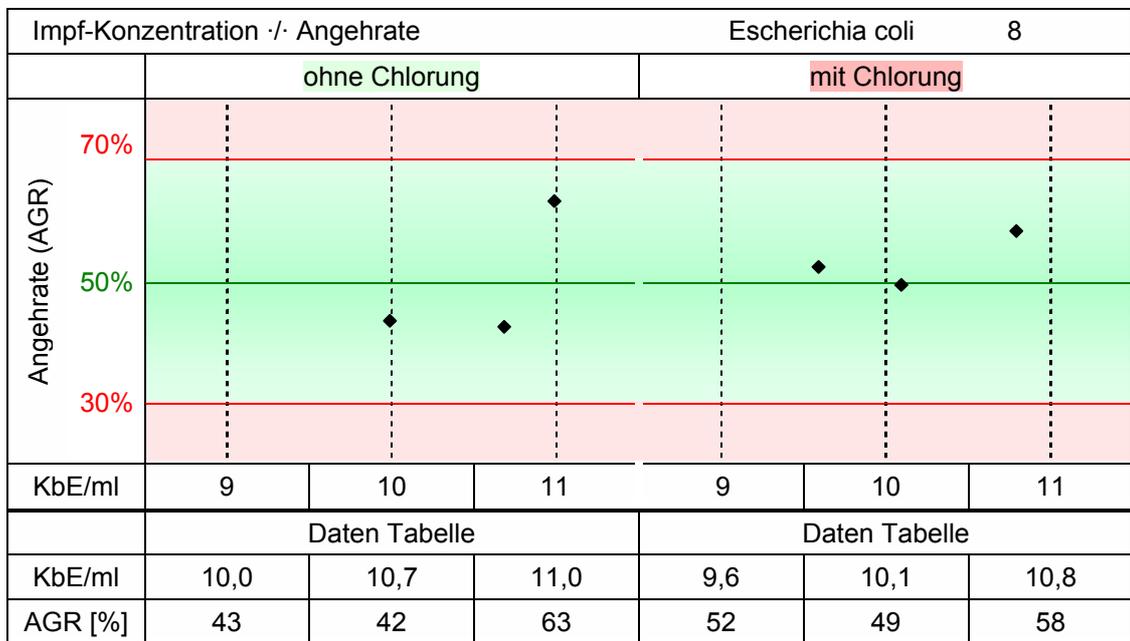
Tab. 4.2



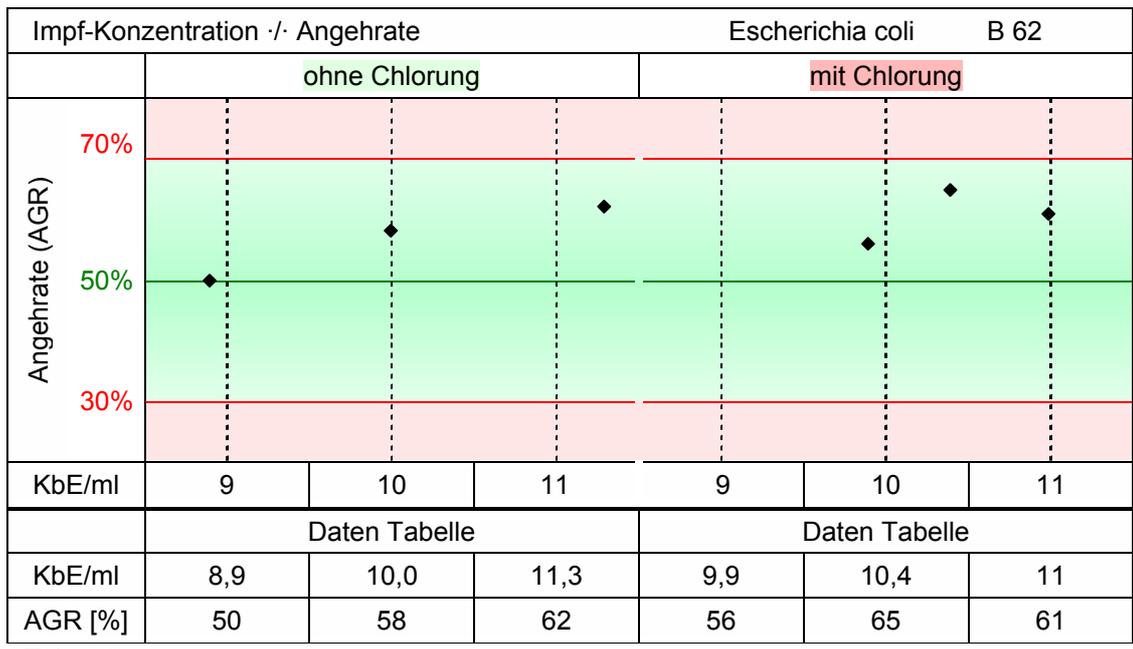
Tab. 4.3



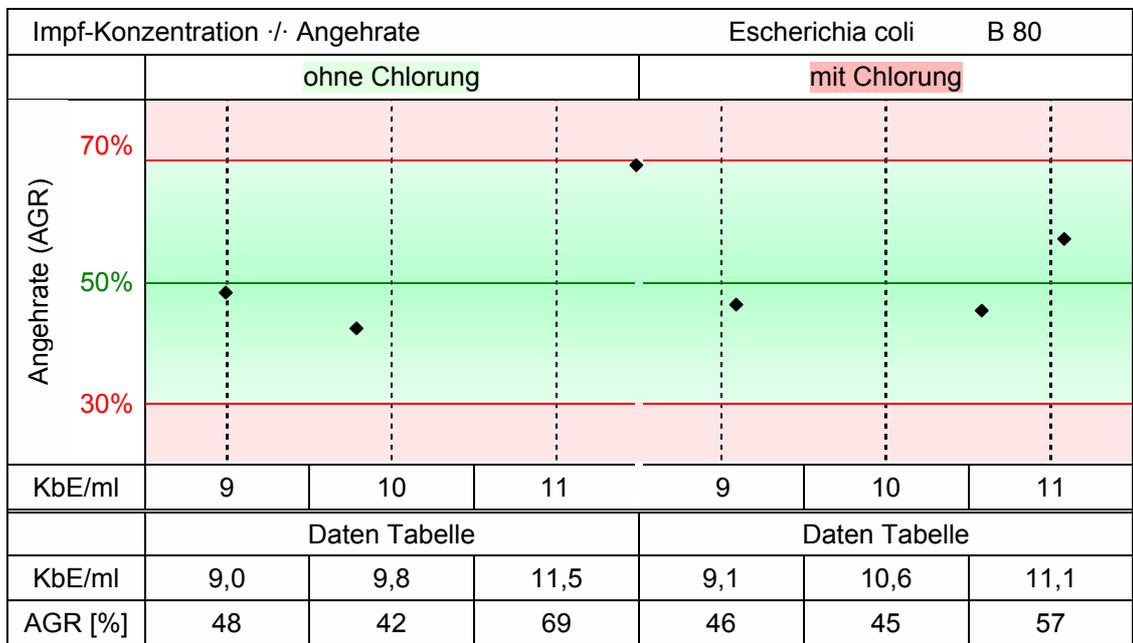
Tab. 4.4



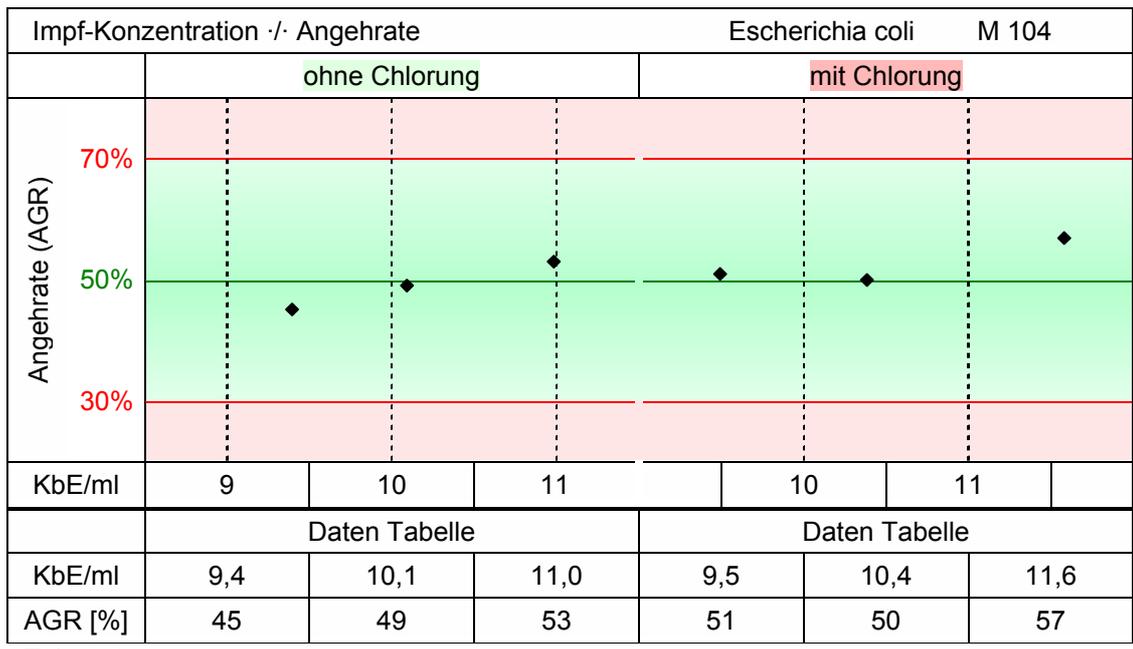
Tab. 4.5



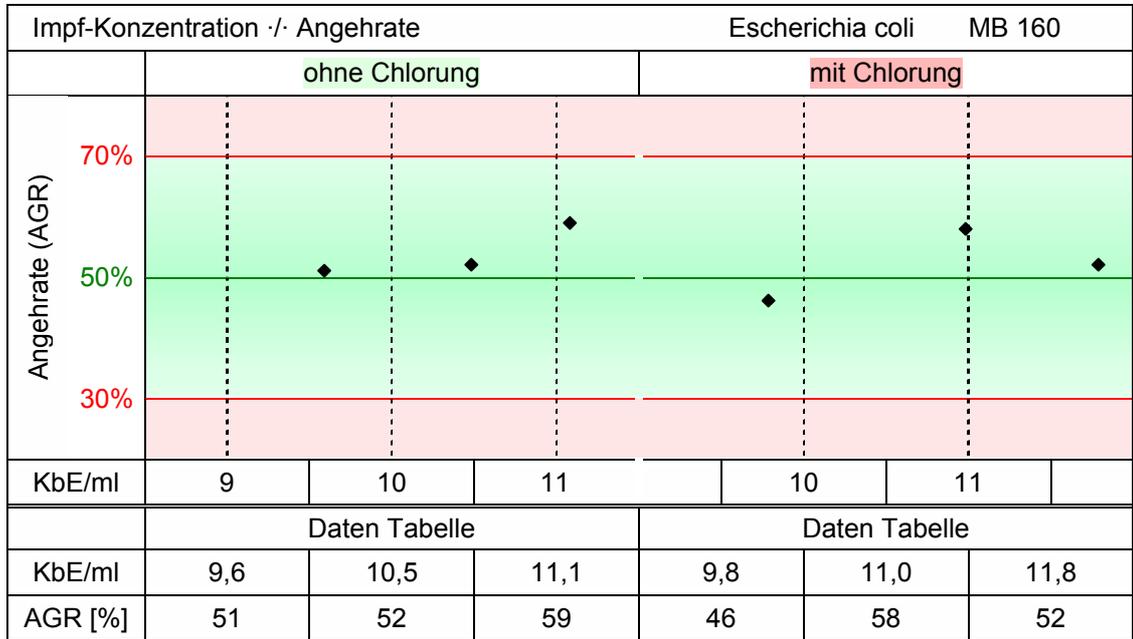
Tab. 4.6



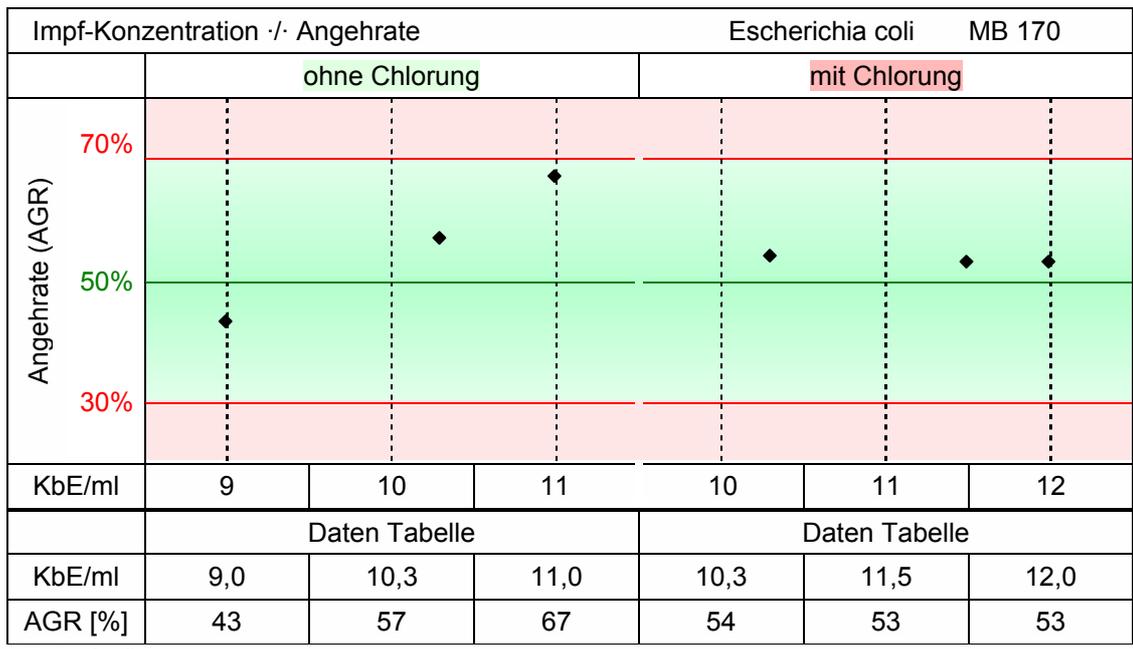
Tab. 4.7



Tab. 4.8



Tab. 4.9



Tab. 4.10

## 4.3 Hauptversuche

### 4.3.1 Vergleiche zwischen verschiedenen Nährlösungen und deren statistische Auswertung

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden die Angehraten in der zu untersuchenden Nährlösungen mit der im parallel beimpften Standard-Nährmedium CSL (3.2.10) (als Referenzwert) verglichen. Die Verteilung der KbE auf die Reagenzgläser und die daraus resultierende Angehrate unterliegt den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit und damit gewissen Schwankungen. Deshalb ist es nicht sinnvoll, die Angehraten selbst, als Absolutwerte betrachtet, miteinander zu vergleichen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der „tatsächliche“ Wert (Erwartungswert) in einem bestimmten Intervall um die experimentell gefundenen Werte herum liegen, und das mit einer zugehörigen Wahrscheinlichkeit. Je größer man das sog. Konfidenzintervall wählt, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass dadurch auch der „tatsächliche“ Wert abgedeckt ist. Der Unterschied zwischen zwei Werten gilt dann als signifikant, wenn sich die zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle nicht überschneiden <sup>(17)</sup> <sup>(29)</sup>. Letztere wurden den wissenschaftlichen Tabellen der Documenta Geigy entnommen <sup>(16)</sup>.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vergleich zwischen CSL (3.2.11) und DEV-Lactose-Pepton-Buillon (3.2.12)

Aus den vor und nach der Chlorung (4.2.4) gewonnenen Proben (ohne bzw. mit Chlorschädigung) wurden Impfsuspensionen mit der unter 4.2.6 gefundenen Bakterienkonzentration hergestellt. Pro Stamm wurde von jeweils 200 Reagenzgläsern CSL (3.2.11) und 200 Reagenzgläsern DEV-Lactose (3.2.12) jeweils die eine Hälfte (100 Gläser) mit nicht-chlorungsgeschädigten und die andere Hälfte (100 Gläser) mit chlorungsgeschädigten Keimen beimpft. Aufgrund der Beimpfung aus derselben Versuchssuspension konnten die Angehraten in den Nährmedien bzw. deren Konfidenzintervalle direkt miteinander verglichen und gleichzeitig denen der nicht dem Desinfektionsmittel ausgesetzten Kontrollsuspension gegenübergestellt werden.

Die einzelnen Angehraten sowie die zugehörigen 95%-Vertrauensgrenzen sind in den Tabellen 5.1 – 5.10 und 6.1 – 6.10 protokolliert

| Vergleich                 |                   | CSL               |                   | DEV-Lactose       |                   |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                           |                   |                   |                   | ohne Chlorung     |                   |
| Stamm                     | ATCC 11229        | NCTC 10538        | 5                 | 6                 | 8                 |
| Angehrate (AGR)           | 90%               |                   |                   |                   |                   |
|                           | 70%               |                   |                   |                   |                   |
|                           | 50%               |                   |                   |                   |                   |
|                           | 30%               |                   |                   |                   |                   |
|                           | 10%               |                   |                   |                   |                   |
| Unterschied               | nicht signifikant |
| Daten-Tabelle CSL         |                   |                   |                   |                   |                   |
| beimpfte Gläser           | 100               | 100               | 100               | 100               | 100               |
| positive Gläser           | 48                | 42                | 40                | 48                | 48                |
| Konfidenz-Intervall       | 37,90 - 58,22     | 32,20 - 52,29     | 30,33 - 50,28     | 37,90 - 58,22     | 37,90 - 58,22     |
| Daten-Tabelle DEV-Lactose |                   |                   |                   |                   |                   |
