

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 91 (2000)
Heft: 1

Artikel: Biochemische Methoden zum Nachweis mikrobieller Parameter in Trinkwasser
Autor: Obst, Ursula
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981856>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 30.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Biochemische Methoden zum Nachweis mikrobieller Parameter in Trinkwasser*

Ursula Obst, Stadtwerke Mainz AG und WFM Wasserforschung Mainz GmbH, Mainz

Einleitung

Über den Kurzschluss Nahrung/Wasser/Fäkalien werden auch noch heute weltweit Krankheiten mit bakteriellen, viralen und parasitären Erregern übertragen. Die mikrobiologische Trinkwasserqualität stellt daher den Kern der hygienischen Trinkwasseruntersuchung dar. Operationelle Parameter wie Fäkalindikatoren mit langjährig erprobter Relevanz bilden die Grundlage und das Minimalprogramm für die mikrobiologische Kontrolle festgelegter Standards und Grenzwerte. Die in den einzelnen Ländern üblichen gesetzlichen Regelungen stützen sich auf allgemein verbindliche und anerkannte Richtlinien. In der deutschen Trinkwasserverordnung (1) wie auch in vielen anderen nationalen Verordnungen sind neben den Grenz- und Richtwerten auch die Untersuchungsmethoden für mikrobiologische Parameter explizit festgelegt. Dies steht im Gegensatz zu den Methoden für chemische Parameter, die sich innerhalb eines vorgegebenen Rahmens nach dem Stand der Wissenschaft und Technik richten können.

Die klassischen mikrobiologischen Kulturverfahren, wie sie in den Verordnungen vorgeschrieben sind, haben den hohen hygienischen Qualitätsstandard des Trinkwassers in westlichen Ländern erst ermöglicht. Allerdings ist die mehrtägige Wartezeit aufgrund des Wachstums und der spezifischen Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen ein erheblicher Nachteil. Hinzu kommt eine gewisse taxonomische Unschärfe der historisch etablierten Methoden, die von der physiologisch schwachen oder veränderten Reaktion der Bakterien im Mangelmedium Trinkwasser herrührt (2). Argumente, dass ein nach Stand der Technik aufbereitetes und verteiltes Trinkwasser als bakteriologisch einwandfrei gilt, zählen nicht mehr, wenn es um Sonder- oder Notfälle geht. Plötzlich auftretende Rohwasserkontaminationen, Defekte bei der Trinkwasseraufbereitung oder -desinfektion, Baumassnahmen oder

* Vortrag gehalten an der 32. Arbeitstagung der Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittelhygiene, Zürich, 18. November 1999

Rohrbrüche sind Ereignisse, die auch bei modernen Wasserversorgungen nicht selten auftreten. Die relativ undurchschaubaren und langen Wegstrecken bei der Wasser- verteilung mit ihren material- und situationsbedingten Schwachstellen können mit konventionellen Methoden ebenfalls nicht in befriedigender Weise kontrolliert werden. Ein schwerwiegendes Hindernis bei der Lösung dieser Probleme ist die Fest- schreibung der konventionellen Untersuchungsmethoden in den Verordnungen, wo- durch eine volle Ausschöpfung des modernen Methodenpotentials verhindert wird.

Trotz dieser Einschränkungen wurden in der Vergangenheit immer wieder alternative Verfahren entwickelt, um vor allem den Zeitaufwand zu verkürzen. In neuerer Zeit werden vermehrt biochemische Analysenverfahren eingesetzt, die hochspezifische Kopplungsreaktionen zwischen bakteriellen Bestandteilen und biologischen Bindemolekülen nutzen, wie z.B. immunologische und molekular- genetische Verfahren. Die Übertragung solcher, in der medizinischen Diagnostik bewährten Methoden auf Probenmatrices wie Trinkwasser bereitet jedoch auch etliche Schwierigkeiten. Immunologische Nachweisverfahren haben z.B. eine Nachweisempfindlichkeit von 10^4 bis 10^5 Bakterienzellen pro ml. Diese Sensitivität ist für medizinisch-mikrobiologische Zwecke meist ausreichend, für Trinkwasser (z.B. 1 *E. coli*-Zelle pro 100 ml) jedoch um den Faktor 10^6 bis 10^7 zu unempfind- lich. Wie praktische Erfahrungen zeigen, reichen auch bei molekulargenetischen Verfahren die Nachweisgrenzen trotz Amplifikation mit Polymerase-Kettenreak- tion (PCR) nicht aus, um die für Trinkwasser notwendigen Schwellenwerte zu erreichen. Das bedeutet, dass auch bei biochemischen Verfahren kulturelle An- reicherungsverfahren – wenn auch zeitlich stark verkürzt – eingesetzt werden müssen, die die angestrebte Verkürzung des Zeitaufwands auf nur einen Arbeitstag erschweren (Abb. 1).

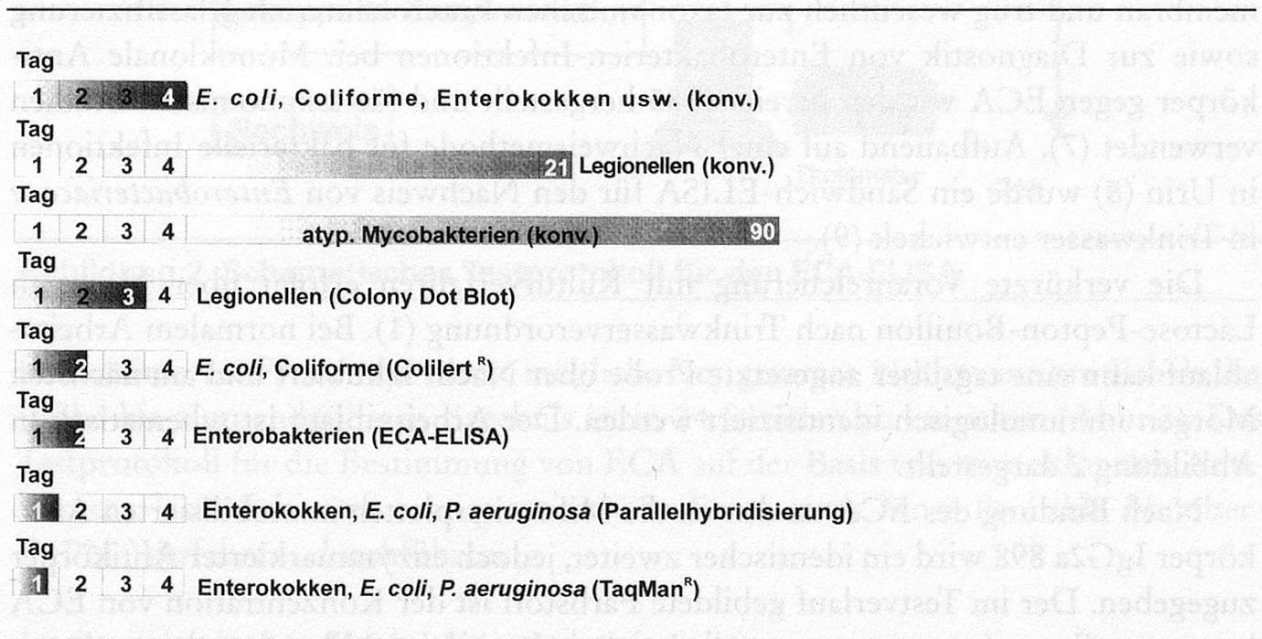


Abbildung 1 **Zeitaufwand verschiedener Nachweisverfahren für Trinkwasserbakterien** (grauer Bereich entspricht erforderlichem maximalen Zeitaufwand)

Diese zeitverkürzte Voranreicherung birgt jedoch den Vorteil in sich, dass ausschliesslich lebensfähige Zellen nachgewiesen werden. Damit kann der oft zitierte Einwand, dass biochemische Verfahren auch Zellbestandteile toter Bakterien nachweisen, entkräftet werden. In den letzten Jahren ist es gelungen, einige der auf immunologischer und molekulargenetischer Basis entwickelten Methoden so zu konzipieren, dass sie für die praktische Anwendung bedeutende Vorteile erzielen. Im Folgenden sind Beispiele für solche Methoden sowie für deren Anwendung in der Praxis aufgeführt.

