

Aus dem Zentrum der Hygiene des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. R.H.W. Schubert

**Vorkommen von vermehrungsfähigen
Aeromonasarten in Rohrinkrustationen eines
städtischen Wasserversorgungssystems**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von:
Knut Karst
aus Erfurt

Frankfurt am Main 2001

Dekan:	Prof. Dr. med. G. von Jagow
Referent:	Prof. Dr. med. R. H. W. Schubert
Korreferent:	Prof. Dr. med. P. M. Shah
Tag der mündlichen Prüfung:	18.02.2002

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	5
2	Aeromonas (Kluyver & van Niel 1936)	8
2.1	<i>Geschichte und Nomenklatur von Aeromonas</i>	8
2.2	<i>Morphologie</i>	9
2.3	<i>Vorkommen und Ökologie</i>	10
2.4	<i>Humanpathogenität</i>	10
2.5	<i>Biochemie</i>	11
3	Material und Methode	12
3.1	<i>Probenentnahme</i>	12
3.2	<i>Koloniezahlbestimmung der Aeromonaden</i>	15
3.3	<i>Nachweis und Reinzüchtung der Aeromonaden</i>	17
3.3.1	Dextrin-Fuchsin-Sulfit-Medium (DFS) nach Schubert (1967)	17
3.3.2	Cytochrom	19
3.4	<i>Konservierung und vorübergehende Aufbewahrung der Aeromonas-Stämme ..</i>	20
3.4.1	Konservierung der <i>Aeromonas</i> -Stämme	20
3.4.2	Vorübergehende Aufbewahrung der <i>Aeromonas</i> stämme	21
3.5	<i>Nährmedien zur qualitativen Bestimmung von Aeromonaden</i>	22
3.5.1	Nährmedien zur Bestimmung der Säurebildung von Aeromonaden	22
3.5.2	Nährmedien zur Bestimmung der Gasbildung von Aeromonaden	24
3.5.3	Nährmedien zur Verwertungsbestimmung durch Aeromonaden	25
3.5.4	Nährmedien zur Überprüfung von Decarboxylase und Dihydrolase	27
3.5.4.1	Nährmedien zur Überprüfung von Lysin- und Ornithindecaboxylase ..	27
3.5.4.2	Nährmedien zur Überprüfung von Arginindihydrolase	28
3.5.5	Aesculin-Bouillon	30
3.5.6	Butandioldehydrogenase- und VOGES-PROSKAUER- Reaktion	31
3.5.6.1	VOGES-PROSKAUER-Reaktion (1898)	31
3.5.6.2	Butandioldehydrogenase-Reaktion	32
3.5.7	Kaliumcyanid-Testbouillon	33
3.5.8	SIMMONS-Citrat-Agar	34
3.5.9	Indol-Reaktion in der Trypton-Tryptophan-Bouillon	35
3.6	<i>Datenauswertung mit einer Hierarchischen Clusteranalyse</i>	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	<i>Gesamtkoloniezahlbestimmung der aufgearbeiteten Proben</i>	37
4.2	<i>Ergebnisse der Probe 1</i>	40
4.3	<i>Ergebnisse der Probe 2</i>	40
4.4	<i>Ergebnisse der Probe 3</i>	44
4.5	<i>Ergebnisse der Probe 4</i>	49
4.6	<i>Ergebnisse der Probe 5</i>	51

4.7	<i>Ergebnisse der Probe 6</i>	53
4.8	<i>Ergebnisse der Probe 7</i>	58
4.9	<i>KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom Entnahmemonat</i>	59
4.10	<i>KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom pH-Wert</i>	59
4.11	<i>KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom Rohrmaterial</i>	60
5.	Diskussion	61
6.	Zusammenfassung	67
7	Summary	68
8.	Literatur	69
9	Anhang	78
10	Danksagung	82
	Lebenslauf	83
	Schriftliche Erklärung	84

1 EINLEITUNG

Aeromonas sind psychrophile Bewohner aquatischer Biotope und nehmen in nährstoffreichen Gewässern eine dominante Rolle ein (SCHUBERT 1967a). Hier werden sie in hohen Konzentrationen nachgewiesen (HOLMES et al. 1996). Im Grundwasser oder anderen oligotrophen Gewässern werden sie eher selten angetroffen. Das Vorkommen als Trinkwasserkeim ist somit nicht typisch für *Aeromonas*. In geringeren Konzentrationen werden *Aeromonas*-Keime aber immer wieder aus Trinkwassersystemen isoliert (KUHN et al. 1997b, SCHUBERT 1997). Dabei wird ihr Auftreten oft mit einem ansteigenden Verschmutzungsgrad des Wassers, ungenügender Aufbereitung oder unzureichender Chlordesinfektion in Zusammenhang gebracht (VAN DER KOOIJ 1988, 1991, STELZER et al. 1992).

Im Gegensatz zu den bisherigen Nachweisen von *Aeromonas* aus Wasserproben sollte in dieser Arbeit das Vorkommen und die Artenzusammensetzung von *Aeromonas* in den Inkrustationen der Trinkwasserverteilungsrohre näher analysiert werden. Diese korrosions- und sedimentbedingten Biofilmbeläge weisen hohe mikrobielle Besiedlungsraten auf (ALLEN et al. 1980) und stellen ein Habitat für potentiell pathogene Keime dar (ROBINSON et al. 1995). So konnten Klebsiellen, Mycobakterien, Legionellen und *E. coli* nachgewiesen werden (SCHULZE-RÖBBECKE & FISCHER 1989, KAYSER & FLEMMING 1989). Auch *Aeromonas* stellen in hohen Konzentrationen einen potentiellen humanpathogenen Keim dar (vgl. Abschn. 2.4).

Als Biofilm wird die Form von organisiertem mikrobiellem Leben bezeichnet, die sich durch Besiedlung und Vermehrung von Mikroorganismen an Grenzflächen ausbildet (FLEMMING 1991). Der mikrobielle Bestandteil von Biofilmen besteht aus einer Vielzahl von Organismen. So werden Bakterien (AULICINO & ORSINI 1996), Pilze (NAGY & OLSON 1986), Viren (QUIGION et al. 1997) und Einzeller (SIBILLE et al. 1998) in ihm angetroffen. Die Bewohner des Biofilms stehen untereinander in einem ökologischen Gleichgewicht und werden in Art und Anzahl durch ihre Umwelt stark beeinflusst (MAYER et al. 1999, SCHMITT & FLEMMING 1999). Man geht davon aus, dass er eine der ältesten Formen von organisiertem Leben darstellt und der größte Teil der irdischen Biomasse in dieser Organisationsform lebt (SCHOPF et al. 1983, FERRIS et al. 1989). Trotz dieser Tatsachen

standen Struktur und Funktion des Biofilms lange Zeit nicht im wissenschaftlichem Interesse.

Für die Existenz des nahezu ubiquitären Biofilms werden nur Nährstoffe, Feuchtigkeit und eine besiedelbare Grenzfläche benötigt (CHARACKLIS & WILDERER 1989). Biofilme bestehen neben den Mikroorganismen aus extrazellulären polymeren Substanzen und darin gelösten und eingebauten anorganischen und organischen Stoffen und Partikeln (FLEMMING et al. 1998). Biofilme sind nicht als starre Auflagerungen zu verstehen, sondern als ein durch Polymere gebildetes Gel. Hauptbestandteil ist Wasser (SCHMITT & FLEMMING 1999). Dadurch bilden sie ein viscoelastisches System, welches durch Umweltfaktoren, Transportprozesse und das umgebende Medium geprägt wird, aber auch Rückwirkungen auf diese Einflussfaktoren besitzt (FLEMMING 1991).

Biofilme unterscheiden sich in Art, Struktur und Artenvielfalt stark voneinander. In den hier untersuchten oligotrophen Trinkwasserumgebungen besiedeln erst anspruchslose Arten die Grenzfläche und reichern sie mit lokaler Biomasse an. Dies gibt anspruchsvolleren Mikroorganismen die Möglichkeit der Besiedlung, obwohl die allgemeinen Umweltbedingungen für sie keine ökologische Nische bieten würden (FLEMMING 1991). Vor allem auf Nährstofflimitierung und Toxine reagieren Mikroorganismen im Biofilm nicht so empfindlich wie in suspendierten Lösungen (BOUWER 1989, STAL et al. 1989, KERSTERS et al. 1996).