| beimpfte Gläser           | 100               | 100               | 100               | 100               | 100               |
| positive Gläser           | 42                | 56                | 49                | 54                | 42                |
| Konfidenz-Intervall       | 32,20 - 52,29     | 45,72 - 65,92     | 38,86 - 59,20     | 43,74 - 64,02     | 32,20 - 52,29     |

Tab. 5.1 – 5.5

| Vergleich                 |                   | CSL ·/· DEV-Lactose |                   | ohne Chlorung     |                   |
|---------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Stamm                     | B 62              | B 80                | M 104             | MB 160            | MB 170            |
| Angehrate (AGR)           | 90%               |                     |                   |                   |                   |
|                           | 70%               |                     |                   |                   |                   |
|                           | 50%               |                     |                   |                   |                   |
|                           | 30%               |                     |                   |                   |                   |
|                           | 10%               |                     |                   |                   |                   |
| Unterschied               | nicht signifikant | nicht signifikant   | nicht signifikant | nicht signifikant | nicht signifikant |
| Daten-Tabelle CSL         |                   |                     |                   |                   |                   |
| beimpfte Gläser           | 100               | 100                 | 100               | 100               | 100               |
| positive Gläser           | 51                | 52                  | 58                | 53                | 41                |
| Konfidenz-Intervall       | 40,80 - 61,14     | 41,78 - 62,10       | 47,71 - 67,80     | 42,76 - 63,06     | 31,26 - 51,29     |
| Daten-Tabelle DEV-Lactose |                   |                     |                   |                   |                   |
| beimpfte Gläser           | 100               | 100                 | 100               | 100               | 100               |
| positive Gläser           | 55                | 45                  | 50                | 53                | 49                |
| Konfidenz-Intervall       | 44,73 - 64,97     | 35,03 - 55,27       | 39,83 - 60,17     | 42,76 - 63,06     | 38,86 - 59,20     |

Tab. 5.6 – 5.10

| Vergleich                 |               | CSL · DEV-Lactose |               | mit Chlorung  |               |  |
|---------------------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|--|
| Stamm                     | ATCC 11229    | NCTC 10538        | 5             | 6             | 8             |  |
| Angehrate (AGR)           | 90%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 70%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 50%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 30%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 10%           |                   |               |               |               |  |
| Unterschied               | signifikant   | signifikant       | signifikant   | signifikant   | signifikant   |  |
| Daten-Tabelle CSL         |               |                   |               |               |               |  |
| beimpfte Gläser           | 100           | 100               | 100           | 100           | 100           |  |
| positive Gläser           | 55            | 59                | 66            | 70            | 55            |  |
| Konfidenz-Intervall       | 47,73 - 64,97 | 48,71 - 68,74     | 55,85 - 75,18 | 61,07 - 78,76 | 44,73 - 64,97 |  |
| Daten-Tabelle DEV-Lactose |               |                   |               |               |               |  |
| beimpfte Gläser           | 100           | 100               | 100           | 100           | 100           |  |
| positive Gläser           | 33            | 38                | 32            | 21            | 33            |  |
| Konfidenz-Intervall       | 23,92 - 43,12 | 28,48 - 48,25     | 32,02 - 42,08 | 13,49 - 30,29 | 23,92 - 43,12 |  |