Beispiele für immunologische und molekulargenetische Methoden

Im Folgenden werden zwei immunologische und zwei molekulargenetische Verfahren beschrieben, die auf die Probenmatrix Trinkwasser zugeschnitten wurden und mit denen in der Wasserversorgung bereits praktische Erfahrungen gewonnen wurden.

Immunologischer Nachweis von Enterobacteriaceae

E. coli und coliforme Bakterien gelten nach der festgeschriebenen Konvention als Indikatoren für fäkale Kontamination und pathogene Enterobakterien. Seit dem Aufkommen praktikabler Nachweisverfahren wird immer wieder der Nachweis von Enterobakterien inklusive pathogener Vertreter anstelle von Indikatoren diskutiert (3–5).

Der immunologische Nachweis von *Enterobacteriaceae* wird dadurch erleichtert, dass alle Vertreter dieser Familie ein gemeinsames antigenes Glycophospholipid mit repetierenden Untereinheiten, das sogenannte Enterobacterial Common Antigen (ECA), aufweisen (6). ECA ist ein Bestandteil der äusseren Bakterienmembran und trug wesentlich zur taxonomischen Enterobakterien-Klassifizierung sowie zur Diagnostik von Enterobakterien-Infektionen bei. Monoklonale Antikörper gegen ECA wurden bereits 1985 hergestellt und für taxonomische Studien verwendet (7). Aufbauend auf einer Nachweismethode für bakterielle Infektionen in Urin (8) wurde ein Sandwich-ELISA für den Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Trinkwasser entwickelt (9).

Die verkürzte Voranreicherung mit Kulturverfahren erfolgt über Nacht in Lactose-Pepton-Bouillon nach Trinkwasserverordnung (1). Bei normalem Arbeitsablauf kann eine tagsüber angesetzte Probe über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen immunologisch identifiziert werden. Der Arbeitsablauf ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Nach Bindung des ECA an den an die Mikrotiterplatten immobilisierten Antikörper IgG2a 898 wird ein identischer zweiter, jedoch enzymmarkierter Antikörper zugegeben. Der im Testverlauf gebildete Farbstoff ist der Konzentration von ECA bzw. von *Enterobacteriaceae* proportional und wird im Mikrotiterplattenphotometer vermessen. Jeder immunologische Nachweis von Enterobakterien wird von Negativ- und Positivstandards begleitet. Eine klare Einordnung auch schwach

ECA-ELISA-System[®] zum Nachweis des Enterobacterial Common Antigen

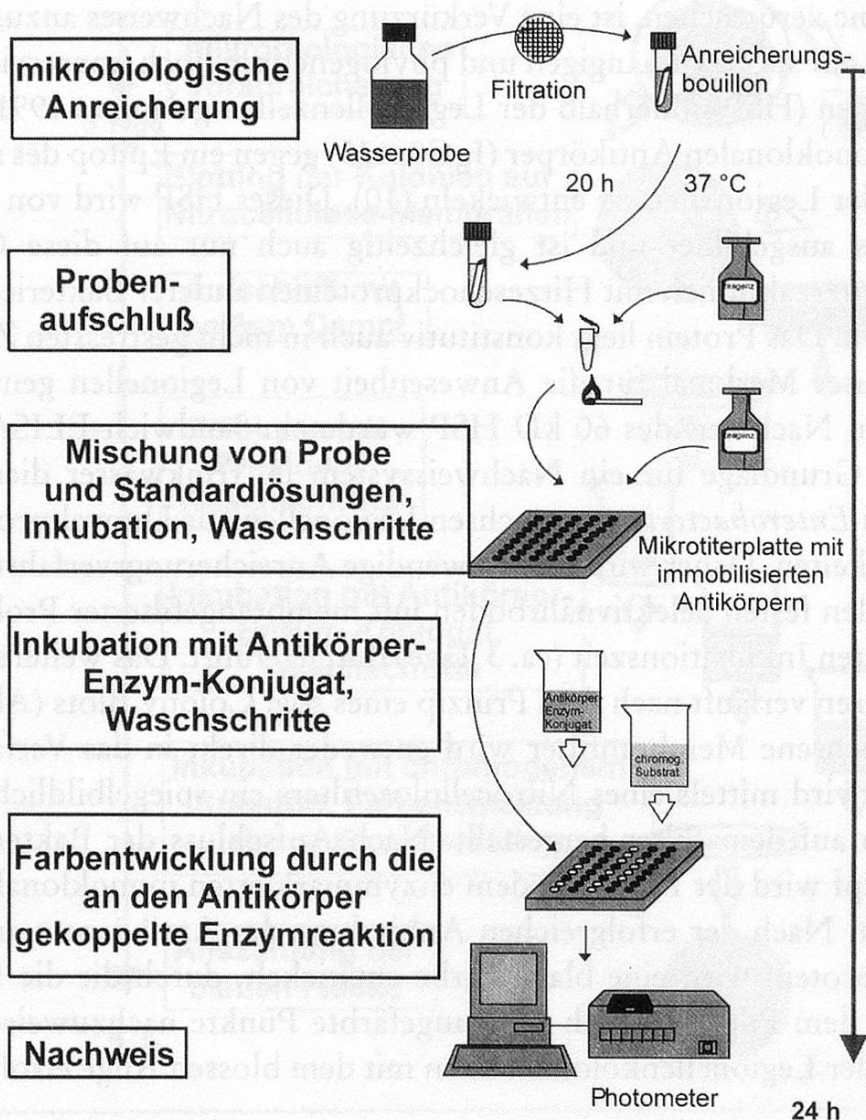


Abbildung 2 Schematisches Testprotokoll für den ECA-ELISA

kontaminierter Proben ist damit möglich. Der gesamte Nachweis vom Erhalt der Probe bis zum endgültigen Ergebnis ist in 24 Stunden zu erreichen (Abb. 2). Das Testprotokoll für die Bestimmung von ECA auf der Basis von monoklonalen Antikörpern lässt sich auch semiquantitativ in Form eines Most Probable Number-(MPN-)Verfahrens durchführen.

Immunologischer Nachweis von Legionellen

Legionellen können wie andere aquatische Bakterien in sehr geringer Anzahl vom Rohwasser über die Aufbereitung in das Verteilungsnetz und die häusliche

Installation gelangen, wo sie optimale Vermehrungsbedingungen vorfinden können. Bei den meisten Legionellenspecies wurde Humanpathogenität nachgewiesen. Da Legionellen hohe Ansprüche an die Kulturbedingungen stellen, ist ein mehrwöchiger Analysenaufwand mit Kulturverfahren und serologischer Identifizierung die Regel. Da Legionellen gerade in Risikobereichen (Krankenhäuser, Pflegeheime usw.) Probleme verursachen, ist eine Verkürzung des Nachweises anzustreben.

Basierend auf speciesabhängigen und phylogenetisch hoch konservierten Hitzeschockproteinen (HSP) innerhalb der Legionellenzellen gelang es 1991 zum ersten Mal, einen monoklonalen Antikörper (IgG2a125) gegen ein Epitop des sogenannten 60 kD HSP der Legionellen zu entwickeln (10). Dieses HSP wird von allen Legionellen-Species ausgebildet und ist gleichzeitig auch nur auf diese Gattung beschränkt. Kreuzreaktionen mit Hitzeschockproteinen anderer Bakterien sind daher ausgeschlossen. Das Protein liegt konstitutiv auch in nicht gestressten Zellen vor, so dass es als gutes Merkmal für die Anwesenheit von Legionellen genutzt werden kann. Für den Nachweis des 60 kD HSP wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt (11), der als Grundlage für ein Nachweissystem in Trinkwasser diente (12). Im Gegensatz zu *Enterobacteriaceae* wachsen Legionellen aus Umweltproben nicht in Kulturflüssigkeiten. Daher wird das notwendige Anreicherungsverfahren auf einem konventionellen festen Selektivnährboden mit membrangefilterter Probe und einer stark verkürzten Inkubationszeit (ca. 3 Tage) durchgeführt. Das weitere immunologische Verfahren verläuft nach dem Prinzip eines sog. Colony Blots (Abb. 3).