Abgesehen von der Gefahr der möglichen Ansammlung von Krankheitserregern und dem damit verbundenen Infektionsrisiko führt die Besiedlung der Rohrrinnenoberflächen durch Mikroorganismen aller Art auch zu einer Reihe anderer Probleme. So verursachen Veränderungen von Geruch, Farbe und Geschmack des Trinkwassers eine Beeinträchtigung der Wasser- und Lebensqualität (SIXL et al. 1999, MOMBA et al. 2000), aber auch die mikrobielle Korrosion (FLEMMING 1992, RODRIGUE et al. 1999) und erhöhte Strömungswiderstände (SEIFERTH & KRÜGER 1950, CUNNINGHAM et al. 1990) führen zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden.

Ziel sollte aber nicht die Beseitigung des praktisch ubiquiteren Biofilms sein, sondern durch weitere Untersuchungen seine Struktur und Funktion zu verstehen. Nur dadurch kann ein vorhersehbarer Einfluss auf den Biofilm bzw. seine Bewohner genommen werden und gesundheitliche sowie wirtschaftliche Schäden, welche von ihm ausgehen können, begrenzt werden. Mit der Untersuchung von *Aeromonas* als weiteren möglichen Biofilmbewohner des Trinkwasserverteilungssystems soll die vorliegende Arbeit zum

weiteren Verständnis von Transport- und Besiedlungsprozessen im dynamischen Biofilm beitragen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob *Aeromonas* im Biofilm der Trinkwasserleitungen eine Nische besetzt hat, die ein Überleben ermöglicht, oder ob der Biofilm für *Aeromonas* ein Vermehrungsraum bietet, von dem eine Kontamination des Trinkwassers ausgehen kann.

2 AEROMONAS (KLUYVER & VAN NIEL 1936)

2.1 Geschichte und Nomenklatur von *Aeromonas*

Obwohl schon ZIMMERMANN (1890) aus dem Trinkwasser in Chemnitz ein *Bacillus punctatus* und ERNST (1890) von Fröschen einen *Bacillus rancida* isolierte, war deren Beschreibung für eine eindeutige Zuordnung zur heutigen Gattung der Aeromonaden nicht ausreichend, so dass die Erstbeschreibung der Gattung erst durch die Arbeit von SANARELLI (1891) erfolgte. Er isolierte aus dem Blut und der Lymphe eines infizierten Frosches einen Keim, den er *Bacillus hydrophilus fuscus* nannte. Mit diesem Keim gelangen ihm Infektionen von Kalt- und Warmblütern. Um den wasserliebenden Keim besser zu beschreiben, führte CHESTER (1901) die Bezeichnung als *Bacterium hydrophilum* ein.

Durch die Fähigkeit der Gasproduktion erhielt die Gattung den Namen *Aeromonas* (KLUYVER & VAN NIEL 1936). Es folgten nun Unterteilungen in die motilen und nichtmotilen Arten (SIESZKO 1957). Letztere wurden erstmals als *Bacillus der Forellenseuche* (EMMERICH & WIEBEL 1894) und später als *Bacterium salmonicida* und *Aeromonas salmonicida* beschrieben. Der Versuch, die nicht motilen *Aeromonas salmonicida* als neuen Genus *Necromonas* (SMITH 1963) zu etablieren, konnte aufgrund von DNA-DNA-Hybridisierungsversuchen, die ihre Zugehörigkeit zum Genus *Aeromonas* bewiesen (MACINNES et al. 1979), nicht aufrechterhalten werden. Man erklärt dieses Phänomen heute mit zwei Hauptevolutionslinien innerhalb der *Aeromanaceae*.

Taxonomische Arbeiten, die auf phänotypischen Eigenschaften basierten, teilten die Aeromonaden zunächst in Arten und Unterarten ein (EDDY 1960, EWING & JOHNSON 1960, EDDY & CARPENTER 1964, SCHUBERT 1963, MCCARTHY 1975). Die Anwesenheit oder Abwesenheit von selektiven Eigenschaften und deren Kombination miteinander machten eine Einteilung in Spezies und Subspezies möglich, bzw. das Beschreiben neuer Spezies nötig (POPOFF & VERON 1976).

Durch DNA-DNA-Hybridisierungsveruche und biochemische Charakterisierungen erfolgten zunächst Unterteilungen, bei denen die motilen *Aeromonas* in die Komplexe von *A. hydrophila*, *A. caviae* und *A. sobria* mit mehreren DNA-DNA-Hybridisierungsgruppen eingeteilt wurden (POPOFF et al. 1981). Heute werden nach ihren genotypischen Eigenschaften 16 DNA-DNA-Hybridisierungsgruppen unterschieden (vgl. Tab. 2.1).

Tab.2.1. Überblick der genotypisch und phänotypisch beschriebenen *Aeromonas*-Arten nach CARNAHAN & ALTWEGG 1996 (/ Synonyme)

DNA-DNA-		
Hybridisierungsgruppe	Genotypische Artenbezeichnung	Phänotypische Artenbezeichnung
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2	Unbenannt	<i>A. hydrophila</i>
3	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> (nicht motil, psychrophil)
4	Unbenannt	<i>A. hydrophila</i> (motil, mesophil)
5A	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
5B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8X	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>A. sobria</i>
8Y	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> biovar <i>A. sobria</i> / <i>A. ichtosmia</i>
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
11	Unbenannt	<i>Aeromonas</i> species (Ornithin-positiv)
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	Unbenannt	<i>A. Gruppe 501</i>
14	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i> / <i>A. enteropelogenes</i>
15	<i>A. allasaccarophila</i>	<i>A. allasaccarophila</i>
16	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>

Der Prozess der Einteilung ist noch nicht abgeschlossen. So erfordert das Determinieren neuer, nicht einteilbarer *Aeromonas*-Stämme das Beschreiben weiterer Arten. *Aeromonas popoffii* sp. nov. stellt zur Zeit den jüngsten Vertreter neu beschriebener *Aeromonas*-Arten dar (HUYS et.al 1997).

2.2 Morphologie

Im *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* wird der Genus *Aeromonas* in die Sektion 5: den facultativ anaeroben gram-negativen Stäbchen eingeteilt. Sie bilden dort mit den *Vibrio*, *Photobacterium* und *Plesiomonas* die Familie der *Vibrionacea*. *Aeromonas* werden als Stäbchen mit abgerundeten Enden beschrieben. Sie weisen einen Durchmesser zwischen 0,3 und 1,0 µm auf und sind 1-3,5 µm lang. Sie kommen einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten vor. Überdauerungsstadien sind bis heute nicht bekannt. Die meist motilen Arten sind mit einem polaren Flagellum ausgestattet (POPOFF 1984).

2.3 Vorkommen und Ökologie

Aeromonaden kommen in aquatischen Lebensräumen vor. Die Konzentration der Mikroorganismen steigt mit der Temperatur und dem Verschmutzungsgrad des Wassers an (SCHUBERT 1967a, 1975, HOLMES et al. 1996). Ihr Temperaturoptimum liegt zwischen 22 und 28°C (POPOFF 1984). Besonders in den Sommermonaten kommt es deshalb häufig zu einer Massenentwicklung von *Aeromonas* (SCHUBERT 1967c, HAVELAAR et al. 1990). Unter natürlichen Bedingungen konnten vermehrungsfähige Keime bei Temperaturen von 4°C bis 45°C sowie einem pH-Wert zwischen 4,5 und 9,8 erfasst werden. Ihr pH-Optimum wird zwischen 6,5 und 7,5 angegeben (HAZEN et al. 1978, PALUMBO et al. 1985). Innerhalb der Gattung gibt es allerdings Unterschiede in der Temperaturlimitation, während *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas sobria* bei 5°C noch Enterotoxine bilden (MAJEED et al. 1990) zeigt *Aeromonas caviae* einen signifikanten Rückgang der Population bei niedrigen Temperaturen (HOLMES & NICCOLLS 1995).