Tab. 6.1 – 6.5

| Vergleich                 |               | CSL · DEV-Lactose |               |               | mit Chlorung  |  |
|---------------------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|--|
| Stamm                     | B 62          | B 80              | M 104         | MB 160        | MB 170        |  |
| Angehrate (AGR)           | 90%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 70%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 50%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 30%           |                   |               |               |               |  |
|                           | 10%           |                   |               |               |               |  |
| Unterschied               | signifikant   | signifikant       | signifikant   | signifikant   | signifikant   |  |
| Daten-Tabelle CSL         |               |                   |               |               |               |  |
| beimpfte Gläser           | 100           | 100               | 100           | 100           | 100           |  |
| positive Gläser           | 64            | 57                | 45            | 41            | 50            |  |
| Konfidenz-Intervall       | 53,79 - 73,36 | 46,71 - 66,86     | 34,08 - 54,28 | 31,29 - 51,29 | 39,83 - 60,11 |  |
| Daten-Tabelle DEV-Lactose |               |                   |               |               |               |  |
| beimpfte Gläser           | 100           | 100               | 100           | 100           | 100           |  |
| positive Gläser           | 19            | 33                | 22            | 21            | 28            |  |
| Konfidenz-Intervall       | 11,84 - 28,07 | 23,92 - 43,12     | 14,33 - 31,39 | 13,49 - 30,29 | 19,48 - 37,87 |  |

Tab. 6.6 – 6.10

## 5.2 Vergleich der Komponenten von CSL (3.2.11) und DEV-Lactose-Pepton-Buillon (3.2.12)

Aufgrund der Unterschiede zwischen den Angehraten der chlorungsgeschädigten Keime in CSL (3.2.11) und DEV-Lactose-Pepton-Buillon (3.2.12), die sich Abschnitt 5.1 herausgestellt hatten, wurden die einzelnen Komponenten der Lösungen gegenübergestellt:

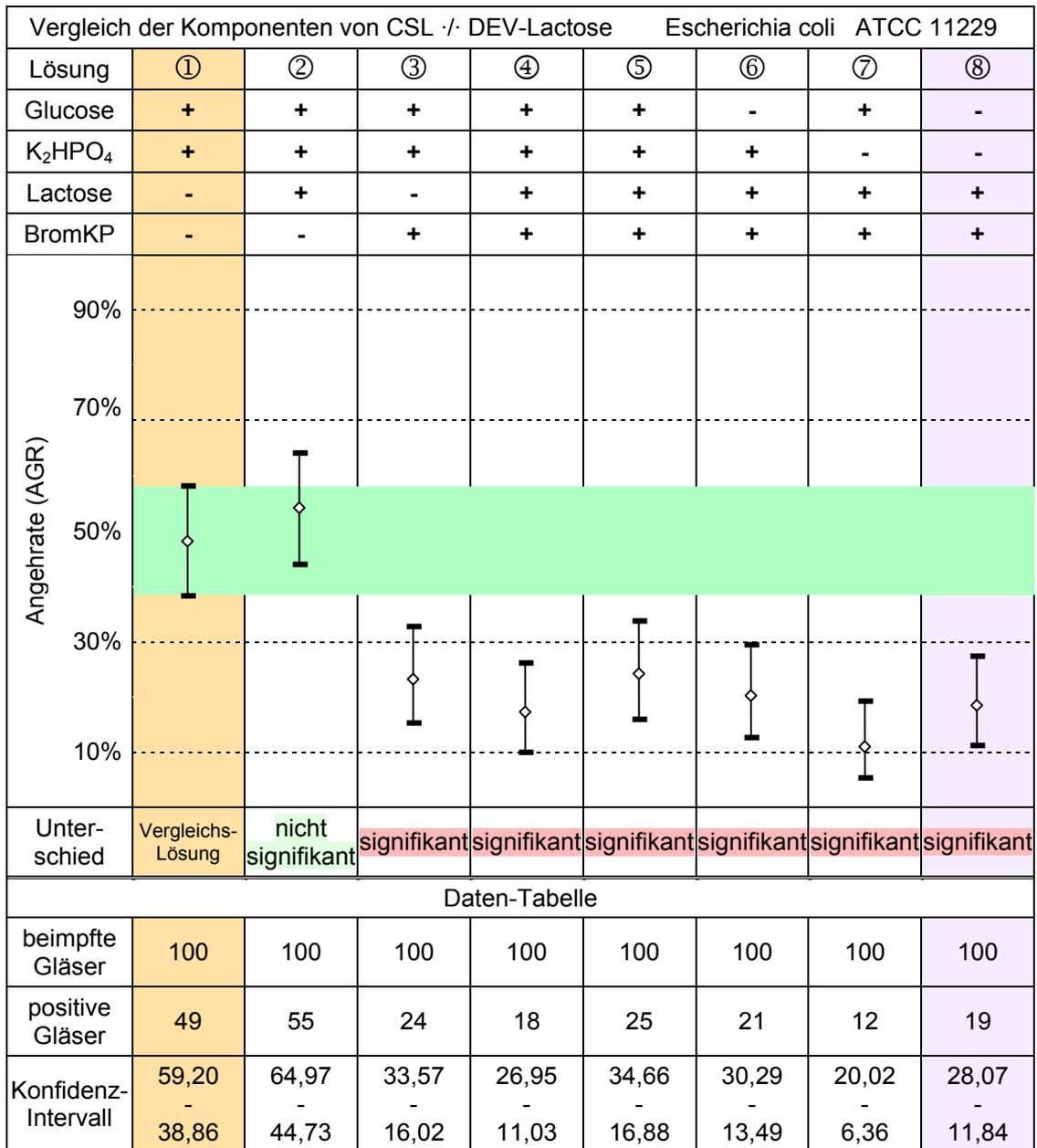
| Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung (3.2.11) |                           | DEV-Lactose-Pepton-Buillon (3.1.12) |
|---|---------------------------|-------------------------------------|
| 17,0 g/l                                    | Casein-Pepton             | 17,0 g/l                            |
| 3,0 g/l                                     | Sojamehl-Pepton           | 3,0 g/l                             |
| -,-   | Lactose                   | 10,0 g/l                            |
| 5,0 g/l                                     | Natriumchlorid            | 5,0 g/l                             |
| 2,5 g/l                                     | Dikalium-Hydrogenphosphat | -,-                                 |
| 2,5 g/l                                     | Glucose                   | -,-                                 |
| -,-   | Bromkresolpurpur          | 0,02 g/l                            |

Die für das jeweilige Nährmedium spezifischen Bestandteile sind hervorgehoben und wurden auf ihre hemmende bzw. wachstumsfördernde Wirkung hin untersucht, indem einer jeden Lösung die nicht darin enthaltenen Bestandteile der anderen Lösung in der jeweils angegebenen Menge einzeln bzw. kombiniert zugegeben wurden. Da sich bei den nicht geschädigten Keimen kein signifikanter Unterschied zwischen den Angehraten in den beiden Nährmedien gezeigt hatte, wurden für diese Versuche lediglich chlorungsgeschädigte E. coli verwendet. Verglichen wurden also im Einzelnen folgende Kombinationen:

| ↓ Nährmedien \ Komponenten ⇨                        | Glucose | Dikalium-Hydrogenphosphat | Lactose  | Bromkresolpurpur |
|---|---------|---------------------------|----------|------------------|
| ① CSL   | 2,5 g/l | 2,5 g/l                   | ---      | ---              |
| ② CSL + Lactose                                     | 2,5 g/l | 2,5 g/l                   | 10,0 g/l | ---              |
| ③ CSL + Bromkresolpurpur                            | 2,5 g/l | 2,5 g/l                   | ---      | 0,02 g/l         |
| ④ CSL + Lactose + Bromkresolpurpur                  | 2,5 g/l | 2,5 g/l                   | 10,0 g/l | 0,02 g/l         |
| ⑤ DEV-Lactose + Glucose + Dikalium-Hydrogenphosphat | 2,5 g/l | 2,5 g/l                   | 10,0 g/l | 0,02 g/l         |
| ⑥ DEV-Lactose + Dikalium-Hydrogenphosphat           | ---     | 2,5 g/l                   | 10,0 g/l | 0,02 g/l         |
| ⑦ DEV-Lactose + Glucose                             | 2,5 g/l | ---                       | 10,0 g/l | 0,02 g/l         |
| ⑧ DEV-Lactose                                       | ---     | ---                       | 10,0 g/l | 0,02 g/l         |

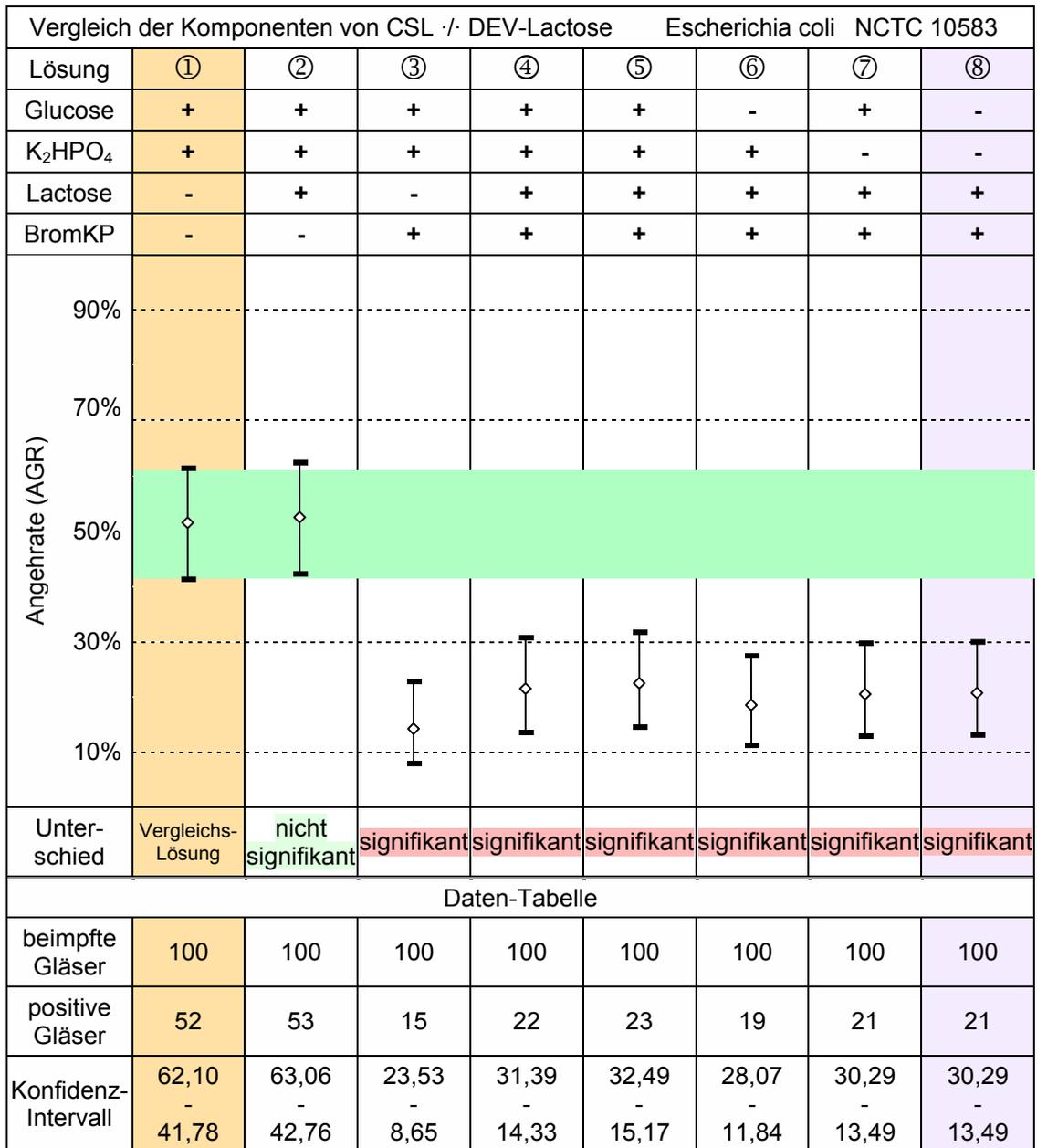
Die im jeweiligen Nährmedium (CSL , DEV-Lactose ) bereits enthaltenen Bestandteile sowie die jeweils untersuchten Komponenten () sind farblich hervorgehoben.

Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen und Diagrammen (Tab. 7.1 – 7.10).



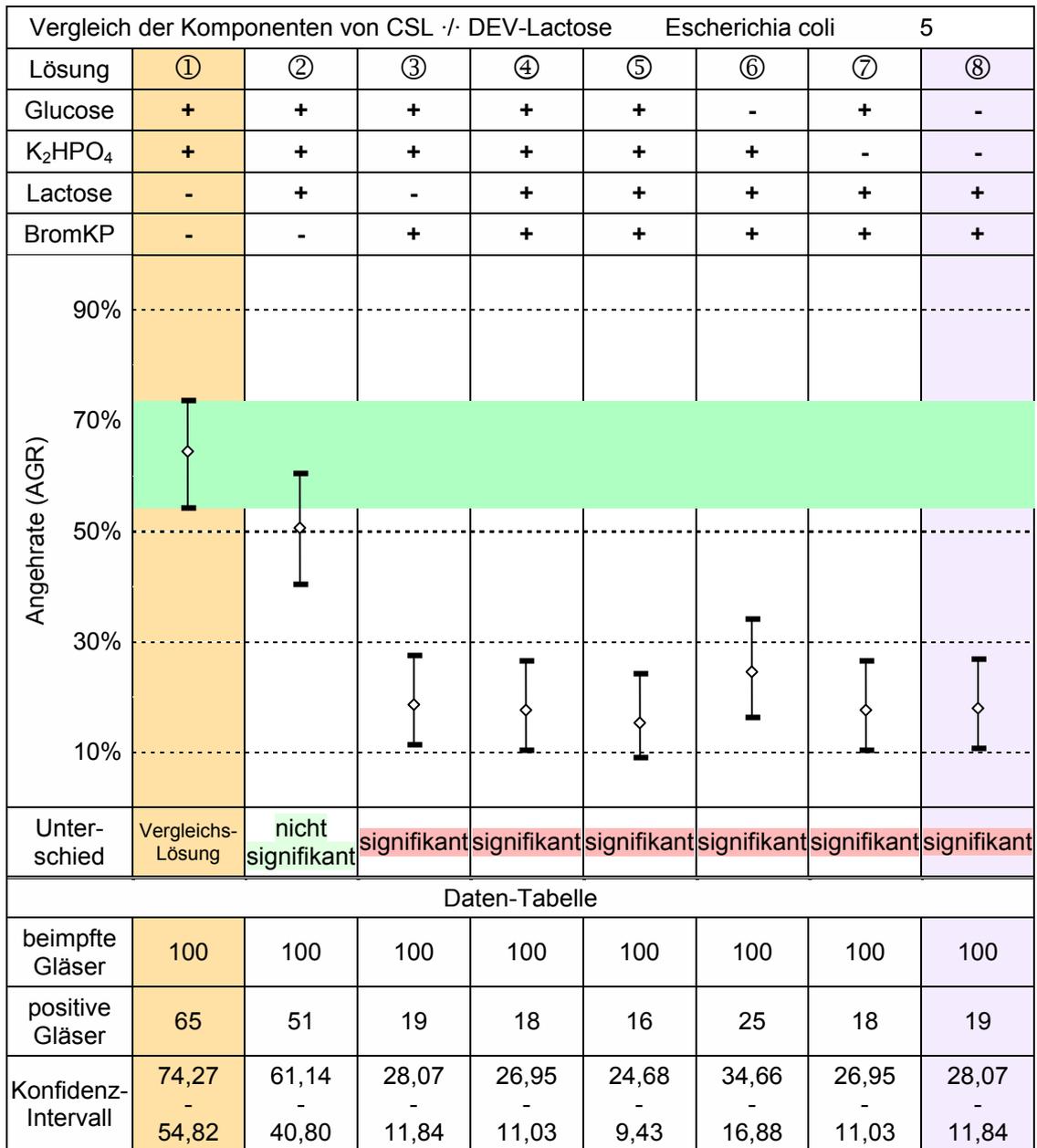
Tab. 7.1

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung



Tab. 7.2

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

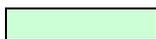


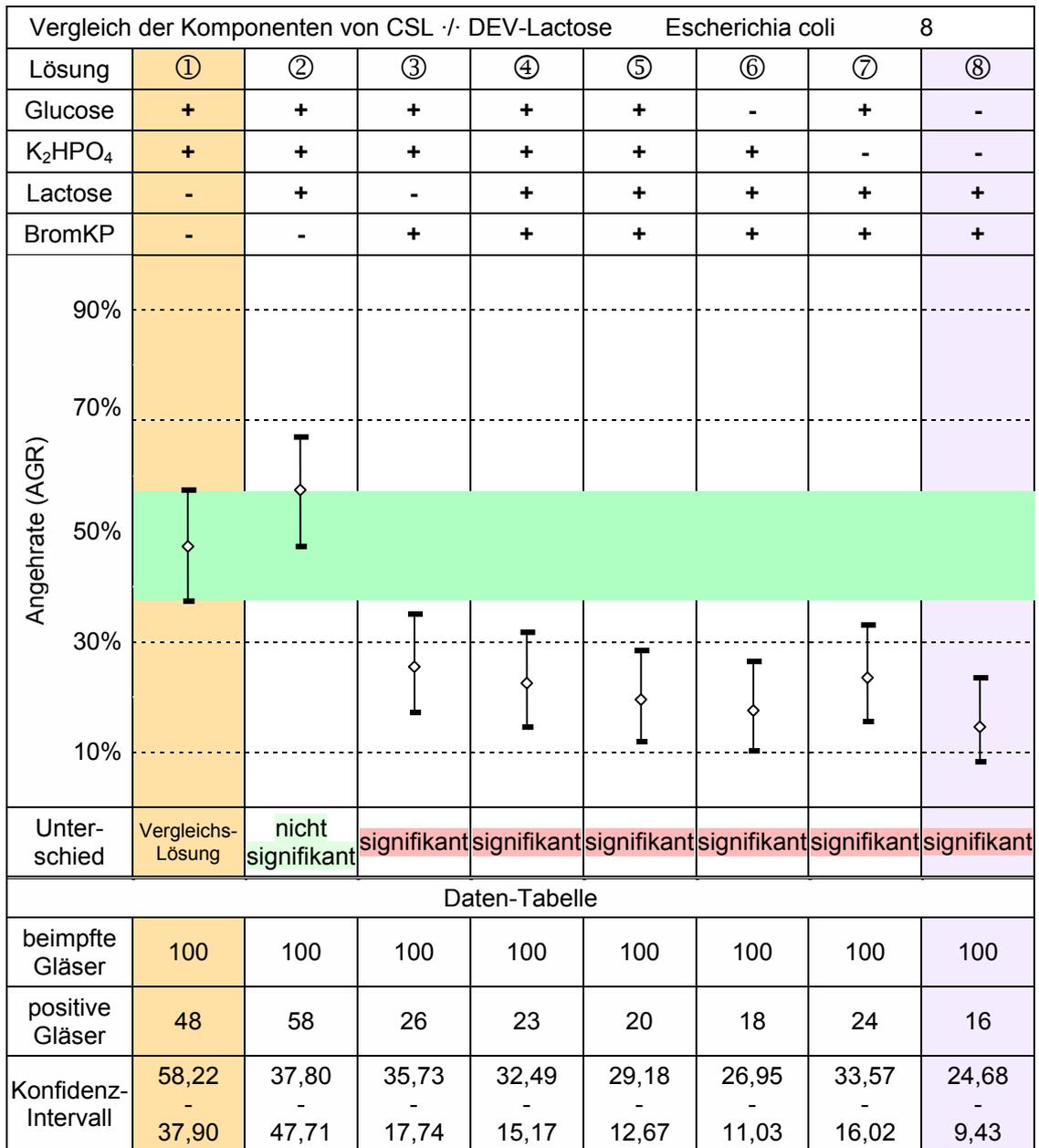
Tab. 7.3

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

| Vergleich der Komponenten von CSL · DEV-Lactose |                   |                   |             |             |             |             |             | Escherichia coli | 6 |
|---|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|---|
| Lösung  | ①                 | ②                 | ③           | ④           | ⑤           | ⑥           | ⑦           | ⑧                |   |
| Glucose   | +                 | +                 | +           | +           | +           | -           | +           | -                |   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | +                 | +                 | +           | +           | +           | +           | -           | -                |   |
| Lactose   | -                 | +                 | -           | +           | +           | +           | +           | +                |   |
| BromKP  | -                 | -                 | +           | +           | +           | +           | +           | +                |   |
| Angehrate (AGR)                                 | 90%               |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
|   | 70%               |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
|   | 50%               |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
|   | 30%               |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
|   | 10%               |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
| Unterschied                                     | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant | signifikant | signifikant | signifikant | signifikant | signifikant      |   |
| Daten-Tabelle                                   |                   |                   |             |             |             |             |             |                  |   |
| beimpfte Gläser                                 | 100               | 100               | 100         | 100         | 100         | 100         | 100         | 100              |   |
| positive Gläser                                 | 61                | 43                | 11          | 23          | 19          | 21          | 20          | 14               |   |
| Konfidenz-Intervall                             | 70,60             | 53,29             | 18,83       | 32,49       | 28,07       | 30,29       | 29,18       | 22,37            |   |
|   | - 50,73           | - 33,14           | - 5,62      | - 15,17     | - 11,84     | - 13,49     | - 12,67     | - 7,78           |   |