Der bewachsene Membranfilter wird entweder direkt in das Verfahren eingesetzt oder es wird mittels eines Nitrocellulosefilters ein spiegelbildlicher Abdruck der Kolonien auf dem Filter hergestellt. Nach Aufschluss der Bakterienzellen in heissem Dampf wird der Filter mit dem enzymmarkierten monoklonalen Antikörper behandelt. Nach der erfolgreichen Anbindung des Antikörpers an das 60 kD Hitzeschockprotein wird eine blaue Farbe entwickelt, durch die die Legionellenkolonien auf dem Filter deutlich als blaugefärbte Punkte nachzuweisen sind. Die Auszählung der Legionellenkolonien kann mit dem blossen Auge erfolgen.

Molekulargenetischer Nachweis von Trinkwasserbakterien am Beispiel von Enterokokken

Enterokokken unterscheiden sich als Fäkalindikatoren in Trinkwasser vor allem durch ihre höhere Resistenz gegen Desinfektionsmittel von *E. coli* und coliformen Bakterien. Ein Grenzwert für Enterokokken ist seit 1990 Bestandteil der deutschen Trinkwasserverordnung (1) und auch in anderen Ländern wie der Schweiz seit längerem Bestandteil der hygienischen Regularien. Der Zeitaufwand für den konventionellen Enterokokken-Nachweis ist in etwa derselbe wie für den Nachweis von *E. coli*. Die Entwicklung eines zeitverkürzten und spezifischeren Verfahrens bietet sich auch hier an.

Betzl et al. (13) entwickelten Sonden, die gegen 23S rRNA gerichtet waren, um Lactokokken und Enterokokken zu identifizieren und zu unterscheiden. Die

Colony Blot zum Nachweis des Legionellen-spezifischen 60 kD-Hitzeschock-Proteins

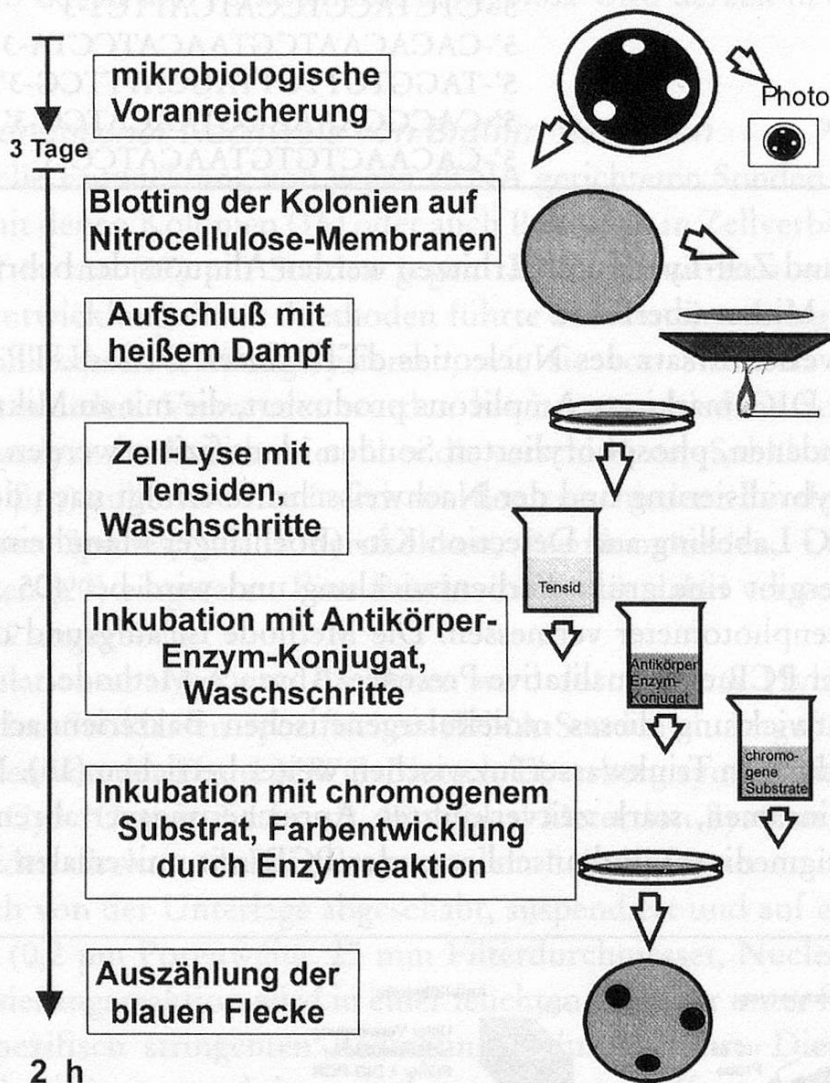


Abbildung 3 Schema der Durchführung des Legionellen-Colony Dot Blots

Basensequenzen dieser Sonden waren die Grundlage für weitere Arbeiten von *Frahm et al.* (14), die enterokokkenspezifische Sonden für ein Nachweissystem von fäkalen Enterokokken im Wasser entwickelten. In Tabelle 1 sind die Basensequenzen der DNA-Sonden gegen gruppen- und speciesspezifische Zielsequenzen in der 23S rRNA angegeben.

Die Anreicherung der Enterokokken aus Trinkwasser erfolgt über eine zeitverkürzte Vorkultur sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als erster Anreicherungsschritt werden 100 ml Wasserprobe in 100 ml doppelt konzentrierte Chromocult®-Enterococcus-Bouillon (Merck, Darmstadt) gegeben und über Nacht (mindestens 16 h) bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert (Abb. 4). Nach Zentrifugation, Waschen,

Tabelle 1

Beispielhafte Oligonucleotid-Sequenzen für den Nachweis von Enterokokken in Wasser (14)

Zielorganismus	Oligonucleotidsequenz
<i>Enterococci</i>	5'-CTCTACCTCCATCATTTCT-3'
<i>E. faecium</i>	5'-CACACAATCGTAACATCCTA-3'
<i>E. faecalis</i>	5'-TAGGTGTTGTTAGCATTTCG-3'
<i>E. durans/E. hirae</i>	5'-CACGCAAAACGTAACATCC-3'
<i>E. gallinarum</i>	5'-CACAACGTGTGAACATCC-3'

Resuspension und Zell-Lyse durch Erhitzen werden Aliquots der bebrüteten Bouillon in die PCR-Mixtur überführt.

Durch teilweisen Ersatz des Nucleotids dTTP durch DIG-dUTP in der PCR-Mixtur werden DIG-markierte Amplicons produziert, die mit an Mikrotiterplatten kovalent gebundenen, phosphorylierten Sonden identifiziert werden. Die Durchführung der Hybridisierung und der Nachweisschritte erfolgt nach der Laborvorschrift des «DIG Labelling and Detection Kit» (Boehringer Mannheim). Eine positive Reaktion ergibt eine grüne Farbentwicklung und wird bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer vermessen. Die Methode ist aufgrund der Voranreicherung und der PCR eine qualitative Presence/Absence-Methode.