Auch in Trinkwasseraufbereitungsanlagen und Verteilungssystemen ist *Aeromonas* in geringen Konzentrationen nachweisbar (SCHUBERT 1997). Im Gegensatz zu Enterobakterien und Pseudomonaden sind Aeromonaden empfindlicher gegenüber Chlor (KNOCHEL 1991). Durch die Assoziation zu Biofilmen mit weiteren Bakterienarten erlangt *Aeromonas* in chlorierten Wassersystemen jedoch eine gewisse Resistenz gegenüber höheren Chlorkonzentrationen (MACKERNESS et al. 1991).

2.4 Humanpathogenität

Aeromonas-Infektionen können beim Menschen mild verlaufen aber auch lebensbedrohliche Zustände hervorrufen. Ihre pathogenen Eigenschaften wurden experimentell nachgewiesen und unzweifelhaft mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (SCHUBERT et al. 1996b, 1998). Bei zuvor Gesunden handelt es sich meist um exogene Infektionen wie nach einem Trauma. Bedrohlicher verlaufen zu einer Bakteriämie oder Sepsis führende endogene Infektionen, die vom Gastrointestinaltrakt, gangränösen Hautverletzungen oder Wundinfektionen ausgehen (JANDA et al. 1995). Besonders bei älteren oder immungeschwächten (ROLSTEN et al. 1991) bzw. -supprimierten Personen können solche Infektionen auch letalen Ausgang finden (CRYAN et al. 1990).

Neben den häufigen Darminfektionen werden Tonsillitis (SCHUBERT 1967a,b), Hornhautulcus und Konjunktivitis (SMITH 1980, CARTA 1994), Wundinfektion nach

Verletzungen oder Operationen (JOSEPH et al. 1991), Aspirationspneumonie (REINES & COOK 1981, HUR et al. 1995), Meningitis, Peritonitis und Sepsis bei Leukämie, Leberzirrhose, Hämatoblastomen oder Carcinomen beschrieben (JANDA & ABBOTT 1996). Auch Superinfektionen oder Sepsis bei rheumatischem Fieber und Infektionen von Galle, Leber und Urogenitalsystem können durch *Aeromonas* verursacht werden (SCHUBERT 1981, 1991).

Aeromonas species hydrophila, veronii und *caviae* können nachweislich Darminfektionen auslösen (MENGE et al. 1987). Bei Sepsis und Wundinfektionen werden meist *Aeromonas hydrophila* und *veronii biotyp sobria* aber auch *Aeromonas jandaei, trota, veronii biotyp veronii* und *schubertii* nachgewiesen. Dabei verlaufen die Infektionen vom *A. caviae*-Typ meist milder (DRYDEN & MUNRO 1989, JANDA & BRENDEN 1987).

Die Fähigkeit zur Bildung von Endo- und Enterotoxinen (MASCHER et al. 1988), Proteasen, Adhäsinen und besonders Hämolytinen werden heute als wesentliche Faktoren für die pathogenen Eigenschaften der Aeromonaden angesehen (SCHUBERT 1991, OAKLEY & WALKER 1993).

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen mesophiler *Aeromonas* im Trinkwasser und durch *Aeromonas* induzierte Diarrhoen ist beschrieben (BURKE et al. 1984, van der KOOIJ 1988). Dieses Phänomen tritt jedoch nur selten auf und geht mit stark ansteigenden *Aeromonas*-Keimzahlen im Trinkwasser einher.

2.5 Biochemie

Das biochemische Verhalten stand anfangs im Mittelpunkt des Interesses, da man taxonomische Fragen mittels dieser phänotypischen Eigenschaften beantworten konnte. Die biochemische Charakterisierung wurde von EDDY (1960), EDDY & CARPENTER (1964), SMITH (1963), SCHUBERT (1963), MCCARTHY (1975) sowie POPOFF & VERON (1976) vorgenommen. Danach bilden alle Aeromonaden Säure aus Glukose und Maltose nicht aber von Xylose, Dulcitol, Inositol, Adonitol, Malonat und Mucate. Sie sind oxidase- und katalasepositiv und reduzieren Nitrat zu Nitrit. Im Unterschied zu *Vibrio* ist *Aeromonas* gegenüber dem Vibriostatikum O/129 (2,4-Diamino-6,7-Diisopropylpteridin) resistent. Der G-C-Basenanteil von *Aeromonas*-DNA beträgt zwischen 57-63 mol% (POPOFF 1984).

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte aus dem Trinkwasserversorgungsgebiet einer städtischen Wasserwerksgesellschaft in Nordrhein-Westfalen. Dazu legte man die aus Grauguss oder Polyvinylchlorid (PVC) bestehenden Rohrstücke des Trinkwasserversorgungsnetzes im Erdreich frei (vgl. Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Überblick der Entnahme- und Rohrdaten der untersuchten Proben.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
Entnahme:							
Datum	08.03.99	08.06.99	13.07.99	10.08.99	14.09.99	19.10.99	09.11.99
Rohrdaten:							
Rohrmaterial	Grauguss	PVC	Grauguss	Grauguss	Grauguss	PVC	PVC
Verlegungsjahr	1949	1971	1962	Um 1900	1969	1987	1965
Länge	800 mm	990 mm	490 mm	980 mm	1003 mm	1000 mm	1100 mm
Durchmesser	80 mm	100 mm	118 mm	104 mm	106 mm	100 mm	100 mm
Innenoberfläche	2010 cm ²	3110 cm ²	3244 cm ²	3202 cm ²	3340 cm ²	3142 cm ²	3456 cm ²

Vor der Entnahme des Rohres wurden Wasserproben entnommen. Dies geschah an dem Hydranten welcher sich in Fließrichtung gesehen unmittelbar vor der Entnahmestelle des Wasserrohres befand. Am Hydrant wurde ein Standrohr mit Probeentnahmehahn angebracht. Das Standrohr wurde gründlich mit Wasser aus dem Trinkwassernetz durchspült und der Probeentnahmehahn abgeflammt. Das entnommene Wasser wurde auf Farbe, Klarheit und Geruch untersucht und anschließend die Konzentration an freiem Chlor bestimmt (vgl. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Wasseranalyse der untersuchten Proben

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
Geruch	geruchlos	geruchlos	geruchlos	geruchlos	geruchlos	geruchlos	geruchlos
Trübung	klar	klar	leicht getrübt	klar	klar	klar	klar
Farbe	farblos	farblos	schwach gelblich	farblos	farblos	farblos	farblos
freies Chlor	0 mg/l	0 mg/l	0 mg/l	0,01 mg/l	0 mg/l	0 mg/l	0 mg/l

Vor Entnahme der Graugussrohre reinigte man die Rohroberfläche mit Hilfe einer Drahtbürste, säuberte sie mit sterilem Wasser und desinfizierte die Oberfläche mit einer

10%igen Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach einer 5-minütigen Einwirkzeit erfolgte ein weiteres Spülen mit sterilem Wasser. Das Rohr wurde mit Hilfe eines desinfizierten Rohrschneiders ausgeschnitten und durch einen Bagger gehoben. Die Rohröffnungen sind noch in der Baugrube mit steriler Alufolie verschlossen worden. Vor dem Abtransport wurde diese gegen Kunststoffolie ausgetauscht. Im Labor erfolgte zuerst eine Besichtigung der Innenoberfläche des entnommenen Rohres. Fest anhaftende Beläge wurden mit Hilfe eines sterilen Edelstahlrohres gelöst und die Probe herausgestoßen. Die feuchte Belagsprobe fing man in einem sterilen Kunststoffgefäß auf. Anschließend spülte man mit 500 ml einer 0.14 molaren Natriumchloridlösung. Die so gewonnene Suspension wurde mit dem mechanisch gewonnenen Belag vereinigt. Zur Homogenisierung des Belagsmaterials wurde dieses mit einer sterilen Edelstahlstange zerdrückt und aufgeschüttelt.