Tab. 7.4

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

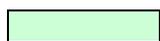


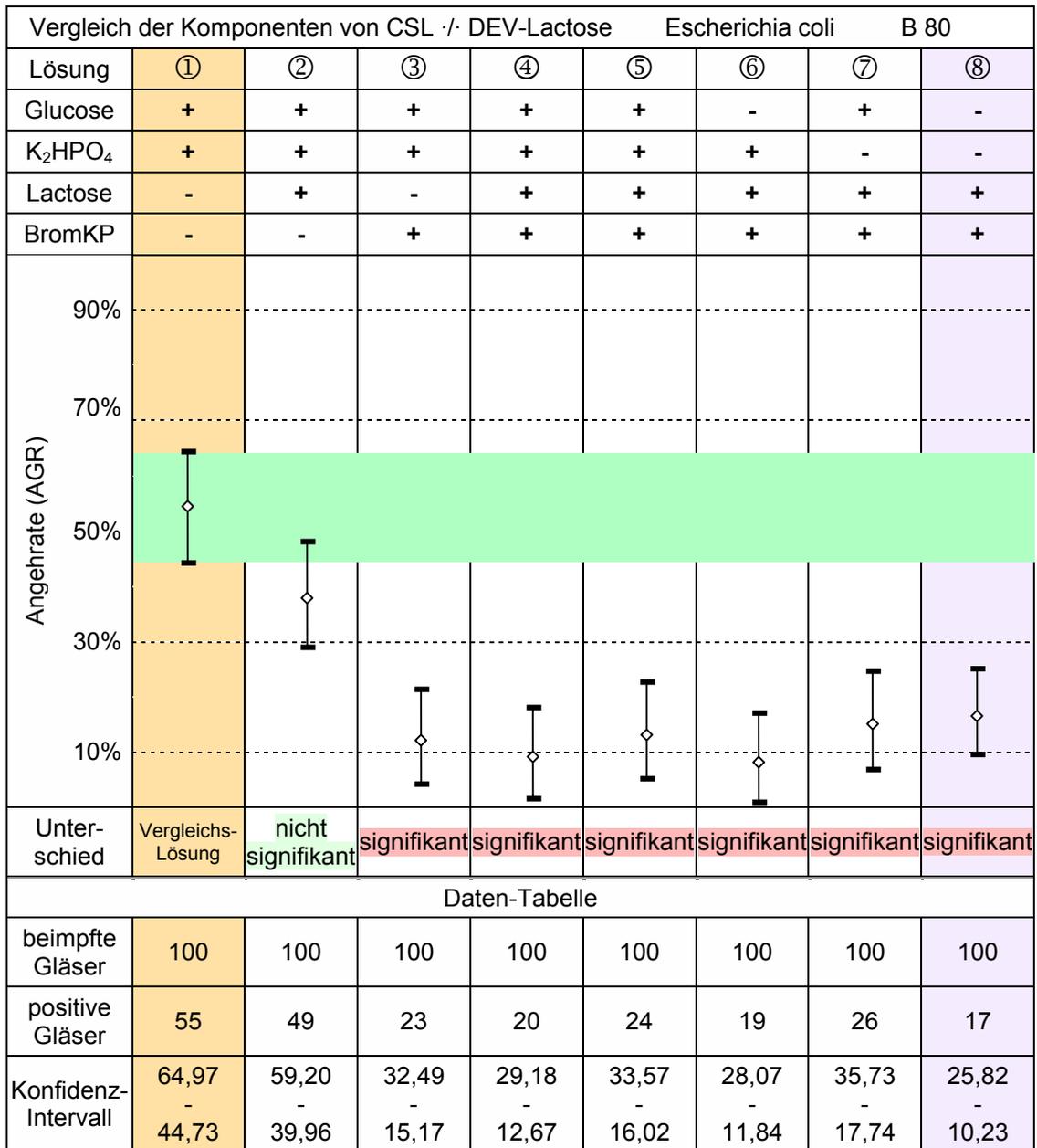
Tab. 7.5

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

| Vergleich der Komponenten von CSL · DEV-Lactose |                   |                   |             | Escherichia coli |             |             | B 62        |             |
|---|-------------------|-------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Lösung  | ①                 | ②                 | ③           | ④                | ⑤           | ⑥           | ⑦           | ⑧           |
| Glucose   | +                 | +                 | +           | +                | +           | -           | +           | -           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | +                 | +                 | +           | +                | +           | +           | -           | -           |
| Lactose   | -                 | +                 | -           | +                | +           | +           | +           | +           |
| BromKP  | -                 | -                 | +           | +                | +           | +           | +           | +           |
| Angehrate (AGR)                                 | 90%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 70%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 50%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 30%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 10%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
| Unterschied                                     | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant | signifikant      | signifikant | signifikant | signifikant | signifikant |
| Daten-Tabelle                                   |                   |                   |             |                  |             |             |             |             |
| beimpfte Gläser                                 | 100               | 100               | 100         | 100              | 100         | 100         | 100         | 100         |
| positive Gläser                                 | 67                | 60                | 27          | 24               | 30          | 25          | 19          | 31          |
| Konfidenz-Intervall                             | 76,08             | 69,67             | 36,80       | 33,57            | 39,98       | 34,66       | 28,07       | 41,03       |
|   | -56,88            | -49,72            | -18,61      | -16,02           | -21,24      | -16,88      | -11,84      | -22,13      |

Tab. 7.6

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

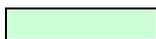


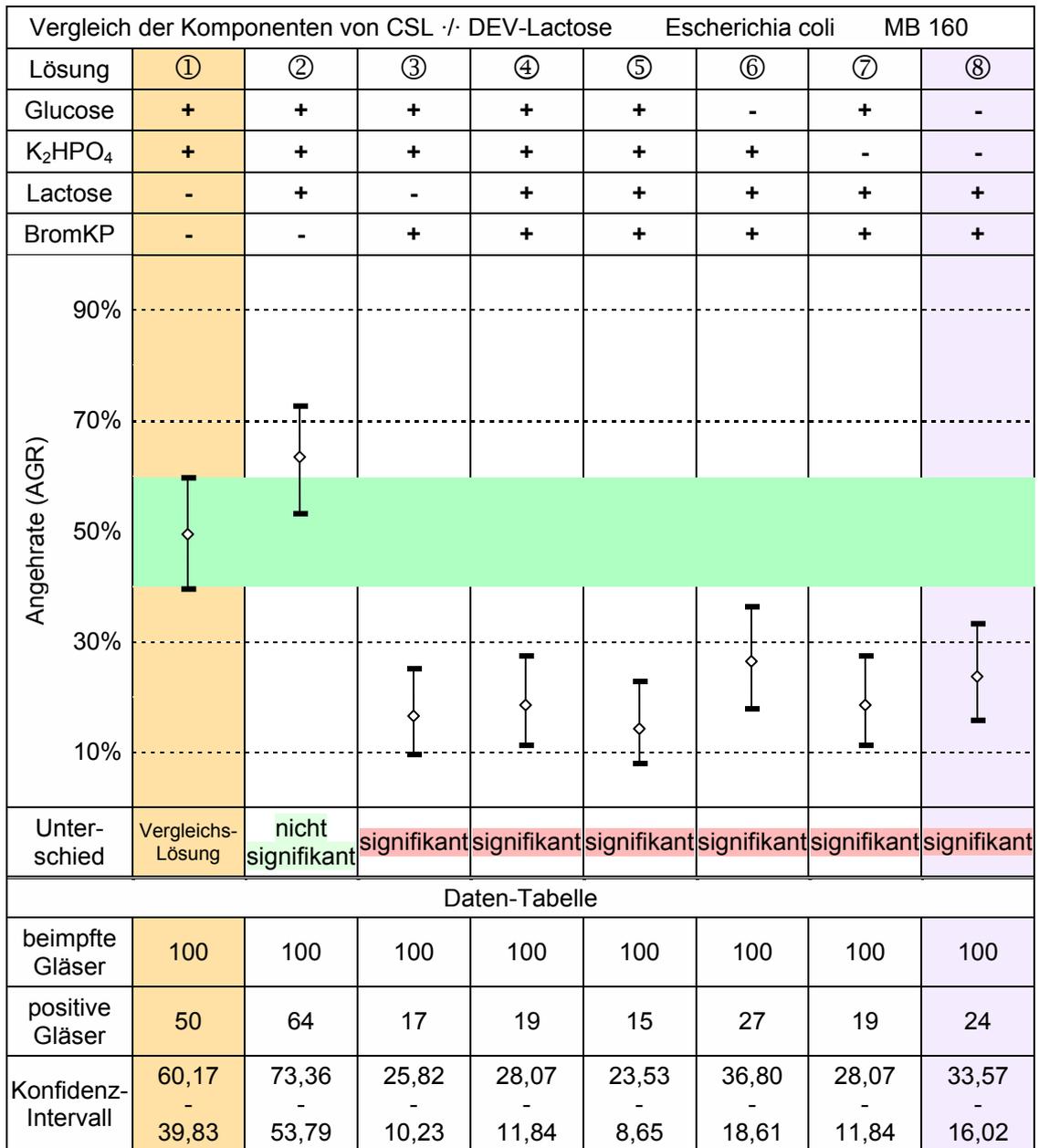
Tab. 7.7

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

| Vergleich der Komponenten von CSL · DEV-Lactose |                     |                     |                     | Escherichia coli    |                     |                     | M 104               |                     |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Lösung  | ①                   | ②                   | ③                   | ④                   | ⑤                   | ⑥                   | ⑦                   | ⑧                   |
| Glucose   | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   | -                   | +                   | -                   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   | -                   | -                   |
| Lactose   | -                   | +                   | -                   | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   |
| BromKP  | -                   | -                   | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   | +                   |
| Angehrate (AGR)                                 | 90%                 |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|   | 70%                 |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|   | 50%                 |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|   | 30%                 |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|   | 10%                 |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
| Unterschied                                     | Vergleichs-Lösung   | nicht signifikant   | signifikant         | signifikant         | signifikant         | signifikant         | signifikant         | signifikant         |
| Daten-Tabelle                                   |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
| beimpfte Gläser                                 | 100                 | 100                 | 100                 | 100                 | 100                 | 100                 | 100                 | 100                 |
| positive Gläser                                 | 58                  | 58                  | 20                  | 31                  | 21                  | 27                  | 23                  | 25                  |
| Konfidenz-Intervall                             | 67,80<br>-<br>47,71 | 67,80<br>-<br>47,71 | 29,18<br>-<br>12,67 | 41,03<br>-<br>22,13 | 30,29<br>-<br>13,49 | 36,80<br>-<br>18,61 | 32,49<br>-<br>15,17 | 34,66<br>-<br>16,88 |

Tab. 7.8

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

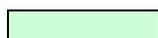


Tab. 7.9

95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

| Vergleich der Komponenten von CSL · DEV-Lactose |                   |                   |             | Escherichia coli |             |             | MB 170      |             |
|---|-------------------|-------------------|-------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Lösung  | ①                 | ②                 | ③           | ④                | ⑤           | ⑥           | ⑦           | ⑧           |
| Glucose   | +                 | +                 | +           | +                | +           | -           | +           | -           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | +                 | +                 | +           | +                | +           | +           | -           | -           |
| Lactose   | -                 | +                 | -           | +                | +           | +           | +           | +           |
| BromKP  | -                 | -                 | +           | +                | +           | +           | +           | +           |
| Angehrate (AGR)                                 | 90%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 70%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 50%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 30%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
|   | 10%               |                   |             |                  |             |             |             |             |
| Unterschied                                     | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant | signifikant      | signifikant | signifikant | signifikant | signifikant |
| Daten-Tabelle                                   |                   |                   |             |                  |             |             |             |             |
| beimpfte Gläser                                 | 100               | 100               | 100         | 100              | 100         | 100         | 100         | 100         |
| positive Gläser                                 | 63                | 54                | 22          | 18               | 13          | 17          | 24          | 20          |
| Konfidenz-Intervall                             | 72,44             | 64,02             | 31,39       | 26,95            | 21,20       | 25,82       | 33,57       | 29,18       |
|   | - 52,76           | - 43,74           | - 14,33     | - 11,03          | - 7,11      | - 10,23     | - 16,02     | - 12,67     |

Tab. 7.10



95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

### 5.3 Konzentrationsabhängige Wirkung von Bromkresolpurpur

Im vorherigen Abschnitt zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen allen Bromkresolpurpur enthaltenden Lösungen und der Vergleichslösung (CSL) und dies bei allen Stämmen. Daher wurde nun untersucht, ob und welche Unterschiede eine veränderte Konzentration dieser Komponente hervorbringt.