Die Fortentwicklung dieses molekulargenetischen Bakteriennachweises wird für die Anwendung in Trinkwasser inzwischen weiter betrieben (15). Dazu werden in einem gemeinsamen, stark zeitverkürzten Anreicherungsverfahren (Kulturverfahren in Flüssigmedium) und anschließender PCR mit universalen Eubakterien-

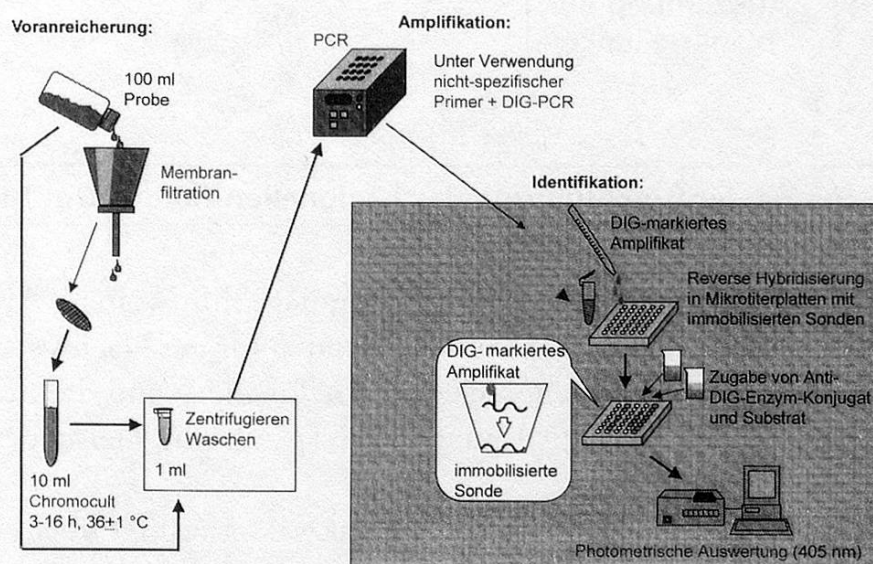


Abbildung 4 Testschema für den molekulargenetischen Nachweis von Enterokokken aus Trinkwasser

Primern Nucleinsäuren aus lebensfähigen Trinkwasserbakterien angereichert. Die amplifizierten Nucleinsäuren werden anschliessend in Mikrotiterplatten mit für hygienisch relevante Species selektiven rDNA-Sonden identifiziert. Dieses Testprotokoll ist für den Nachweis von Enterokokken bereits optimiert. Der parallele Nachweis von *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* wird derzeit in das Testschema eingepasst.

Molekulargenetischer Nachweis von Biofilm-Bakterien

Die schnelle Entwicklung von gegen rRNA gerichteten Sonden führte auch zu Techniken, mit denen Kolonien (16) oder auch Bakterien in Zellverbänden und Biofilmen direkt *in situ* (17) mit Sonden gegen rRNA identifiziert werden konnten. Eine Weiterentwicklung dieser Methoden führte zur Untersuchung von Biofilmen direkt in Trinkwasserverteilungssystemen, wie sie von Schwartz et al. (18, 19) durchgeführt wurden. Verwendet wurden hierbei verschiedene Sonden, die eine Populationsanalyse der Eubakterien über die verschiedenen Subklassen der Proteobakterien (α , β , γ) zulassen. Zusätzlich wurden verschiedene Sonden gegen hygienisch relevante Species, wie Enterokokken, Pseudomonaden, Legionellen und Mycobakterien (20) eingesetzt. Eine Beschreibung der dabei verwendeten Sonden ist in Tabelle 2 angegeben.

Die Populationsanalytik von Biofilmen wird durch *in situ* Hybridisierung mit Proteobakterien-Subklassen-spezifischen-rDNA-Sonden durchgeführt. Die Gensonden wurden von der Firma MWG-Biotech/Ebersberg synthetisiert und sind am 5'-Ende mit Cy3 (Cyanin-Farbstoff, Biological Detection Systems) markiert. Die Biofilme werden direkt nach Entnahme aus dem Leitungssystem mit 50 % Ethanol fixiert, danach von der Unterlage abgeschabt, suspendiert und auf eine Polycarbonatmembran (0,2 μ m Porenweite, 25 mm Filterdurchmesser, Nucleopore) filtriert. Die Hybridisierungsreaktion wird in einer feuchten Kammer unter für die jeweilige Gensonde spezifisch stringenten Bedingungen durchgeführt. Die Filter werden nach der Hybridisierungsreaktion mit dem jeweiligen Puffer gewaschen, um nicht gebundene Oligonucleotide und unspezifisch angelagerte Gensonden zu entfernen.

Tabelle 2

Sonden zur Hybridisierung von Biofilm-Mikroorganismen im Trinkwasserbereich (Y = C/T)

Zielbakterien	Oligonucleotidsequenz	Zielmolekül	Literatur
β -Proteobacteria	5'-GCCTTCCCACCTTCGTTT-3'	23 S rRNA	27
γ -Proteobacteria	5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'	23 S rRNA	27
α -Proteobacteria	5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'	16 S rRNA	27
<i>Pseudomonas</i> spp.	5'-GCTGGCCTAGCCTTC-3'	23 S rRNA	28
<i>P. putida/mendocina</i>	5'-GCTGGCCTAACCTC-3'	23 S rRNA	28
<i>Legionella</i> spp.	5'-CTGGTGTTCCCTCCGATC-3'	16 S rRNA	28
<i>Enterococcus faecalis</i>	5'-TAGGTGTTGTTAGCATTTTCG-3'	23 S rRNA	14
<i>Mycobacterium</i> spp.	5'-CCACCTACCGTCAATC-3'	16 S rRNA	20

Die Filter mit den fixierten Bakterien werden nach der Hybridisierung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gegengefärbt, getrocknet und in der Antifading-Reagenz Citifluor (Citifluor Ltd., London, UK) für die Fluoreszenzmikroskopie eingebettet.

Für den Nachweis von Pathogenen und fakultativ Pathogenen wie fäkalen Enterokokken, atypischen Mycobakterien und Legionellen werden die Biofilme ebenfalls von der Oberfläche ihres Aufwuchskörpers abgeschabt und in autochthonem Wasser suspendiert. Aliquots der Proben werden zentrifugiert, der Rückstand gewaschen, erneut zentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Für die PCR werden zwei Primerkombinationen für eine unspezifische Amplifikation der 23S oder 16S rRNA-bezogenen DNA-Abschnitte der Eubacteria sowie das Expand™ PCR-System (Boehringer Mannheim) verwendet. Aliquots der amplifizierten DNA-Fragmente werden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt, um PCR und DNA-Fragmentgröße zu kontrollieren. Die DNA wird im Blotverfahren auf eine Nylonmembran (Qiagen, Hilton) übertragen und danach mit der entsprechenden Digoxigenin-(DIG-)Oligonucleotid-Sonde hybridisiert. Nach Inkubation mit Anti-DIG-AP-Konjugat und Chemilumineszenz-Reaktion mit CSPD (Di-sodium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethane 3,2'-(5'-chloro)tricyclo-[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)phenylphosphat erfolgt die Detektion auf Röntgenfilmen.

Praktische Erfahrungen in der Anwendung biochemischer Methoden

Für den schnelleren und präziseren Nachweis von Mikroorganismen zur hygienischen Qualitätskontrolle wurde bereits eine ganze Reihe von Methoden entwickelt. Allerdings wurden diese Methoden selten in der Praxis validiert oder über einen längeren Zeitraum angewandt. Die beschriebenen Immunoassays wurden ausgiebig auch mit externen Labors validiert und danach in das Routineprogramm im Bakteriologischen Labor der Stadtwerke Mainz AG übernommen. Auch die molekulargenetische Untersuchung von Biofilmen wird bereits seit drei Jahren im Wasserverteilungsnetz der Stadtwerke Mainz AG eingesetzt. Im Folgenden sind einige Erfahrungsbeispiele aus der praktischen Anwendung dieser Methoden aufgeführt.

Validierung der immunologischen Methoden während der Routineanwendung

Das ECA-ELISA-Verfahren wurde durch mehrere Labors in Deutschland mit etwa 2000 Proben im Vergleich zur Methode nach Trinkwasserverordnung (1) validiert (21). Die statistische Berechnung von Sensitivität und Spezifität des Verfahrens erfolgte nach Hennekens (22). Danach ergaben sich für die zweite Screeningphase, die nach Einarbeitung und Training der beteiligten Labors durchgeführt wurde, folgende, in Tabelle 3 dargestellte Ergebnisse.