Die Entnahme der PVC-Rohre begann ebenfalls mit einer Reinigung der Oberfläche mit sterilem Wasser und einer 5-minütigen Desinfektion mittels 10%iger Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach nochmaligem Spülen mit sterilem Wasser durchtrennte man das PVC-Rohr mit einer desinfizierten Handsäge. Auch hier wurden die Rohröffnungen noch in der Baugrube mit steriler Alufolie verschlossen, welche nach der Bergung durch Kunststoffolie ausgetauscht wurde. Den im Labor festgestellten dünnen flächendeckenden Belag löste man im Öffnungsbereich mit einem sterilen Schaber von der Innenoberfläche des PVC-Rohres. Zur Gewinnung des restlichen Belages gab man sterile Glasperlen und 250 ml steriles, partikelfreies Deionat in das Rohr. Mit steriler Kunststoffolie erfolgte ein dichter Verschluss der Rohrenden. Nach 5-minütigem manuellen Schütteln wurde die entstandene Suspension ohne die Glasperlen dekantiert. Danach wurden nochmals 150 ml des Deionats in das Rohr gefüllt, für zwei Minuten manuell geschüttelt und dekantiert. Eine Durchspülung des Rohres mit 100 ml Deionat beendete die Belagsgewinnung. Die gewonnenen Suspensionen vereinigte man mit dem Spülwasser.

Die Belagsuspension füllte man in sterile Behältnisse ab und transportierte sie in einer gekühlten Box, so dass am darauffolgenden Tag mit der Koloniezahlbestimmung, Isolation und Taxonomierung der im Belagsmaterial lebenden Organismen begonnen werden konnte. Gleichzeitig wurden die pH-Werte der Belagsuspensionen ermittelt (vgl. Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Überblick der gewonnenen Beläge und Suspensionen von den Rohrinneoberflächen der untersuchten Rohre

Proben- nummer	1	2	3	4	5	6	7
Gewicht	310,2 g	n.b.	557,47 g	2227,6 g	543,52 g	n.b.	n.b.
Volumen	463 ml	930 ml	946 ml	1500 ml	1304 ml	310 ml	480 ml
Farbe	schwarz	ocker	ockerbraun	ockerbraun	ockerbraun	bräunlich	ockerorange
Geruch	bitumartig	geruchlos	geruchlos	bitumartig	geruchlos	geruchlos	geruchlos
Gestalt	Inkrustationen	flächen- deckend	lehmartig	unregel- mäßig	unregel- mäßig	dünn, flächen- deckend	dünn, flächen- deckend
ph-Wert	6,95	7,96	7,71	7,82	6,65	7,91	8,18

3.2 Koloniezahlbestimmung der Aeromonaden

Die Koloniezahlbestimmung erfolgte über Overlayertechnik und über Oberflächenplatten (SCHUBERT & BLUM 1999). Untersucht wurden Proben von 10^1 ; 10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} und 10^{-5} ml. Für die Overlayertechnik wurde die gewonnene Probensuspension aufgeschüttelt, die obige Menge in ein Reagenzglas pipettiert und auf 10 ml mit 0,9 molarer steriler Kochsalzlösung aufgefüllt. Nach nochmaligem Aufschütteln wurde die Suspension mit einer Vakuumpumpe durch ein $0,22\ \mu\text{m}$ Filter (MILLIPORE CORPORATION, Bedford, Katalognummer.: GSWP 047) filtriert, so dass die zu isolierenden Aeromonaden im Milliporefilter zurückblieben. Dieser wurde luftdicht auf eine DFS-Platte (vgl. Abschn. 3.3.1) gelegt und mit abgekühltem aber noch flüssigem DFS-Agar übergossen. Dadurch wurde eine anaerobe Umgebung geschaffen und die Anzucht anderer Wasserkeime unterdrückt. Nach einer 24-stündigen Bebrütung bei 30°C erfolgte das Auszählen der angegangenen Keime (SCHUBERT 1976). Um zu vermeiden, dass einzelne Spezies der Primärkultur selektiv unterdrückt werden, gilt heute beim Nachweis von *Aeromonas* aus dem Trinkwasser das Anzüchten auf festen Nährböden ohne Ampicillin-Zusatz als Voraussetzung (SCHUBERT 1997).

Die Koloniezahlbestimmung auf Oberflächenplatten wurde einerseits mit einer noch unbehandelten Probe durchgeführt. Um eine bessere Verteilung der Probensuspension auf der Oberflächenplatte zu erreichen, wurde andererseits die Probe mit 1:10 verdünnten Tween® 80 (Fa. MAINLAND, Frankfurt a.M.) behandelt. Tween® beinhaltet Emulgatoren, welche die Oberflächenspannung senken. Mit sterilen Glasperlen schüttelte man diese 10%ige Lösung für fünf Minuten. Bei beiden Verfahren wurde keine Verdünnungsreihe hergestellt, sondern direkt von der aufgeschüttelten Probe abpipettiert, auf die vorgetrocknete DFS-Platte gegeben und mittels einer sterilen Pipette ausgestrichen. Die Auszählung der angegangenen Keime erfolgte nach 24-stündiger Bebrütung bei 30°C .

Das Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) erfolgte mit einem elektronischen Zählgerät. Durch Berührung der Markierungsmine mit der Plattenunterseite wurde die Kolonie farblich markiert und ein Impuls an das Zählwerk übertragen, der die Zählung akustisch bestätigte. Durch die farbliche Markierung auf der Platte wurde ein doppeltes Zählen einer Kolonie verhindert.

Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt und von den Ergebnissen der arithmetische Mittelwert gebildet.

Die beprobten Rohrrinnenoberflächen (vgl. Tab. 3.1) und die gewonnenen Belagssuspension (vgl. Tab. 3.3) bei den Probeentnahmen waren teilweise sehr unterschiedlich. Um vergleichbare Daten über die Besiedlungsdichte von *Aeromonas* in den Biofilmen der Rohrrinnenoberfläche zu erhalten, wurden die KBE auf Flächeneinheiten umgerechnet. Dazu wurde die KBE für die Gesamtrohrrinnenoberfläche des entnommenen Rohrabschnittes berechnet und anschließend auf KBE/cm² umgerechnet. Bei Tween®-Proben musste die prozentuale Verdünnung durch Tween® zusätzlich berücksichtigt werden.

3.3 Nachweis und Reinzüchtung der Aeromonaden

Für den Nachweis spezifischer Stoffwechseleigenschaften war es nötig, von den angezüchteten Keimen Reinkulturen herzustellen. Hierzu wurden ebenfalls DFS-Platten verwendet. Mit einer ausgeglühten Platinöse entnahm man einzeln stehende und von der Morphologie her auf Aeromonaden verdächtige Kolonien und strich diese in zwei Fraktionen auf einer neuen DFS-Platte aus (vgl. Abschn. 3.3.1). Dieser Vorgang wiederholte sich für ca. 130 Kolonien, ohne dabei einen Kolonietyp speziell auszusuchen oder zu bevorzugen. Es schloss sich eine 24-stündige Bebrütung bei 30°C an. Die Stämme wurden anschließend mit Nadi-Reagenz auf ihre Cytochromoxidase-Reaktion geprüft. Hierzu wurden einige Fraktionen auf der DFS-Platte betropft. Aeromonadenkolonien färbten sich nach circa zwei Minuten vom Rand her tiefblau ein und wurden somit als Cytochromoxidase positive Stämme eingeteilt. Diese positiven Stämme wurden nun auf CSA-Platten überimpft, durchgehend nummeriert und für 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Da der Cytochromoxidasetest auf Trypticase-Soy-Agar-Platten (CSA) besser als auf den roten Dextrin-Fuchsin-Sulfit Medium zu beurteilen ist, empfiehlt es sich, diesen Test auf Trypticase-Soy-Agar-Platten zu wiederholen. Um die so gezüchteten Stämme sicher als *Aeromonas*-Spezies anzusprechen, musste noch der Abbau von Glukose nachgewiesen werden (vgl. Abschn. 3.5.1).