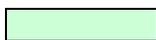
Die Ergebnisse sind in den Tabellen und Diagrammen 8 (Übersicht) und 8.1 – 8.10 (Detail) dokumentiert.

| ÜBERSICHT          |                               |                               |                               |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Stämme             | 0,005 g/l<br>Bromkresolpurpur | 0,010 g/l<br>Bromkresolpurpur | 0,020 g/l<br>Bromkresolpurpur |
| E. coli ATCC 11229 | nicht signifikant             | signifikant                   | signifikant                   |
| E. coli NCTC 10583 | nicht signifikant             | nicht signifikant             | signifikant                   |
| E. coli 5          | nicht signifikant             | nicht signifikant             | signifikant                   |
| E. coli 6          | nicht signifikant             | nicht signifikant             | signifikant                   |
| E. coli 8          | nicht signifikant             | nicht signifikant             | signifikant                   |
| E. coli B 62       | nicht signifikant             | signifikant                   | signifikant                   |
| E. coli B 80       | nicht signifikant             | signifikant                   | signifikant                   |
| E. coli M 104      | nicht signifikant             | signifikant                   | signifikant                   |
| E. coli MB 160     | nicht signifikant             | nicht signifikant             | signifikant                   |
| E. coli MB 170     | nicht signifikant             | signifikant                   | signifikant                   |

Tab. 8

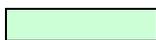
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung Escherichia coli ATCC 11229 |                |               |
|-----------------------------------|-------------------|--|----------------|---------------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1                           | DEV-Lactose M2 | DEV-Lactose   |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l                                | 0,010 g/l      | 0,020 g/l     |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |  |                |               |
|                                   | 70%               |  |                |               |
|                                   | 50%               |  |                |               |
|                                   | 30%               |  |                |               |
|                                   | 10%               |  |                |               |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant                        | signifikant    | signifikant   |
| Daten-Tabelle                     |                   |  |                |               |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100                                      | 100            | 100           |
| positive Gläser                   | 67                | 65                                       | 45             | 46            |
| Konfidenz-Intervall               | 56,88 - 76,08     | 54,82 - 74,27                            | 35,03 - 55,27  | 35,98 - 56,26 |

Tab. 8.1

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

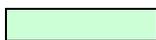
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                   | Escherichia coli NCTC 10583 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2    | DEV-Lactose                 |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l         | 0,020 g/l                   |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                   |                             |
|                                   | 70%               |                   |                   |                             |
|                                   | 50%               |                   |                   |                             |
|                                   | 30%               |                   |                   |                             |
| 10%                               |                   |                   |                   |                             |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | nicht signifikant | signifikant                 |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                   |                             |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100               | 100                         |
| positive Gläser                   | 60                | 61                | 49                | 38                          |
| Konfidenz-Intervall               | 49,72 - 69,97     | 50,73 - 70,60     | 38,86 - 59,20     | 28,48 - 48,25               |

Tab. 8.2

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

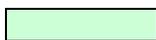
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung Escherichia coli 5 |                   |               |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|---------------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1                  | DEV-Lactose M2    | DEV-Lactose   |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l                       | 0,010 g/l         | 0,020 g/l     |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                                 |                   |               |
|                                   | 70%               |                                 |                   |               |
|                                   | 50%               |                                 |                   |               |
|                                   | 30%               |                                 |                   |               |
| 10%                               |                   |                                 |                   |               |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant               | nicht signifikant | signifikant   |
| Daten-Tabelle                     |                   |                                 |                   |               |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100                             | 100               | 100           |
| positive Gläser                   | 47                | 51                              | 32                | 26            |
| Konfidenz-Intervall               | 36,94 - 57,42     | 40,80 - 60,17                   | 23,02 - 42,08     | 17,74 - 35,73 |

Tab. 8.3

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

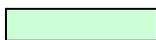
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                   | Escherichia coli | 6 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|---|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2    | DEV-Lactose      |   |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l         | 0,020 g/l        |   |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 70%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 50%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 30%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 10%               |                   |                   |                  |   |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | nicht signifikant | signifikant      |   |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                   |                  |   |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100               | 100              |   |
| positive Gläser                   | 58                | 52                | 38                | 20               |   |
| Konfidenz-Intervall               | 47,71 - 67,80     | 41,78 - 62,10     | 28,48 - 48,25     | 12,67 - 29,18    |   |

Tab. 8.4

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

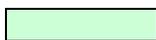
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                   | Escherichia coli | 8 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|---|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2    | DEV-Lactose      |   |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l         | 0,020 g/l        |   |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 70%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 50%               |                   |                   |                  |   |
|                                   | 30%               |                   |                   |                  |   |
| 10%                               |                   |                   |                   |                  |   |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | nicht signifikant | signifikant      |   |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                   |                  |   |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100               | 100              |   |
| positive Gläser                   | 39                | 45                | 33                | 20               |   |
| Konfidenz-Intervall               | 29,40 - 49,27     | 35,03 - 55,27     | 23,92 - 43,12     | 12,67 - 29,18    |   |

Tab. 8.5

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

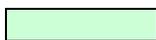
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                | Escherichia coli | B 62 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------|------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2 | DEV-Lactose      |      |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l      | 0,020 g/l        |      |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 70%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 50%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 30%               |                   |                |                  |      |
| 10%                               |                   |                   |                |                  |      |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant    | signifikant      |      |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                |                  |      |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100            | 100              |      |
| positive Gläser                   | 48                | 45                | 26             | 19               |      |
| Konfidenz-Intervall               | 37,90 - 58,22     | 35,03 - 55,27     | 17,74 - 35,73  | 11,84 - 28,07    |      |

Tab. 8.6

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

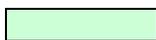
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                | Escherichia coli | B 80 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------|------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2 | DEV-Lactose      |      |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l      | 0,020 g/l        |      |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 70%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 50%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 30%               |                   |                |                  |      |
|                                   | 10%               |                   |                |                  |      |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant    | signifikant      |      |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                |                  |      |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100            | 100              |      |
| positive Gläser                   | 51                | 50                | 26             | 16               |      |
| Konfidenz-Intervall               | 40,80 - 61,14     | 39,83 - 60,17     | 17,74 - 35,73  | 9,43 - 24,68     |      |

Tab. 8.7

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

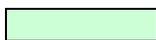
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                | Escherichia coli | M 104 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------|-------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2 | DEV-Lactose      |       |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l      | 0,020 g/l        |       |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                |                  |       |
|                                   | 70%               |                   |                |                  |       |
|                                   | 50%               |                   |                |                  |       |
|                                   | 30%               |                   |                |                  |       |
| 10%                               |                   |                   |                |                  |       |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant    | signifikant      |       |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                |                  |       |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100            | 100              |       |
| positive Gläser                   | 55                | 52                | 37             | 33               |       |
| Konfidenz-Intervall               | 44,73 - 64,97     | 41,78 - 62,10     | 27,56 - 47,24  | 23,92 - 43,02    |       |

Tab. 8.8

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

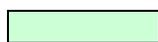
| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                   | Escherichia coli | MB 160 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2    | DEV-Lactose      |        |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l         | 0,020 g/l        |        |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                   |                  |        |
|                                   | 70%               |                   |                   |                  |        |
|                                   | 50%               |                   |                   |                  |        |
|                                   | 30%               |                   |                   |                  |        |
|                                   | 10%               |                   |                   |                  |        |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | nicht signifikant | signifikant      |        |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                   |                  |        |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100               | 100              |        |
| positive Gläser                   | 59                | 59                | 47                | 38               |        |
| Konfidenz-Intervall               | 48,71 - 68,74     | 48,71 - 68,74     | 36,94 - 57,24     | 28,48 - 48,25    |        |

Tab. 8.9

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

| Vergleich Bromkresolpurpur-Anteil |                   | mit Chlorung      |                | Escherichia coli | MB 170 |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|------------------|--------|
| Lösung                            | CSL               | DEV-Lactose M1    | DEV-Lactose M2 | DEV-Lactose      |        |
| BromKP                            | 0,000 g/l         | 0,005 g/l         | 0,010 g/l      | 0,020 g/l        |        |
| Angehrate (AGR)                   | 90%               |                   |                |                  |        |
|                                   | 70%               |                   |                |                  |        |
|                                   | 50%               |                   |                |                  |        |
|                                   | 30%               |                   |                |                  |        |
| 10%                               |                   |                   |                |                  |        |
| Unterschied                       | Vergleichs-Lösung | nicht signifikant | signifikant    | signifikant      |        |
| Daten-Tabelle                     |                   |                   |                |                  |        |
| beimpfte Gläser                   | 100               | 100               | 100            | 100              |        |
| positive Gläser                   | 42                | 44                | 22             | 13               |        |
| Konfidenz-Intervall               | 32,20 - 52,29     | 34,08 - 54,28     | 14,33 - 31,39  | 7,11 - 21,20     |        |

Tab. 8.10

 95%-Konfidenz-Intervall der Angehrate in der Vergleichslösung

## 6. Diskussion

Das Bestreben, die Belastung von Mensch und Umwelt durch Chemikalien zu minimieren, führt auch in der (Trink-)Wasserdeseinfektion zur Reduktion des Desinfektionsmittels auf eine möglichst geringe, noch wirksame Menge. Die erforderliche Sicherheit kann in diesem Konzentrationsbereich jedoch nur durch eine sehr genaue Dosierung und eine zuverlässige Kontrolle der Wirkung gewährleistet werden <sup>(38)</sup>. Bei einer Unterdosierung des Desinfektionsmittels tritt rasch eine Kontamination durch diverse Keime ein, die es in mikrobiologischen Untersuchungen nachzuweisen gilt <sup>(44)</sup>. Ein Verfahren, das nur völlig intakte Bakterien – z. B. von optimalen Nährböden usw. – erfasst, ist insofern als unzureichend zu betrachten, als dass sich durch das Desinfektionsmittel nicht abgetötete, sondern nur geschädigte Zellen unter günstigen Bedingungen wieder erholen und vermehren (Resuscitation) aber auch Infektionen hervorrufen können <sup>(39) (40)</sup>. Folglich müssen das Verfahren insgesamt auf seine Empfindlichkeit und die Materialien (Nährmedien, Filter etc.) im einzelnen auf ihre Toxizität gegenüber solchen Organismen untersucht werden, damit diese Keime nicht übersehen oder gar durch das Nachweisverfahren selbst beseitigt werden.