Während der Anwendung im Routinelabor der Stadtwerke Mainz AG wurde der ECA-ELISA erneut intern mit der Methode nach Trinkwasserverordnung (1)

Tabelle 3

Sensitivität und Spezifität des ECA-ELISA im Vergleich zur Methode nach TrinkwV

(U = Gesamtumfang der Stichproben, P = Positive nach TrinkwV, N = Negative nach TrinkwV, p = Positive mit ELISA, n = Negative mit ELISA, pP; pN; nP; NN = entsprechende Schnittmengen beider Methoden, Sensitivität = pP/P , Spezifität = nN/N)

U	P	N	p	n
886	188	698	194	692
Übereinstimmung:	pP (beide Verfahren positiv) 165		nN (beide Verfahren negativ) 669	
Nicht-Übereinstimmung:	nP (ELISA neg., TrinkwV pos.) 23		pN (ELISA pos., TrinkwV neg.) 29	
	Sensitivität = 87,8 %		Spezifität = 95,9 %	

Tabelle 4

Vergleich des ECA-ELISA mit der Methode nach TrinkwV

Methode	Probenanzahl	Übereinstimmung
ECA-ELISA negativ	22	
Methode nach TrinkwV negativ	31	71 %
ECA-ELISA positiv	14	
Methode nach TrinkwV positiv	3	21 %
ECA-ELISA unbestimmt	18	
Methode nach TrinkwV unbestimmt	21	86 %

und anderen Methoden zum Nachweis von Coliformen und *E. coli* (z.B. Colilert®) verglichen. Der ECA-ELISA erbrachte wegen des Nachweises von Enterobakterien und der höheren Empfindlichkeit mehr positive Ergebnisse als die konventionelle Methodik (Tabelle 4).

Die Ergebnisse erwiesen sich bei der Überprüfung als korrekt. Die vergleichsweise hohe Anzahl an unbestimmten Befunden auch beim ECA-ELISA sind möglicherweise auf Anfangsschwierigkeiten im Umgang mit dem Test zurückzuführen. Es könnte sich allerdings auch um stark geschädigte Zellen handeln, bei denen das Proteinmuster gestört war, da auch bei der konventionellen Methode ein ähnlich hoher Prozentsatz an unbestimmten Befunden vorlag.

Das schnelle, einfache und quantifizierende Verfahren zum Nachweis von Legionellen wurde von mehreren Labors in Deutschland erfolgreich validiert (23). Bei der Untersuchung von 310 Proben wurde bei einem durchschnittlichen Zeitaufwand von drei bis fünf Tagen im Vergleich mit der Methode nach ISO/TC 147, SC 4 1992 100 % Übereinstimmung erzielt. Das Verfahren wurde zudem in einer 2-jährigen Studie in Wasserwerken, dem Verteilungsnetz sowie in Hausinstallationen im Versorgungsbereich der Stadtwerke Mainz AG erprobt und mit anderen Verfahren verglichen (24). Es erwies sich in der Praxis als gut durchführbar und zuverlässig. Als besonderer Vorteil für die Bewertung von Kontaminationen erwies

sich die Möglichkeit zur Quantifizierung der Ergebnisse. Das Verfahren wird seit mehreren Jahren in der mikrobiologischen Qualitätskontrolle bei den Stadtwerken Mainz AG eingesetzt.

Sanierung von Rohrleitungen

Die Stadtwerke Mainz AG sanieren Rohrleitungen nach einem 24- bis 28-Stundenschema (Abb. 5). Dabei kann auf hygienisch bedenkliche Ersatzleitungen verzichtet und es können erhebliche Kosten eingespart werden. Reinigung (Molchung)

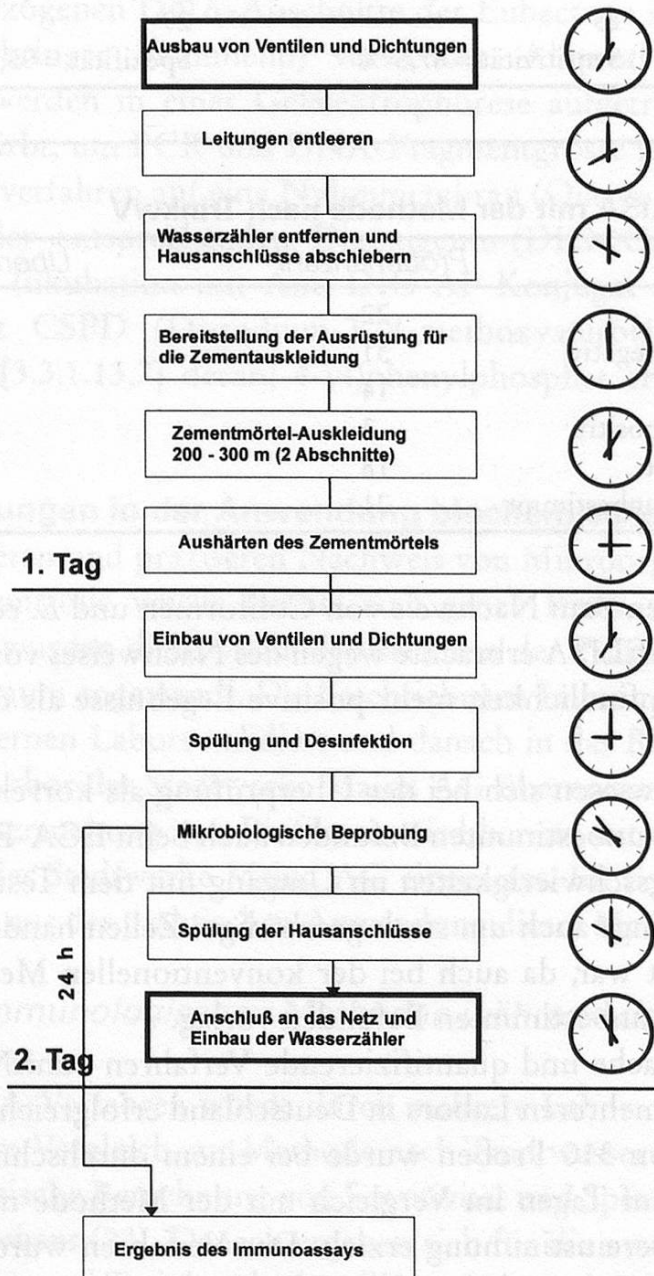


Abbildung 5 **Ablauf einer Leitungssanierung (Zementmörtelauskleidung) bei den Stadtwerken Mainz AG**

und Auskleidung (Zementmörtel) laufen nach einem ähnlichen Schema ab: nach der Trennung der Leitung vom Netz wird innerhalb von 1 bis 1,5 Tagen die Baumassnahme durchgeführt und Desinfektion und Spülung vorgenommen.

Alle beteiligten Materialien und Einbauteile werden zuvor auf eventuelle mikrobielle Abbaubarkeit überprüft und gesondert desinfiziert. Die Desinfektion erfolgt wegen des vergleichsweise hohen pH-Werts der Zementmörtelauskleidung mit Kaliumpermanganat (25). Danach wird die hygienische Kontrollprobe entnommen und mit dem ECA-ELISA innerhalb von 24 h überprüft. Voraussetzung für die Zustimmung der Überwachungsbehörde war neben sehr sorgfältigem Arbeiten vor Ort der Einsatz des zeitgünstigen und zuverlässigen Immunoassays.