3.3.1 Dextrin-Fuchsin-Sulfit-Medium (DFS) nach Schubert (1967)

Prinzip:

Das von SCHUBERT (1967a) beschriebene Medium zur Anzüchtung von *Aeromonas* aus Wasserproben ist ein Elektivagar für *Aeromonas*-Spezies und wird vor allem zur Abgrenzung von Pseudomonaden und Enterobakterien eingesetzt, da das Dextrin von diesen Keimen nicht verwertet werden kann. Beide kommen aber immer wieder als Begleitflora bei Probeentnahmen vor. Alle *Aeromonas*-Spezies sind zum Abbau von Dextrin fähig. Durch den zusätzlichen Einbau von Fuchsin bilden sie dunkelrot gefärbte Kolonien, die einen Durchmesser bis über 2 mm erreichen können. Im Gegensatz dazu bilden die ebenfalls auf DFS-Medium wachsende Pseudomonaden nur 0,5 mm große, weiß bis rosafarbene Kolonien, da in diesen kein Fuchsin eingebaut wird. Die wenigen dextrinspaltenden Enterobakterien (*Enterobacter*, *Klebsiella*) bilden zwar rote Kolonien, können aber durch die negative Cytochromoxydasereaktion abgegrenzt werden. Bakterienarten, die weder Dextrin spalteten noch eine Cytochromoxidase-Reaktion zeigten, stellten sich als farblose Kolonien dar.

Herstellung:

1. Diamant-Fuchsin-Lösung

10 g Diamantfuchsin

50 ml Dioxan

Das *Diamant-Fuchsin* wurde in Dioxan gelöst, anschließend mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und gründlich gemischt. Durch das *Diamant-Fuchsin* nahm die Lösung eine rote Farbe an.

2. Dextrin-Fuchsin-Sulfit-Medium (DFS)

1000 ml Aqua dest.

20,0 g Agar-Agar

10,0 g Caseinpepton pankreatisch verdaut

5,0 g Natriumchlorid - NaCl

7,5 g Dinatriumhydrogenphosphat - Na_2HPO_4

Die Zutaten wurden gemischt und für ca. 15 min zum Quellen stehen gelassen. Danach löste man den Agar für 20 min im Dampftopf.

Nach dem Abkühlen wurden

15 g Dextrin

12,5 ml 10%iges Natriumsulfit

2,5 ml Diamant-Fuchsin-Lösung (vgl. oben)

zugegeben, ein pH-Wert von 7,5 eingestellt und der Agar für nochmals 30 min in den Dampftopf gestellt. Im Anschluss wurde der Agar in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren für mindestens drei Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Die Lagerung der DFS-Platten erfolgte in der Kühlkammer bei 5°C. Unnötiges Licht sollte bei Lagerung und Gebrauch des DFS-Mediums vermieden werden, da das lichtempfindliche Medium durch den eintretenden Farbumschlag auf Dunkelrot unbrauchbar wird.

3.3.2 Cytochrom

Prinzip:

Aeromonas-Arten sind oxydasepositiv (POPOFF 1984). Das für die Cytochromoxidase-Reaktion verantwortliche Enzym stammt aus der Atmungskette und katalysiert dort in Anwesenheit von Sauerstoff die Oxydation reduzierter Cytochrome. Der Nachweis gelingt mit Nadi-Reagenz, einem Redoxfarbstoff, der den Elektronentransport durch Farbumschlag sichtbar macht. Hierzu wird eine Fraktion auf der DFS-Platte betropft. *Aeromonaden*kolonien färben sich nach circa zwei Minuten vom Rand her tiefblau ein und werden somit als Cytochromoxidase positive Stämme eingeteilt. *Pseudomonaden* hingegen nehmen eine gleichmäßig tiefblaue Farbe an. Dextrinspaltende Enterobakterien zeigen mit Nadi-Reagenz keine Reaktion (SCHUBERT 1967a).

Herstellung:

Das Nadi-Reagenz setzt sich aus zwei Grundlösungen zusammen, welche vor jedem Gebrauch frisch angemischt werden müssen. Das Anmischverhältnis zwischen Lösung A und Lösung B beträgt 1:3. Das so frisch bereite Nadi-Reagenz wird mittels Pipette auf eine möglichst einzelstehende Kolonie getropft.

Lösung A:

100 ml	Ethanol 95%ig
1,0 g	α -Naphthol (E.MERCK Art.Nr.1.06223)

Lösung B:

100 ml	Aqua bidest.
1,0 g	Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid (E.MERCK Art.Nr.3067)

3.4 Konservierung und vorübergehende Aufbewahrung der *Aeromonas*-Stämme

3.4.1 Konservierung der *Aeromonas*-Stämme

Prinzip:

Zur Aufbewahrung der *Aeromonas*-Stämme verwendete man einen Stichagar. Eine Beimpfung erfolgte mit einer ausgeglühten Platinstichsonde. Eine Kolonie der nummerierten *Aeromonas*-Reinkultur wurde von der Trypicase-Soy-Agarplatte entnommen und der Agar mittels Stich beimpft. Es schloss sich eine 24-stündige Bebrütung bei 30°C an. Die nochmals abgeflammt nummerierten Reagenzgläser wurden anschließend mit einem heißen paraffinierten Korken verschlossen und bei Zimmertemperatur gelagert. Durch diesen Verschluss wurde eine Austrocknung des Nährbodens verhindert.

Das Ausimpfen erfolgte mit einer sterilen Platinöse auf eine Casein-Soja-Pepton-Agarplatte, welche anschließend für 24 Stunden bei 30°C Celsius bebrütet wurde.

Herstellung:

Zusammensetzung des Stichagars:

1000 ml	Aqua dest.
8,0 g	Bactoagar (DIFCO 0140-01)
8,0 g	Nutrient Broth (DIFCO 0003-17-8)
8,0 g	Natriumchlorid - NaCl

Die Zutaten wurden gemischt und für ca. 15 min zum Quellen stehen gelassen. Danach wurde der Agar zum Lösen für 20 min in den Dampftopf gestellt. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt, der Agar in Röhren zu je vier Milliliter abgefüllt, mit einer Metallkappe verschlossen und für 15 min autoklaviert. Die Lagerung der noch unbeimpften Stichagarröhren erfolgte in der Kühlkammer bei 5°C. Somit wurde ein Austrocknen bis zum Verschluss mit einem paraffinierten Korken verhindert.

3.4.2 Vorübergehende Aufbewahrung der Aeromonasstämmе

Prinzip:

Zur vorübergehenden Aufbewahrung der isolierten *Aeromonas*-Reinkulturen und als Keimdepot zur Überprüfung der biochemischen Eigenschaften verwendete man einen Trypticase-Soy-Agar (CSA). Die Haltbarkeit eines solchen Keimdepots beträgt zwischen drei und sechs Wochen. Danach muss ein Ausimpfen vom konservierten Stichagar oder ein rechtzeitiges Überimpfen auf eine neue CSA-Platte erfolgen, da es ansonsten zum Austrocknen des Agars mit Untergang des *Aeromonas*-Keimdepots kommt. Die Lagerung der *Aeromonas*-Reinkultur auf CSA-Medium erfolgte bei Zimmertemperatur.

Herstellung:

1000 ml	Aqua dest.
15,0 g	Caseinpepton
15,0 g	Agar
5,0 g	Soya Pepton
5,0 g	Natriumchlorid - NaCl

Die Zutaten wurden gemischt und für ca. 15 min zum Quellen stehen gelassen. Danach wurde der Agar zum Lösen für 20 min in den Dampftopf gestellt. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und 15 min autoklaviert. Im Anschluss daran goss man den noch flüssigen Agar in Petrischalen und trocknete die erstarrten Agarplatten für drei Stunden im Brutschrank bei 37°C. Die Lagerung der noch unbeimpften CSA-Platten erfolgte in der Kühlkammer bei 5°C, um ein schnelles Austrocknen der Agarplatten zu verhindern.