Die experimentelle Überprüfung der Eignung kann durch zwei unterschiedliche Methoden erfolgen:

1. der Nachweisverfahrens-Vergleich (NV-Methode)  
Simultanansatz multipler unabhängiger (Nativ-)Proben
2. die Einflussfaktoren-Analyse (EA-Methode)  
Simultanansatz multipler abhängiger (Labor-)Proben

Gerade letztere, neuere Methode ist besonders geeignet, einzelne Faktoren oder deren Kombination zu untersuchen, da sich im Gegensatz zu Nativproben unter Laborverhältnissen die jeweils zu betrachtenden Bedingungen exakt einstellen lassen. Ihr Einfluss auf das zu beurteilende Verfahren wird simultan mit Hilfe von abhängigen Proben (Proben aus der selben Grundgesamtheit) gegen ein Referenzverfahren, das optimale Anzüchtungsverfahren, gemessen. Durch die genauere Definition des Versuchsansatzes lässt sich die Trennschärfe des Ergebnisses erhöhen. Um dabei die Verallgemeinerungsfähigkeit nicht auf der Ebene einer einzelnen Reinkultur zu vermindern, müssen verschiedene Stämme einer Spezies untersucht werden <sup>(43)</sup>.

So wurde in der vorliegenden Arbeit der Faktor „Chlorung“, auch als „Chlorungsschädigung“ oder „Chlorungsvorschädigung“ bezeichnet, bzw. dessen Einfluss auf den Nachweis von *Escherichia coli* mittels DEV-Lactose-Pepton-Lösung gemäß den Vorgaben zur Flüssigkeitsanreicherung (DIN 38411 – K 6 – 1) nach den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV) Gruppe K (Mikrobiologische Verfahren) Teil 6 (Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen) <sup>(20)</sup> an 10 verschiedenen Stämmen getestet.

Bei mehrstufigen Vorgehensweisen, wie dem drei-stufigen *E. coli*-Nachweis nach den DEV, gilt der Primärkultur ein besonderes Interesse, da sich vorgeschädigte Keime, wenn überhaupt, dann hier erholen und vermehren müssen, um nachgewiesen werden zu können <sup>(36)</sup>. Erst wenn hier eine positive Reaktion erfolgt ist, werden die weiteren Stufen zur Identifizierung der Keime durchgeführt <sup>(42)</sup>. Zeigt sich in der Primärkultur kein Wachstum, und sei es nur der zur Resuscitation ungeeigneten Zusammensetzung wegen, wird die Probe möglicherweise fälschlich als "keimfrei" beurteilt. Dies verdeutlicht die Relevanz der Nachweisempfindlichkeit speziell in der Primärkultur.

Um derart falschen Resultaten vorzubeugen sollte sich das Primärkultur-Medium zur Resuscitation genauso gut eignen wie das für den Zielorganismus beste bekannte (Voll-)Medium <sup>(43)</sup>. Diese Anforderung, die – wie an alle anderen – auch an das Verfahren nach der DIN-Norm 38411 gestellt wird, war die Grundlage für die vorliegende Arbeit, in der das Primärkultur-Medium DEV-Lactose-Pepton-Lösung (DEV-LPL) im direkten Vergleich dem Standard-Nährmedium Caseinpepton-Sojamehlpepton-Lösung (CSL) gegenübergestellt wurde. Die beiden Lösungen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung nur wenig: DEV-LPL enthält 10 g/l Lactose und 20 mg/l Bromkresolpurpur, CSL stattdessen jeweils 2,5 g/l Glucose und Dikalium-Hydrogenphosphat. Die restlichen 25 g gelöster Bestandteile pro 1 l Lösung sind identisch. Bei den Versuchen mit intakten Keimen brachten dann auch beide Medien vergleichbare Angehraten hervor. Anders verhielt es sich mit den chlorungsgeschädigten Bakterien. Hier zeigte sich eine durchweg signifikant schlechtere Bilanz in der zu prüfenden DEV-LP-Lösung. Die vorliegenden Ergebnisse belegen die bereits 1985 von Schubert und Helm für das Membranfilter-Verfahren nachgewiesenen Defizite <sup>(40) (41)</sup> auch für die Flüssigkeitsanreicherung.

Im Zuge der Untersuchung der einzelnen Komponenten beider Lösungen konnte gezeigt werden, dass die nur in der CSL enthaltenen Stoffe (s. o.), fñgt man sie der DEV-LPL einzeln oder auch kombiniert zu, deren Resuscitationsfähigkeit nicht sonderlich zu verändern in der Lage sind. Andererseits wiesen auch die Angehraten in CSL, um die oben angegebene Lactosemenge ergänzt, keine nennenswerte Veränderung auf. Einzig das Bromkresolpurpur vermochte

– sowohl einzeln als auch in Kombination mit Lactose – die Angehrate signifikant zu vermindern (siehe Tabellen 7 + 7.1 – 7.10).

Einige sogenannte Selektionsmittel sind aufgrund entsprechend negativer Ergebnisse selbst bei intakten Zellen bereits aus Standardverfahren verbannt <sup>(37)</sup> bzw. Vorgehensweisen zur besseren Erfassung vorgeschädigter Keime verändert worden <sup>(40)</sup>. Während Bromkresolpurpur im Vergleich mit anderen Stoffen bei nicht geschädigten Keimen noch verhältnismäßig gut abgeschnitten hatte und deshalb als „weniger giftig“ bezeichnet wurde <sup>(37)</sup>, führt es beim Nachweis chlorungsgeschädigter E. coli-Bakterien nach beiden DEV-Methoden zu nicht optimalen Ergebnissen.

Da von anderen pH-Indikatoren keine besseren Ergebnisse zu erwarten waren <sup>(37)</sup>, wurde mit veränderten Konzentrationen des Bromkresolpurpur experimentiert. Die von den DEV vorgegebene Konzentration von 20 mg/l hatte eine beträchtliche Wachstumshemmung der eigentlich nachzuweisenden Keime bewirkt (s. o.), wohingegen die Angehraten bei 0 mg/l (z. B. in CSL) als das Optimum angesehen wurden. Entsprechend wurden Versuche mit dem Mittelwert von 10 mg/l durchgeführt. Diesen Anteil enthielt auch die „Neue Lactose-Bouillon für chlorungsgeschädigte Coliforme“ der Firma Merck, die sich im Bestand des Frankfurter Hygieneinstitutes befand. Die Resultate waren jedoch uneinheitlich. Bei einigen Stämmen war noch immer eine signifikante Wachstumshemmung zu beobachten, bei anderen überschritten sich die 95%-Vertrauensintervalle der Angehraten für die Prüf- und die Vergleichslösung. Erst bei einer weiteren Halbierung der Konzentration auf nunmehr 5 mg/l konnte bei keinem einzigen Stamm mehr ein signifikanter Unterschied zwischen den Angehraten in beiden Lösungen nachgewiesen werden. Oder anders ausgedrückt: bei einer Bromkresolpurpur-Konzentration von 5 mg/l kann die Nullhypothese, „keine signifikante Veränderung der Angehrate durch Bromkresolpurpur“, nicht mehr zurückgewiesen werden.

Aktuelle Untersuchungen konzentrieren sich immer mehr auf den qualitativen Nachweis von Keimen mittels molekularbiologischer Methoden. Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Bakteriophagen erlauben die Identifikation einzelner Stämme <sup>(21)</sup> oder die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sogar den Nachweis einer einzelnen Zelle, jedoch keine Aussage über ihre Vermehrungsfähigkeit und somit Pathogenität <sup>(45)</sup>. Dafür sind weitere bzw. kombinierte Tests nötig, die einen Anreicherungsschritt einschließen – nach PCR unmöglich. Wie bereits erwähnt, ist dieser Schritt für die Resuscitation von geschädigten Keimen von entscheidender Bedeutung <sup>(33)</sup> und die Verwendung von Selektionsmitteln, die eigentlich die Begleitflora unterdrücken sollen, oder anderen Zusätzen, z. B. pH-Indikatoren, für die nachzuweisenden Keime von Nachteil <sup>(9) (31)</sup>.

Abschließend lässt sich also über den Nachweis von E. coli-Bakterien sagen, dass dieser mit den derzeit vorgeschriebenen Deutschen Einheits-Verfahren zumindest für chlorungsvorgeschädigte Keime keine optimalen Ergebnisse liefert. Gerade bei der Trinkwasseruntersuchung, in dessen Rahmen ein Nachweis oder Nicht-Nachweis von E. coli in einer vorgegebenen Probenmenge (100 ml) über die Beurteilung „entspricht“ oder „entspricht nicht der Trinkwasserverordnung“ entscheidet, sollte die Test-Empfindlichkeit hoch genug sein, um eine Gefahr bzw. gefährliche Kontamination zuverlässig erkennen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

<sup>(1)</sup> Adámek, R.; Daubner, I.; Johnová, V.

Zur Problematik der mikrobiellen Indikation der Wasserqualität  
Zentralblatt für Hygiene, 189, S. 465 – 572  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1990

<sup>(2)</sup> Anonymus

Badegewässerüberwachung nach der Richtlinie des Rates der EG  
vom 08.12.1974 über die Qualität der Badegewässer  
Zentralblatt für Hygiene 192, S. 57 – 75  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991

<sup>(3)</sup> Anonymus

Hygienische Überwachung öffentlicher und gewerblicher Bäder  
durch die Gesundheitsämter (Amtsarzt)  
Bundesgesundheitsblatt 11/97, S. 435 – 438, 1997

<sup>(4)</sup> Anonymus

Wasser, Abwasser und Gesundheit  
Bundesgesundheitsblatt 12/89, S. 544 – 545, 1989

<sup>(5)</sup> Arana, I.; Santorum, P.; Muela, A.; Barcina, I.