Schadensfall Wasserwerk

Bei der monatlichen bakteriologischen Kontrolle des Wasserverteilungssystems der Stadtwerke Mainz AG wurde eine Coliformenkontamination entdeckt. Das betroffene Wasser stammte aus einem Wasserwerk, bei dem das aufbereitete Grundwasser wegen seiner guten hygienischen Qualität nicht desinfiziert werden musste. Die Desinfektion mit Chlor wurde sofort in Betrieb genommen, doch sollte auf jeden Fall die Quelle der Kontamination festgestellt werden. Mit der Methode nach TrinkwV konnten keinerlei Coliforme mehr im Wasserwerk und Rohwasser gefunden werden. Mit dem ECA-ELISA wurden jedoch einige Kontaminationspunkte im Wasserwerk identifiziert. Selbst nach der Chlordesinfektionsstufe konnte noch ein schwaches ECA-Signal festgestellt werden, was auf eine stärkere Kontamination hinwies. Die Kontamination konnte schrittweise über die Zwischenpumpen und die Enteisung bis in das Rohwasser einer bestimmten Heberleitung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser eingrenzenden Hinweise wurde eine illegale Toilette bei einer Stromumspannungsstation gefunden, die die Quelle der fäkalen Kontamination eines Brunnens war.

Desinfektionskontrolle

Auch bei der Desinfektionskontrolle können biochemische Methoden erfolgreich eingesetzt werden. Im Auftrag des örtlichen Gesundheitsamts untersuchten wir die optimale Desinfektionsdauer bei massiven fäkalen Verunreinigungen in Schwimmbecken. Üblicherweise wird in einem solchen Fall unter erheblichem Kosten- und Zeitaufwand das gesamte Becken entleert, gereinigt und frisch gefüllt. In einem Versuch, den wir nach Abschluss der Badesaison durchführten, setzten wir nach Unterbrechung der Desinfektion in ein Schwimmbecken an mehreren Stellen mit *E. coli* K 12 getränkte Schwämmchen aus (10^9 Zellen/ml). Nach 30 min wurde die Chlorung erneut angestellt. Wir beprobten das Badewasser über mehrere Stunden hinweg. Bereits nach drei Stunden war nur noch eine leichte Kontamination festzustellen, die nach sechs Stunden endgültig verschwunden war. Wegen seiner Empfindlichkeit wurde der ECA-ELISA eingesetzt, da mit der Methode nach Trinkwasserverordnung (1) nach Anstellen der Desinfektion überhaupt kein *E. coli*

mehr detektierbar war. Fäkal verunreinigte Badebecken werden nun gesäubert und sechs Stunden hochgechlort. Der Desinfektionserfolg wird mit dem ECA-ELISA überprüft.

Die Überprüfung von UV-Desinfektionsanlagen stellt an die mikrobiologische Überwachung besondere Ansprüche. Bei der Umstellung der Desinfektion von Chlordioxid auf UV-Strahlung in einem Uferfiltratwasserwerk konnte mit der konventionellen Untersuchungsmethodik kein Unterschied bei der bakteriologischen Qualität des desinfizierten Trinkwassers festgestellt werden. Bei der molekulargenetischen Untersuchung von Biofilmen im nachgeschalteten Verteilungsbereich wurden jedoch über einen längeren Zeitraum lebensfähige Enterokokken nachgewiesen. Offenbar können Mikroorganismen aufgrund ihrer spezifischen Reparatursysteme UV-Desinfektionsmassnahmen besser kompensieren als entsprechende chemische Massnahmen. Ein modifiziertes Kontrollverfahren von UV-Desinfektionseinrichtungen sollte daher unbedingt angedacht werden.

Detektion von Biofilm-Bakterien im Rohrnetz

Um Einflüsse im Verteilungssystem auf mikrobielle Biofilme direkt untersuchen zu können, wurden an Wasserzählern in Hausinstallationen sowie in Wasserwerken Einbauteile (modifizierte Robbin's Devices) aus Edelstahl eingebaut (26). In die Einbauteile konnten bis zu 15 Coupons aus unterschiedlichen, in der Wasserversorgung üblicherweise verwendeten Materialien eingebracht werden. Getestet wurde das Biofilm-Wachstum auf PE-HD, PVC-HD, Kupfer und V4A-Stahl. Für die in der Wasserversorgung zunehmend verwendete Zementmörtel-Auskleidung mussten gesonderte Rohrstücke (Fa. Halberg, Saarbrücken) eingesetzt werden.

Mit den molekulargenetischen Verfahren konnte direkt in realen Trinkwasserleitungssystemen die Abhängigkeit der Biofilmmzusammensetzung und Vitalität der Mikroorganismen von Rohrmaterial und von der Wasserqualität nachgewiesen werden (18, 19). Der Einfluss von Rohrmaterialien manifestierte sich nur vorübergehend in sehr jungen Biofilmen. Kunststoff wie PE-HD beschleunigte die Besiedlung in den ersten Wochen; nach mehreren Monaten hatte sich die Besiedlungsdichte und die Vitalität der Populationen auf Metalleitungen denen der Kunststoffleitungen angeglichen. Einen deutlicheren Einfluss hatte die unterschiedliche Herkunft der Trinkwässer. In Tabelle 5 ist der prozentuale Anteil verschiedener Proteobakterien-Subklassen in Hausanschlüssen (Testcoupons aus PE-HD) eines Grundwasserwerks und eines Uferfiltratwasserwerks aufgeführt.

Der Anteil der γ -Subklasse, zu der eine Reihe von Pathogenen und fakultativ Pathogenen in Wasser gehört, ist beim Uferfiltratwasserwerk signifikant erhöht. Der Anteil der β -Subklasse, zu der der Hauptteil der «autochthonen» Trinkwassermikroflora gehört, ist bei dem Grundwasserwerk am höchsten. Der Grund hierfür dürfte der erhöhte Anteil mikrobiell verwertbarer organischer Kohlenstoffverbindungen sein, der jedoch mit klassischen Wiederverkeimungsuntersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 5

Verteilung der *Proteobacteria*-Subklassen in Biofilmen verschiedener Trinkwässer

Methode	Uferfiltrat			Grundwasser		
	PE-HD	PVC	Stahl	PE-HD	PVC	Stahl
Gesamtzellzahl (DAPI)	$6,9 \cdot 10^5$ $\pm 0,8 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$ $\pm 0,8 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$ $\pm 0,4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$ $\pm 0,2 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^6$ $\pm 0,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$ $\pm 0,1 \cdot 10^6$
<i>in situ</i> -Hybridisierung (in % der Gesamtzellzahl)						
α -Subklasse	<10 %	18 %	23 %	<10 %	<10 %	<10 %
β -Subklasse	34 %	33 %	42 %	45 %	52 %	42 %
γ -Subklasse	28 %	25 %	27 %	<10 %	15 %	<10 %

Zudem war es erstmals möglich, in der Praxis nachzuweisen, inwieweit Biofilme im Trinkwasserverteilungssystem ein Reservoir für fakultativ pathogene und pathogene Mikroorganismen darstellen können. Während es in vorangegangenen Arbeiten (24) nicht gelungen war, die Herkunft von Legionellen im Warmwasserbereich von Haushalten in einer mittleren deutschen Grossstadt über Untersuchungen des Kaltwasserverteilungssystem zu verfolgen, wurde nun ein Reservoir an Legionellen in den Biofilmen an den Rohrleitungswänden festgestellt. Ausserdem wurde erstmals ein schnelles und präzises Nachweissystem für atypische Mycobakterien (20) entwickelt und angewandt, mit dem nachgewiesen werden konnte, dass fakultativ pathogene Mikroorganismen wie Mycobakterien bevorzugt durch Uferfiltrat, nicht aber durch Grundwasser in Biofilme gelangen (Tabelle 6).