3.5 Nährmedien zur qualitativen Bestimmung von Aeromonaden

3.5.1 Nährmedien zur Bestimmung der Säurebildung von Aeromonaden

Prinzip:

Säurebildung tritt beim mikrobiellen Abbau von Zuckern, Alkoholen und organischen Säuren bzw. deren Salzen auf. Diese Säurebildung wird durch den Umschlag des zugesetzten Indikators Bromthymolblau sichtbar. Der Indikator schlägt dabei von Grün (pH 7,3) auf Gelb (pH < 5) um. Da der Indikator vor der Bebrütung zum Testmedium gegeben wird, darf dieser keinen Einfluss auf die Entwicklung der Aeromonaden haben. Des Weiteren muss die Konzentration des zugesetzten Kohlenhydrates so groß sein, dass quantitativ die Pufferkapazität des Testmediums und eine eventuelle Alkalisierung durch Eiweiß- oder Peptonabbau überwunden werden.

Herstellung:

1. Bromthymolblau-Lösung (0,2%ig):

1,0 g Bromthymolblau - C₂₇H₂₈Br₂O₅S (E.MERCK Art.Nr.1.03026)

25,0 ml Natriumhydroxid-Lösung n/10

475,0 ml Aqua dest.

Das Bromthymolblau wurde in der Natriumhydroxid-Lösung gelöst, anschließend mit heißem Wasser aufgefüllt und gründlich gemischt. Durch den alkalisch eingestellten pH-Wert nahm die Lösung eine tiefblaue Farbe an. Um die Bromthymolblau-Lösung vor Licht zu schützen, wurde sie in einer braunen Flasche gelagert.

2. Fermentationsbouillon:

1000 ml Aqua dest.

8,0 g Nutrient Broth (DIFCO 0003-17-8)

5,0 g Natriumchlorid - NaCl

5,0 ml 0,2%ige Bromthymolblau Lösung (vgl. oben)

Die Fermentationsgrundbouillon wurde nach dem Schütteln und Quellen für 15 min autoklaviert. Anschließend wurden

10,0 g von einer der in Tabelle 3.4. aufgelisteten Substanzen

zugesetzt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die spezifische Bouillon wurde zu je 5ml in Reagenzröhrchen gefüllt und an zwei Tagen für je 30 min im Dampftopf fraktioniert sterilisiert.

Die Boullion wurde von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinnadel oder mit einer Öse aus der Trypton-Tryptophan-Bouillon (vgl. Abschn. 3.5.9) beimpft. Es schloss sich eine 48-stündige Bebrütung bei 30°C an.

Tab.3.4: Liste der Substanzen zur Herstellung der jeweiligen Fermentationsbouillon.

Substanz	Chemische Summenformel	Substanzhersteller / Bestellnummer
Agmatinsulfat	$C_5H_{14}N_4 H_5SO_4$	FLUKA / 05083
Amygdalin	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	FLUKA / 10050
Arabinose	$C_5H_{10}O_5$	SIGMA / A9524
Arbutin	$C_{12}H_{16}O_7$	SIGMA / A.4256
2,3 Butandiol	$C_4H_{10}O_2$	MERCK / 818801
Cellubiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	FLUKA / 22150
Dulcitol	$C_6H_{14}O_6$	SIGMA / D.0256
Fucose	$C_6H_{12}O_5$	SIGMA / F.2252
Galactose	$C_6H_{12}O_6$	MERCK / 1.04058
Glukose	$C_6H_{12}O_6$	MERCK / 1.04074
Glycerin	$C_5H_8O_3$	ROTH / 3783
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	MERCK / 1.04507
Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11} H_2O$	MERCK / 1.07660
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11} H_2O$	MERCK / 1.05910
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	MERCK / 1.05987
Mannose	$C_6H_{12}O_6$	FLUKA / 63582
Melibiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	MERCK / 1.12240
Methyl- α -D-Glyco-Pyranoside	$C_7H_{14}O_6$	SIGMA / M9376
N-Acetyl-D-galactosamin	$C_8H_{15}NO_6$	SIGMA / A2795
N-Acetyl-D-glucosamin	$C_8H_{15}NO_6$	SIGMA / A8625
Palatinose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	SIGMA / P2007
3-O Methyl-D-Gluco-Pyranose	$C_7H_{14}O_6$	SIGMA / M 4879
Raffinose	$C_{18}H_{32}O_{16}$	FLUKA / 83400
Rhamnose	$C_6H_{12}O_5 H_2O$	MERCK / 4736
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	MERCK / 7651
Salicin	$C_{13}H_{18}O_7$	MERCK / 1.07665
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	MERCK / 1.07758
Threhalose	$C_{12}H_{22}O_{11} 2H_2O$	FLUKA / 90210

Auswertung:

Wenn ein Farbumschlag von Grün auf Gelb festzustellen war, wurde der fermentative Abbau dieser Substanz als positiv gewertet. War kein Farbumschlag festzustellen, galt der Test als negativ.

3.5.2 Nährmedien zur Bestimmung der Gasbildung von Aeromonaden

Prinzip:

Beim mikrobiellen Abbau von Zuckern, Alkoholen und organischen Säuren bzw. deren Salzen können neben Säuren (siehe vorherigen Abschnitt) auch Gase gebildet werden. Die Gasbildung wird mit Hilfe eines DURHAM-Gasröhrchens dargestellt. Die Erouvetten wurden mit der Öffnung nach unten in dem Fermentationsbouillon (Rezept vgl. 3.5.1.) versenkt. Die Bouillon wurde an drei Tagen je einmal für 30 min im Dampftopf sterilisiert. Nach dieser fraktionierten Sterilisation muss nach Abkühlung jegliche Luft aus dem DURHAM-Gasröhrchen verdrängt sein.

Herstellung:

Die Bouillon (vgl. Tab. 3.5) wurde zu je 5 ml in Reagenzröhrchen mit DURHAM-Gasröhrchen gefüllt und an drei Tagen für je 30 min im Dampftopf fraktioniert sterilisiert. Es musste darauf geachtet werden, dass die Luft vollständig aus dem DURHAM-Gasröhrchen getrieben war.

Tab.3.5: Liste der Substanzen zur Überprüfung einer Gasbildung bei fermentativen Abbau.

Substanz	Chemische Summenformel	Substanzhersteller / Bestellnummer
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	MERCK / 1.04074
Glycerin	$C_3H_8O_3$	ROTH / 3783
Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11} H_2O$	MERCK / 1.07660
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	MERCK / 1.05987

Die Bouillon wurde von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinnadel oder mit einer Öse aus der Trypton-Tryptophan-Bouillon (vgl. Abschn. 3.5.9) beimpft. Es schloss sich eine 72-stündige Bebrütung bei 30°C an.

Auswertung:

Bei positivem Testergebnis war eine mehr oder weniger große Gasblase im DURHAM-Gasröhrchen zu erkennen, was auf einen fermentativen Abbau unter Gasbildung hinwies. Fermentativer Abbau ohne Gasbildung ließ kein Gas im Durham-Gasröhrchen entstehen.

3.5.3 Nährmedien zur Verwertungsbestimmung durch Aeromonaden

Prinzip:

Um die Verwertung einzelner Zucker, Alkohole, Amino- oder anderer organischer Säuren bzw. deren Salzen durch Aeromonaden zu untersuchen, musste ein Testmedium angesetzt werden, das nur diese Substanz zur Verwertung zuließ. Eine Verwertung wird durch Wachstum der Aeromonaden und damit durch eine Trübung des Testmediums angezeigt. Durch den zugesetzten Indikator Bromthymolblau wurde eine zusätzliche Verschiebung des pH-Wertes bei Verwertung angezeigt. Der Indikator schlug dabei von Hellblau (pH = 7) auf Gelb (pH < 5) oder auf Dunkelblau (pH > 8) um. Da der Indikator vor der Bebrütung zum Testmedium gegeben wurde, durfte dieser keinen Einfluss auf die Entwicklung der Mikroorganismen haben. Es empfahl sich ein Vergleichsröhrchen ohne Zusatz einer Substanz zu beimpfen, um die Trübung ohne pH-Wert-Verschiebung besser ablesen zu können.