Chlorination and ozonation of waste-water  
Journal of Applied Microbiology. 86(5): p. 883-888, 1999 May

<sup>(6)</sup> Bayliss, C. L.

Review of microbiological methods in the food industry  
MAFF Research Programme FS 12, 1999

<sup>(7)</sup> Beck, G.; Schmidt, P.

Hygiene und Umweltmedizin, 5. Auflage  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1994

<sup>(8)</sup> Berndt, H.; Linneweh, H. J.

Vergleichende quantitative Untersuchungen zur Bakterizidie von Chlordioxid und Chlor  
Archiv der Hygiene 153, 1, S. 41-46  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1969

<sup>(9)</sup> Blackburn, C. W.; McCarthy, J. D.

Modification to methods for the enumeration and  
detection of injured Escherichia coli O1157:H7 in foods  
International Journal of Food Microbiology 55, p. 285 – 290, 2000

<sup>(10)</sup> Boss, N.

Roche Lexikon Medizin; 3. Aufl.  
Urban & Schwarzenberg, München, 1993

<sup>(11)</sup> Brandis, H.; Köhler, W.; Eggers, H. J.; Pulverer, G

Medizinische Mikrobiologie, 7. Auflage  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994

<sup>(12)</sup> Bundesgesundheitsamt

Empfehlungen des BGA zur Richtlinie der EG  
über die Qualität der Badegewässer  
Bundesgesundheitsblatt 6/89, S. 259 – 260, 1989

<sup>(13)</sup> Bundesminister für Jugend, Familie und Gesundheit

Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe  
(Trinkwasserverordnung – TrinkwV)  
Bundesgesetzblatt Nr. 66, Anlage 1, S. 2620 – 2621, 1990

<sup>(14)</sup> Bundesseuchengesetz

<sup>(15)</sup> Carlson, S.; Hässelbarth, U.; Langer, R.

Abtötung aggregierter Keime bei der Wsserdesinfektion  
Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene 161, S. 233 – 247  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975

<sup>(16)</sup> Diem, K.

Documenta Geigy, 6. Auflage

Wissenschaftliche Tabellen, S. 98

J. R. Geigy AG, 1960

<sup>(17)</sup> Dott, W.; Frank, C.; Kämpfer, P.; Tuschewitzki G.; Wernicke, F.

Mikrobiologie des Grund und Trinkwassers

Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene 182, S. 449 – 477

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986

<sup>(18)</sup> Erdinger, L.; Kirsch, F.; Sonntag, H.

Irritierende Wirkung von Nebenprodukten der Schwimmbadwasserdesinfektion

Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 200, S. 491 – 503

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1997/98

<sup>(19)</sup> Erdinger, L.; Kirsch, F.; Sonntag, H.

Chlorate as an Inorganic Disinfectant By-Product in Swimming Pools

Journal for Hygiene and Environmental Medicine 202, p. 61 – 75, 1998/99

<sup>(20)</sup> Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker

in Gemeinschaft mit dem Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1999

<sup>(21)</sup> Fießl, H. S.; Middeke, M.

Anamnese und Klinische Untersuchung

Hippokrates-Verlag, Stuttgart, 1998

<sup>(22)</sup> Goodbridge, L.; Chen, C.; Griffiths, M.

The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of

Escherichia coli O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk

International Journal of Food Microbiology 47, p. 43 – 50, 1999

<sup>(23)</sup> Hahn, H; Falke, D.; Kaufmann, S. H. E.; Ullmann, U  
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie  
3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, 1999

<sup>(24)</sup> Harten, H.-U.; Nägerl, H.; Schulte, H.-D.  
Statik für Mediziner  
Chapman & Hall GmbH, Weinheim, 1994

<sup>(25)</sup> Höll, K.  
Wasser, 7. Auflage  
Walter der Gruyter-Verlag, Berlin, 1986

<sup>(26)</sup> Hof, H.; Müller, R. L.; Dörries, R.  
Mikrobiologie  
Thieme Verlag, Stuttgart,

<sup>(27)</sup> Klein, S.  
Bildung von Organhalogenverbindungen bei der Wasserchlorung  
Zeitschrift für die gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete, Jahrgang 36, Heft 10, S. 532 – 535  
Verlag Gesundheit GmbH, 1990

<sup>(28)</sup> Klinke, R.; Silbernagl, S.  
Lehrbuch der Physiologie  
Thieme Verlag, Stuttgart, 1994

<sup>(29)</sup> Linder, A.  
Statistische Methoden  
Birkhäuser Verlag, Basel, 1960

<sup>(30)</sup> López, J., M.; Szewzyk, R.  
Zur Überwachung von freien Badegewässern und  
zum Stand der Technik bei der Desinfektion von Schwimmbeckenwasser  
Bundesgesundheitsblatt 10/95, S. 377, 1995

- <sup>(31)</sup> Nakagawa, H. et al.  
Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells  
from foods by resuscitation prior to selective enrichment  
*International Journal of Food Microbiology* 60, p. 107 – 110, 2000
- <sup>(32)</sup> Oettinger, M.  
*Mikrobiologie und Immunologie*, 9. Auflage  
Gustav-Fischer-Verlag, 1997
- <sup>(33)</sup> Pérez, F.; Tryland, I.; Mascini, M.; Fiksdal, L.  
Rapid detection of *Escherichia coli* in Water by a culture-based amperometric method  
*Analytica Chimica Acta* 427, p. 149 – 154, 2001
- <sup>(34)</sup> Roßkamp, E.; Schimmelpfennig, W.  
Toxikologische Bewertung der Chloramine im Schwimm- und Badebeckenwasser  
*Bundesgesundheitsblatt*, 10, S. 378 – 380, 1995
- <sup>(35)</sup> Schubert, R. H. W.; Deutsch, E.  
Der Einfluss der Bebrütungstemperatur auf die Angehrate von *E. coli* in Flüssigkeitskultur  
*Archiv der Hygiene* 153, S. 205 – 210  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1969
- <sup>(36)</sup> Schubert, R. H. W.  
Zur Optimierung der Flüssigkeitsanreicherung von *E. coli* im Rahmen der Wasseruntersuchung  
*Archiv der Hygiene* 154, S. 500 – 508  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1971
- <sup>(37)</sup> Schubert, R. H. W.  
Vergleichende Untersuchungen über die Angehrate von *E. coli*  
in Selektionsmittel enthaltenden flüssigen Anreicherungsmedien  
*Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt. Orig. B* 156, S. 383 – 390  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1972

- <sup>(38)</sup> Schubert, R. H. W.; Helm, F.  
Zum Nachweis chlorungsvorgeschädigter *P. aeruginosa*-Bakterien aus dem Badewasser  
Umweltmedizin, 2, S. 29 – 30  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1984
- <sup>(39)</sup> Schubert, R. H. W.; Helm, F.  
Herstellung und Eigenschaften chlorungsvorgeschädigter *P. aeruginosa*-Suspensionen  
Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt. Orig. B 179, S. 449-456  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1984
- <sup>(40)</sup> Schubert, R. H. W.; Helm, F.  
Die Anzüchtung chlorungsvorgeschädigter *E. coli*-Bakterien  
mit dem Membranfilter-Verfahren  
Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt. Orig. B 181, S. 87 – 92  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1985
- <sup>(41)</sup> Schubert, R. H. W.; Helm, F.  
Ein verbessertes Laktose-Pepton-Medium zur Anzüchtung  
chlorungsvorgeschädigter *E. coli*-Bakterien  
Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, I. Abt. Orig. B 181, S. 93 – 97  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1985
- <sup>(42)</sup> Schubert, R. H. W.; Wahlig, M. Bornhofen, B.  
Nachweis von *E. coli* aus dem Wasser  
Bundesgesundheitsblatt 32, S. 267 – 270  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1989
- <sup>(43)</sup> Schubert, R. H. W.  
Quantitativer Nachweis von Krankheitserregern, Indikatorkeimen  
und Schadstoffen aus Umweltproben  
Bundesgesundheitsblatt 35, 2/92, S. 80 – 86  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992

<sup>(44)</sup> Schubert, R. H. W.; Oezbilen, D.  
Die Schwimm- und Badebeckenwasserkontrolle  
Hygiene und Medizin, Jahrgang 21, Heft 9, S. 478 – 482  
Göschl Verlag, Mainz, 1996

<sup>(45)</sup> Strachan, N. J. C.; Ogden, I. D.  
A sensitive microsphere coagulation ELISA for  
Escherichia coli O157:H7 using Russel's viper venom  
Microbiology Letters 186, p. 79 – 84, 2000  
Federation of European Microbiological Societies

<sup>(46)</sup> Wellhöner, H.-H.  
Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage  
Springer Verlag, Berlin, 1997

<sup>(47)</sup> Whitehead, J. E. M.  
The Bacteriological Examination of Drinking Water Supplies  
Her Majesty's Stationery Office, p. 9 – 10, 1982

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. H. W. Schubert danke ich für die Überlassung und die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Rosemarie Schmidt für die Einarbeitung in die mikrobiologischen Techniken und die stete, freundliche Hilfsbereitschaft bei allen Fragen sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Umweltmedizin für ihre bereitwillige Kooperation.

## 9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Quantitativer Nachweis chlorungsvorgeschädigter Escherichia coli**

in dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. R. H. W. Schubert selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

*Peter Kellmen*

Oberursel, 13.08.2001

## 10. Lebenslauf

Am 22.10.1972 wurde ich, Peter Kelemen, in Budapest als Sohn der Lehrerin Andrea Kelemen, geb. Szabó, und des Musikers József Kelemen geboren.

Im August 1978 kamen meine Eltern und ich nach Deutschland und wurden am 18.01.1984 eingebürgert. Seit diesem Tag besitze ich als einzige die deutsche Staatsangehörigkeit.

Vom August 1979 bis Juni 1983 besuchte ich die Grundschule (heute Geschwister-Scholl-Schule) in Steinbach am Taunus und anschließend, von August 1983 bis Mai 1992, das Lessing-Gymnasium in Frankfurt am Main, an dem ich am 25.05.1992 die Prüfung für die allgemeine Hochschulreife ablegte.

In der Zeit vom Mai 1992 bis Juli 1993 leistete ich meinen Zivildienst im Krankentransport und Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes – Kreisverband Hochtaunus e. V. und legte am 03.07.1993 die Prüfung zum Rettungssanitäter ab.

Vom Oktober 1993 bis Juni 1999 studierte ich Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main und legte am 18.06.1999 die zahnärztliche Prüfung ab. Am 19.06.1999 erhielt ich die Approbation als Zahnarzt.

Im August 1999 begann ich bei Herrn Professor Dr. med. R. H. W. Schubert im Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main den experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation.

Seit Oktober 1999 studiere ich Humanmedizin, ebenfalls an der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main.

*Peter Kelemen*

Oberursel, 13.08.2001