Tabelle 6

Fakultativ pathogene Bakterien in Biofilmen verschiedener Trinkwässer

Bakterien	Uferfiltrat				Grundwasser			
	PE-HD	PVC	Stahl	Kupfer	PE-HD	PVC	Stahl	Kupfer
<i>Legionella</i>	+	+	+	–	+	+	+	–
fäkale Enterokokken	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Mycobacteria</i>	+	+	+	(+)	–	–	–	–

Diskussion und Ausblick

Biochemische Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen in Trinkwasser können zu einer erheblichen Verbesserung der bisherigen Untersuchungspraxis führen. Aufgrund der spezifischen Kopplung von biologischen Zielmolekülen mit Bestandteilen mikrobieller Zellen ist eine hohe Treffergenauigkeit und damit eine hohe Spezifität gegeben. Hinzu kommen Amplifikationsverfahren wie die PCR, die die Sensitivität der Verfahren erhöhen. Direkte Folge dieser Eigenschaften sind eine Zeitersparnis und eine höhere taxonomische Genauigkeit im Vergleich zu den konventionellen Verfahren. Eine Einschränkung ist die bis dato immer noch notwendige, zeitverkürzte kulturelle Voranreicherung, die erfahrungsgemäss sogar bei molekulargenetischen Verfahren einer Amplifikation mit PCR vorgeschaltet

werden muss, um die für Trinkwasser notwendige Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Das bedeutet, dass immunologische Methoden mindestens 24 Stunden, d.h. 1,5 Arbeitstage benötigen, und Prototypen geeigneter molekulargenetischer Verfahren gerade noch knapp in einem Arbeitstag abzuwickeln sind (siehe auch Abb. 1). Durch die Anreicherung in Flüssigmedien oder mit PCR-Verfahren sind diese Verfahren qualitativ auszuwerten («Presence/Absence»). Eine Ausnahme bildet z.B. das Colony Dot Blot-Verfahren zum Nachweis von Legionellen, dessen Anreicherung auf festen Nährmedien durchgeführt wird. Ein Vorteil der kulturellen Voranreicherung ist jedoch, dass lebensfähige Zellen nachgewiesen werden. Ein erster Ansatz, den Zeitaufwand von der Probenannahme bis zum Erhalt eines abgesicherten Ergebnisses auf einen Arbeitstag oder weniger zu verkürzen, ist ein neuartiger Testansatz, Amplifikation (PCR) und Detektion (Hybridisierung) in einem Arbeitsschritt parallel abzuwickeln. Entsprechende Testprotokolle und das notwendige Zubehör sind kommerziell erhältlich (Taqman®, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland), stehen jedoch in ihrer Erprobung im Trinkwasserbereich erst am Anfang. Die molekulargenetische Identifizierung von Biofilmorganismen mit *in situ*-Hybridisierung ist in einem Arbeitstag durchzuführen. *In situ*-Hybridisierungen können allerdings bei Trinkwasser-Biofilmen nur gruppenspezifisch (z.B. Proteobakterien-Subklassen) durchgeführt werden, da die Zellzahlen für speziesspezifische Hybridisierungen zu gering sind. Die molekulargenetische Detektion von einzelnen Bakterienarten in Biofilmen ist nur nach einer Amplifikation mit PCR und anschließender Southern Blot-Hybridisierung möglich und benötigt etwa zwei Arbeitstage. Allerdings wachsen Biofilme im Trinkwasser relativ langsam, so dass der Zwang zur Zeitverkürzung weniger relevant ist.

Praktische Erfahrungen in der Anwendung zeigen, dass sowohl die etwas zeitaufwendigeren immunologischen Verfahren als auch die molekulargenetischen Methoden deutliche Vorteile für die Qualitätskontrolle in der Wasserversorgung bieten. Bereits eine Zeitverkürzung auf 24 Stunden ermöglicht einen gestrafften und ökonomischeren Ablauf von Sanierungsverfahren oder von Nachkontrollen bei Notfällen (z.B. Desinfektionskontrollen). Der noch weiter minimierte Zeitaufwand für den molekulargenetischen Nachweis wird zusätzlichen Nutzen bringen, sobald die Verfahren ausreichend in der Praxis validiert sind. Die Spezifität und taxonomische Genauigkeit der biochemischen Methoden erlauben Einblicke in die mikrobielle Qualität des Trinkwassers, die bislang nicht möglich waren. Die Verfolgung von Schadensfällen ist mit diesen Methoden ebenso gut durchzuführen, wie die Untersuchung von material- und aufbereitungsbedingten Einflüssen auf das Wasserverteilungssystem. Besonders wichtig für zukünftige Untersuchungen sind Untersuchungen zur Regeneration von UV-desinfektionsgeschädigten Zellen, die sich in Biofilmen im nachgeschalteten Rohrnetz weiter vermehren können. Obwohl die mit dem konventionellen Untersuchungsspektrum ermittelte Trinkwasserqualität in allen diesen Fällen den vorgeschriebenen hygienischen Kriterien entsprach, sind derartig empfindliche Untersuchungsverfahren von hohem Wert, da sie sehr früh-

zeitig mögliche Kontaminations- oder Schwachstellen aufdecken und damit spätere Notfälle verhindern helfen.

Die Zukunft abgesicherter und ökonomischer Qualitätskontrollen liegt mit Sicherheit in der Anwendung eines modernen biochemischen Methodenspektrums, das jedoch gründlich validiert und in der Praxis erprobt sein muss. Aufgrund der schnellen Weiterentwicklung von PCR- und Hybridisierungstechniken wird der Hauptanteil bei den molekulargenetischen Verfahren, vor allem in der parallelen Detektion verschiedener, hygienisch relevanter Species liegen (15). Ein weiterer Vorteil dieser Methoden ist, dass neben taxonomischen Merkmalen auch funktionelle Charakteristika nachgewiesen werden können, sofern sie für die Wasserversorgung von Wichtigkeit sind (z.B. Biokorrosion, Abbaupotential usw.). Auch der Nachweis von schwierig zu detektierenden Organismen wie von Viren und Parasiten wird zunehmend ermöglicht werden. Eine Implementierung biochemischer Nachweisverfahren für Mikroorganismen in Trinkwasser in *on line*-Verfahren ist vom heutigen Standpunkt her gesehen nicht möglich, da die notwendige Nachweisempfindlichkeit Anreicherungsverfahren erfordert. Die Einfügung biochemischer Methoden in Verordnungen und Regularien ist bislang am Widerstand der entsprechenden Gremien gescheitert. Da zwischenzeitlich geeignete und erprobte Methoden zur Verfügung stehen, ist eine Überarbeitung des vorgeschriebenen Untersuchungskatalogs der erste unabdingbare Schritt zu einer modernen und rationellen Qualitätssicherung.

Dank

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Wissenschaft sowie dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. für die finanzielle Unterstützung unserer Forschungsarbeiten.

Zusammenfassung

Die in nationalen und internationalen Verordnungen vorgeschriebenen mikrobiologischen Verfahren zur Untersuchung von Trinkwasser genügen hinsichtlich Zeitaufwand und Spezifität modernen Anforderungen nur unvollkommen. Biochemische Verfahren mit spezifischen Bindemolekülen für bakterielle Bestandteile weisen auch für die Trinkwasseruntersuchung viele Vorteile auf. Es werden immunologische Methoden zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* und Legionellen sowie molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Enterokokken und Biofilm-Mikroorganismen beschrieben, die speziell für die Anwendung in Trinkwasser entwickelt wurden. Die praktischen Erfahrungen, die mit diesen Methoden gesammelt werden konnten, werden vorgestellt und diskutiert. Aufgrund der bisher erzielten Ergebnisse können biochemische Methoden zum Nachweis mikrobieller Parameter in Trinkwasser empfohlen werden, sofern sie validiert und in der Praxis erprobt wurden. Die Einbeziehung solcher Methoden in Regularien und Verordnungen ist dringend notwendig; entsprechende Initiativen sollten möglichst rasch auf nationaler und internationaler Ebene ergriffen werden.