Herstellung:

1000 ml Aqua dest.
 5,0 g Natriumchlorid - NaCl
 0,2 g Magnesiumsulfat - MgSO₄ · 7H₂O
 1,0 g Ammoniumdihydrogenphosphat - NH₄H₂PO₄
 1,0 g Dikaliumhydrogenphosphat - K₂HPO₄
 2,5 ml 0,2%ige Bromthymol-Blau-Lösung (vgl.3.6.1)
 10 g einer der in Tab.3.6 aufgeführten Substanz (bei Lactat 4 dl)
 wurden gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Tab.3.6: Liste der Substanzen zur Herstellung einer Verwertungsbouillon.

Substanz	Chemische Summenformel	Substanzhersteller / Bestellnummer
Histidin	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	MERCK / 1.04351
Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O	MERCK / 1.07660
L-Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	MERCK / 1007
L-Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	MERCK / 1.01543
L-Cystein	C ₃ H ₇ NO ₂ S	MERCK / 1.02838
L-Prolin	C ₆ H ₉ NO ₂	MERCK / 7434
Rhamnose	C ₆ H ₁₂ O ₅ H ₂ O	MERCK / 4736
Threonin	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O	MERCK / 1.08411

Die Bouillon wurde zu je 3 ml in fabrikneue Reagenzröhrchen gefüllt und an zwei Tagen für je 30 min im Dampftopf fraktioniert sterilisiert.

Es erfolgte eine Minimalbeimpfung von der Trypticase-Soy-Agarplatte. Hierzu hinterließ man die Aeromonadenfraktion oberhalb der Bouillon an der Wand des Reagenzglases. Die Bouillon wird anschließend über die beimpfte Stelle geschwenkt, so dass eine minimale Beimpfung ohne Trübung stattfand.

Nach einer 7-tägigen Bebrütung bei 30°C war das Ergebnis ablesbar.

Auswertung:

Der Test wurde positiv gewertet, wenn die Bouillon eine Trübung aufwies. War zusätzlich ein Farbumschlag der hellblauen Lösung auf Gelb festzustellen, kam es zu einer Verschiebung in den sauren pH-Bereich. Eine Verfärbung auf Blau wies auf eine Verschiebung in den alkalischen Bereich hin.

3.5.4 Nährmedien zur Überprüfung von Decarboxylase und Dihydrolase

3.5.4.1 Nährmedien zur Überprüfung von Lysin- und Ornithindecaboxylase

Prinzip:

Der Bouillon nach MØLLER (1955) wurden L-Lysin bzw. L-Ornithinhydrochlorid als Reaktionskörper hinzugegeben. In den ersten sechs bis acht Stunden erfolgte der Abbau der enthaltenen Glukose zu Säure. Der im Bouillon enthaltene pH-Indikator Bromkresolpurpur zeigte einen Farbumschlag von Violett (pH 6,7) auf Gelb (pH < 5,6). Der erniedrigte pH-Wert induzierte den nun einsetzenden Abbau von L-Lysin bzw. L-Ornithinhydrochlorid durch die entsprechende Decarboxylase der Mikroorganismen. Es entstehen Kohlendioxid und die entsprechenden Amine. Der pH-Wert steigt an, was den Testbouillon durch Indikatorumschlag wieder violett färbt. Es empfahl sich einen Kontrollnährboden ohne Zusatz der Aminosäure anzusetzen, in dem der Abbau der Glukose nochmals geprüft wurde. Dieser Kontrollnährboden blieb nach Glukoseabbau gelb, andernfalls konnte der Test nicht gewertet werden. Da es sich beim Aminosäureabbau um einen anaeroben Vorgang handelt, musste das Medium durch eine Paraffinschicht vor dem Eindringen von Sauerstoff geschützt werden.

Herstellung:

Typische Zusammensetzung der verwendeten Ornithindecaboxylase-Arginindihydrolase-Testbouillon (E.MERCK Art.Nr.1.06934):

5,0 g Pepton aus Fleisch

3,0 g Hefeextrakt

1,0 g D(+)-Glukose

0,016 g Bromkresolpurpur

Es wurden

1000 ml Aqua dest.

9,0 g Testbouillon (vgl. oben)

5,0 g L-Lysin - $C_6H_{14}N_2O_2$ (SIGMA L5501) bzw.

L-Ornithinhydrochlorid - $C_5H_{12}N_2O_2 \cdot HCl$ (SIGMA O4386)

im Dampftopf gelöst und der pH-Wert auf 6,7 eingestellt. Die Bouillon wurde zu je 5 ml in Röhrchen abgefüllt und für 15 min autoklaviert. Eine Überschichtung (ca. 5 mm) mit

sterilem Paraffinöl (E.MERCK Art.Nr. 1.07160) und ein nochmaliges Autoklavieren für 15 min schloss sich an.

Die Beimpfung der Testbouillon erfolgte von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinnadel, durch die Paraffinschicht. Sie wurde schwach am Reagenzglasrand beimpft und anschließend für vier Tage bei 30°C bebrütet.

Auswertung:

In den ersten Stunden musste der Farbumschlag auf Gelb visuell und mittels Kontrollröhrchen dokumentiert werden. Fand er nicht statt, war der Test nicht auswertbar. Blieben Test- und Kontrollröhrchen nach der 4-tägigen Bebrütung gelb, war der Test negativ zu bewerten. Erfolgte nur im Teströhrchen ein Farbumschlag von Gelb auf Violett, war das Ergebnis positiv.

3.5.4.2 Nährmedien zur Überprüfung von Arginindihydrolase

Prinzip:

Der Bouillon nach MØLLER (1955) wurde L-Arginin als Reaktionskörper zugegeben. In den ersten sechs bis acht Stunden erfolgte der Abbau der enthaltenen Glucose zu Säure. Der im Bouillon enthaltene pH-Indikator Bromkresolpurpur zeigte einen Farbumschlag von Violett (pH 6,7) auf Gelb (pH < 5,6). Ein niedriger pH-Wert induzierte den einsetzenden Abbau von L-Arginin durch die entsprechende Dihydrolase der Mikroorganismen. Es entstand Kohlendioxid und Ammoniak. Der pH-Wert stieg an, was die Testbouillon durch Indikatorumschlag wieder violett färbte. Es empfahl sich einen Kontrollnährboden ohne Zusatz der Aminosäure anzusetzen, in welchem der Abbau der Glukose nochmals geprüft wurde. Dieser Kontrollnährboden blieb nach Glukoseabbau gelb, andernfalls konnte der Test nicht gewertet werden. Da es sich beim Aminosäureabbau um einen aneroben Vorgang handelt, musste das Medium durch eine Paraffinschicht vor dem Eindringen von Sauerstoff geschützt werden.

Herstellung:

Typische Zusammensetzung der verwendeten Ornithindecaboxylase-Arginindihydrolase-Testbouillon (E.MERCK Art.Nr.1.06934)

5,0 g	Pepton aus Fleisch
3,0 g	Hefeextrakt
1,0 g	D(+)-Glukose
0,016 g	Bromkresolpurpur

Es wurden

1000 ml Aqua dest.

9,0 g Testbouillon (vgl. oben)

5,0 g L-Arginin - $C_6H_{14}N_4O_2$ (E.MERCK 1.01543)

im Dampftopf gelöst und der pH-Wert auf 6,7 eingestellt. Die Bouillon wurde zu je 5 ml in Röhren abgefüllt und für 15 min autoklaviert. Eine Überschichtung (ca. 5 mm) mit sterilem Paraffinöl (E.MERCK Art.Nr. 1.07160) und nochmaliges Autoklavieren für 15 min schloss sich an.

Die Beimpfung der Testbouillon erfolgte von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinnadel, durch die Paraffinschicht. Sie wurde schwach am Reagenzglasrand beimpft und anschließend für vier Tage bei 30°C bebrütet.

Auswertung:

In den ersten Stunden musste der Farbumschlag auf Gelb visuell und mittels Kontrollröhren dokumentiert werden. Fand er nicht statt, war der Test nicht auswertbar. Blieben Test- und Kontrollröhren gelb, war der Test negativ zu bewerten. Erfolgte nur im Teströhren ein Farbumschlag von Gelb auf Violett, war das Ergebnis positiv.