Résumé

Les méthodes microbiologiques pour le contrôle de l'eau potable, décrites dans les réglementations nationales et internationales, ne remplissent plus les exigences modernes en ce qui concerne la spécificité et le gain de temps. Des méthodes biochimiques, utilisant des molécules spécifiques se fixant sur certains composants bactériens, présentent de grands avantages pour l'examen de l'eau potable. Etant spécialement développées pour l'analyse de l'eau potable, des méthodes immunologiques pour la détection des *Enterobacteriaceae* et des légionelles, ainsi que des méthodes de biologie moléculaire pour la détection des enterococci et des micro-organismes des biofilms, sont décrites. Les expériences pratiques rassemblées lors de l'utilisation de ces méthodes sont présentées et discutées. Les résultats obtenus à ce jour, montrent que ces méthodes biochimiques pour la détection des paramètres microbiologiques dans l'eau potable peuvent être recommandées, dans la mesure où elles sont évaluées et validées dans la pratique. L'intégration de ces méthodes dans des réglementations et ordonnances est absolument nécessaire. Les initiatives adéquates doivent être prises aussi vite que possible au niveau national et international.

Summary «Biochemical Methods to Detect Microbial Parameters in Drinking Water»

The microbiological methods to control drinking water which are prescribed in national and international regulations fail to fulfil the modern requirements of time efficiency and specificity. Biochemical methods using specific molecules to bind parts of bacteria are also advantageous to examine drinking water. Immunological methods to detect *Enterobacteriaceae* and *Legionellae* as well as molecularbiological methods to detect enterococci and biofilm organisms especially developed for drinking water purposes are described. The practical experiences gained by these methods up to now are presented and discussed. Basing of those results biochemical methods to detect microbial parameters in drinking water can be recommended if they are evaluated and tested in the practice. The implementation of those methods in regulations and legal prescriptions is urgently required; the respective activities should be initiated as fast as possible on national and international level.

Key words

Control of drinking water, Immunological methods, Molecularbiological methods, *Enterobacteriaceae*, *Legionellae*, *Enterococci*, Biofilm organisms

Literatur

- 1 *Anonym*: Verordnung über Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasser-verordnung TrinkwV) vom 05.12.1990, Bundesgesetzblatt 1, 2613–2629 (1990).
- 2 *Hübner, I., Knoll, C. und Obst, U.*: Erfahrungen mit dem Nachweis von *E. coli* und coliformen Bakterien nach der Trinkwasserverordnung von 1986. Zbl. Bakt. Mikr. Hyg., Serie B 187, 209–215 (1989).

- 3 Dutka, B.J.: Coliforms are an inadequate index of water quality. *J. Environ. Health* **36**, 39–46 (1973).
- 4 Wiedenmann, A., Langhammer, W. and Botzenhart, K.: Enterobacteria as a criterion for the quality of raw-, drinking- and swimming-pool-water. Comparative study of the occurrence of enterobacteria, *Escherichia coli*, coliforms, colony counts, fecal streptococci and *Pseudomonas aeruginosa*. *Zbl. Bakt. Hyg. B* **187**, 91–106 (1988).
- 5 Mossel, D.A. and Struijk, C.B.: *Escherichia coli*, other *Enterobacteriaceae* and additional indicators as markers of microbiologic quality of food: advantages and limitations. *Microbiologia* **11**, 75–90 (1995).
- 6 Kuhn, H.-M., Meier-Dieter, U. and Mayer, H.: ECA, the Enterobacterial Common Antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**, 195–222 (1988).
- 7 Peters, H., Jürs, M., Jahn, B., Jahn, K., Timmis, K.N. and Bitter-Suermann, D.: Monoclonal antibodies to Enterobacterial Common Antigen and to *Escherichia coli* lipopolysaccharide outer core: Demonstration of an antigenic determinant shared by Enterobacterial Common Antigen and *E. coli* K5 capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **50**, 459–466 (1985).
- 8 Wecker, M., Hübner, I., Obst, U. und Bitter-Suermann, D.: Vergleichende Untersuchungen von *Enterobacteriaceae* im Trink- und Oberflächenwasser mit neuen immunologischen und herkömmlichen mikrobiologischen Verfahren. *Vom Wasser* **69**, 177–181 (1987).
- 9 Hübner, I., Steinmetz, I., Obst, U., Giebel, D. and Bitter-Suermann, D.: Rapid determination of *Enterobacteriaceae* in drinking water by an immunological assay based on a monoclonal antibody against Enterobacterial Common Antigen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3187–3191 (1992).
- 10 Steinmetz, I., Reinheimer, C., Hübner, I. and Bitter-Suermann, D.: Genus-specific epitope on the 60-Kilodalton *Legionella* heat shock protein recognized by a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 346–354 (1991).
- 11 Steinmetz, I., Reinheimer, C. and Bitter-Suermann, D.: Rapid identification of *Legionellae* by a colony blot assay based on a genus-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1016–1018 (1992).
- 12 Hübner, I., Obst, U., Steinmetz, I. and Bitter-Suermann, D.: Microbiological-immunological rapid method to detect *Legionellaceae* in water. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **20**, 205–207 (1992).
- 13 Betzl, D., Ludwig, W. and Schleifer, K.H.: Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2927–2929 (1990).
- 14 Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K.H. and Obst, U.: Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 450–453 (1998).
- 15 Heiber, I., Frahm, E. and Obst, U.: Molecular biological detection of hygienically relevant microorganisms in water samples based on specific nucleic acid probes and magnetic beads. *Proceedings of the Specialized IWSA Conference «Rapid Microbiological Monitoring Methods»*, 1–3, Warrington/UK 23–24 Feb. 1999.
- 16 Braun-Howland, E.B., Vescio, P.A. and Nierzwicki-Bauer, S.A.: Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3219–3224 (1993).
- 17 Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.H. and Stenström, T.-A.: *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2293–2298 (1993).
- 18 Schwartz, T., Hoffmann, S. und Obst, U.: Der Einfluss verschiedener Trinkwassergewinnungs- und Aufbereitungsmethoden auf die natürliche Biofilmentwicklung in einem Trinkwasserverteilungssystem. *Vom Wasser* **89**, 125–138 (1997).

- 19 Schwartz, T., Hoffmann, S. and Obst, U.: Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered water systems. *Water Research* **32**, 2787–2797 (1998).
- 20 Schwartz, T., Kalmbach, S., Hoffmann, S., Szewzyk, U. and Obst, U.: PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution system. *J. Microbiol. Methods* **34**, 113–123 (1998).
- 21 Hübner, I., Bitter-Suermann, D., Borniger, R., Dobberstein, J., Klittich, G., Obst, U., Pohl, V., Van Assche, J. und Weisgerber, Ch.: Die Vornorm DIN V 38411 K9 für den Schnelldachweis von Lactose-fermentierenden *Enterobacteriaceae* – erprobt von 6 Trinkwasserüberwachungslabors. *gwf-Wasser/Abwasser* **136**, 187–193 (1995).
- 22 Hennekens, C.H.: *Epidemiology in medicine*. Little, Brown Co., Boston 1987.
- 23 Obst, U., Borniger, R., Fillkorn, R., Pohl, V., Schackmann, A., Petzoldt, H., Schaefer, B., Feuerpfeil, I., Steinmetz, I. und Van Assche, J.: Colony Blot-Methode zum Nachweis von Legionellen – Ergebnisse einer Vergleichsuntersuchung. *Zbl. Hyg.* **199**, 91–95 (1996).
- 24 Frahm, E. und Obst, U.: Erfahrungen mit optimierten Methoden zum Nachweis von Legionellen im Trinkwasser. *Zbl. Hyg.* **196**, 170–180 (1994).
- 25 Obst, U. und Kannenberg, W.: Praktische Erfahrungen beim Einsatz und der Entsorgung von Kaliumpermanganat-Desinfektionslösung. *gwf-Wasser/Abwasser* **129**, 656–657 (1988).
- 26 Ruseska, I., Robbins, J., Lashen, E. and Costerton, J.: Biocide testing against corrosion-causing oilfield bacteria helps controlling plugging. *Oil Gas J.* **80**, 253–264 (1982).
- 27 Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 593–600 (1992).
- 28 Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Reviews* **59**, 143–169 (1995).

Dr. Ursula Obst, Stadtwerke Mainz AG und WFM Wasserforschung
Mainz GmbH, Rheinallee 41, D-55118 Mainz