3.5.5 Aesculin-Bouillon

Prinzip:

Das dem Nährboden zugesetzte Glycosid Äsculin wurde durch Hydrolyse in Glucose und Äsculetin umgebaut. Dieses Äsculetin kann mittels Eisen-(III)-Ionen nachgewiesen werden, welches bei Zugabe sofort einen olivgrünen bis schwarzen Komplex bildet und damit die Fähigkeit der Mikroorganismen zum hydrolytischen Abbau von Aesculin darstellt.

Herstellung:

1000 ml Aqua dest

8,0 g Nutrient Broth (DIFCO 0003-17-8)

5,0 g Natriumchlorid – NaCl

wurden nach dem Schütteln und Quellen für 15 min autoklaviert, anschließend setzte man

1,0 g Aesculin - $C_{15}H_{16}O_9$ (E.MERCK Art.Nr. 842)

zu und stellte den pH-Wert des Mediums auf 7,3 ein. Die Bouillon wurde zu je 5 ml in Reagenzröhrchen gefüllt und an zwei Tagen für je 30 min im Dampftopf fraktioniert sterilisiert.

Die Bouillon wurde von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinnadel oder mit einer Öse aus der Trypton-Tryptophan-Bouillon (vgl. Abschn. 3.5.9) beimpft. Es schloss sich eine 24-stündige Bebrütung bei 30°C an.

Auswertung:

Wenn nach Zugabe von einigen Tropfen einer 10 %igen Eisen-(III)-Chlorid-Lösung (E.MERCK Art.Nr. 1.03861) ein Farbumschlag auf Olivgrün bis Schwarz festzustellen war, wurde der hydrolytische Aesculinabbau als positiv gewertet. Es sollten nur einige Tropfen der Eisen-(III)-Chlorid-Lösung zugegeben werden, damit die bräunliche Eigenfarbe der zugegebenen Lösung keine fehlerhaften Ergebnisse liefert.

3.5.6 Butandioldehydrogenase- und VOGES-PROSKAUER- Reaktion

3.5.6.1 VOGES-PROSKAUER-Reaktion (1898)

Prinzip:

Zahlreiche Mikroorganismen sind zum Abbau von Glukose zu 2,3 Butandiol, Acetoin oder Diacetyl befähigt. Diese Stoffwechselprodukte sind mittels O`MEARA-Reagenz (O`MEARA 1931), Kupfersulfatlösung (LEIFSON 1932) oder der BARRITT-Methode (BARRITT 1936) nachweisbar. Dabei werden im stark alkalischen Milieu Acetoin und 2,3 Butandiol durch Luftsauerstoff zu Diacetyl oxidiert, welche mit Guanidin, Kupferionen oder α -Naphthol stark rot gefärbte Komplexe bildet.

Der VOGES-PROSKAUER-Test hat im Laufe der Zeit mehrere Modifikationen erfahren und wurde deshalb in der Literatur in verschiedenen Zusammensetzungen und Nachweisverfahren beschrieben.

Herstellung:

1. BARRITT-Reagenz:

5,0 g α -Naphthol (E.Merck Art.Nr. 1.06223)

100 ml Ethanol abs.

Das α -Naphthol wurde im Ethanol gelöst und bis zum Gebrauch kühl gelagert.

2. Methylrot-VOGES-PROSKAUER-Bouillon (MR-VP-Bouillon)

Der MR-VP-Bouillon (E.MERCK, Art.Nr. 1.05712) besteht aus:

7,0 g Pepton aus Fleisch

5,0 g Glucose

5,0 g Phosphatpuffer

Von dem Methylrot-VOGES-PROSKAUER-Bouillon wurden 17 g in 1000 ml Aqua dest. gelöst und die Einstellung des pH-Wertes auf 6,9 überprüft. Die Bouillon wurde zu je 5ml in Röhren abgefüllt und für 15 min autoklaviert.

Die Beimpfung erfolgte von der Trypticase-Soy-Agarplatte mit einer ausgeglühten Platinöse. Die Bouillon wurde vier Tage bei 30°Celsius bebrütet, anschließend

2,0 ml 5%iges α -Naphthol (vgl. oben)

1,0 ml 40%ige Kalilauge – KOH

zugegeben und geschüttelt.

Auswertung:

Nach der Zugabe des BARRITT-Reagenzes erfolgte bei positiv zu wertender Reaktion binnen weniger Minuten ein Farbumschlag von Pink bis Rot. Blieb die Bouillon farblos bis orange (Eigenfarbe des α -Naphthols), war der VOGES-PROSKAUER-Test als negativ zu werten.

3.5.6.2 Butandioldehydrogenase-Reaktion***Prinzip:***

Zahlreiche Mikroorganismen sind in der Lage 2,3 Butandiol zu dehydrieren. Dies war mit der BARRITT-Methode (BARRITT 1936) im stark alkalischen Milieu nachweisbar.

Herstellung:

1000 ml Aqua dest.

5,0 g Proteose Pepton (DIFCO 0122-17-4)

5,0 g Dikaliumhydrogenphosphat - K_2HPO_4

wurden für 15 min im Dampftopf gelöst,

10,0 g meso-2,3-Butandiol (E.MERCK Art.Nr.818801)

zugesezt und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde mit einer Vakuumpumpe durch ein 0,22 μ m Milliporefilter (MILLIPORE CORPORATION, Bedford, Katalognr.: GSWP 047) sterilfiltriert. Dieses Sterilfiltrationsverfahren war nötig, da das meso-2,3-Butandiol nicht erhitzt werden darf. Die Bouillon wurde zu je 2 ml in sterile Reagenzröhrchen gefüllt und von der Trypticase-Sol-Agarplatte beimpft. Die Bebrütung der Bouillon erfolgte für 48 Stunden bei 30°C. Anschließend wurde

1,0 ml 5 %iges α -Naphthol (vgl.3.5.6.1)

0,5 ml 40 %ige Kalilauge - KOH

zugegeben und geschüttelt.

Auswertung:

Nach der Zugabe des BARRITT-Reagenzes erfolgte bei positiv zu wertender Reaktion binnen weniger Minuten ein Farbumschlag auf Pink bis Rot. Blieb die Bouillon farblos bis orange (Eigenfarbe des α -Naphthols), war die Butandioldehydrogenase-Reaktion als negativ zu werten.

3.5.7 Kaliumcyanid-Testbouillon

Prinzip:

Anhand dieses Tests wurde das Wachstum von *Aeromonas*-Spezies bei einer bestimmten Konzentration von Kaliumcyanid im Nährsubstrat nachgewiesen. In einem Kontrollröhrchen ohne Kaliumcyanidzusatz prüfte man parallel, ob die entsprechende Spezies überhaupt im Nährsubstrat wächst. Die Reagenzgläser mussten wegen der Verdampfung des Cyanids mit paraffinierten Korken verschlossen werden.

Herstellung:

1000 ml Aqua dest.

5,0 g Natriumchlorid - NaCl

3,0 g Proteose Pepton (DIFCO 0122-17-4)

0,225 g Kaliumdihydrogenphosphat - KH_2PO_4

5,640 g Dinatriumhydrogenphosphat - Na_2HPO_4

wurden gelöst, der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und für 15 min autoklaviert. Nach Abkühlung auf unter 30°C wurde der Testbouillon

15,0 ml 0,5%ige Kaliumcyanid-Lösung - KCN

zugesezt. Eine Bouillon ohne Kaliumcyanidzusatz wurde als Vergleichsreihe verwendet. Beide Medien wurden zu je 2 ml steril abgefüllt und mit steriler Metallkappe verschlossen. Nach der Ösenbeimpfung beider Medien aus der Trypton-Tryptophan-Bouillon verschloss man die Teströhrchen mit paraffinierten Korken, um ein Verdampfen des Kaliumcyanids zu verhindern. Um gleiche Wachstumsbedingungen zu schaffen wurde das Kontrollröhrchen der Vergleichsreihe ebenfalls verschlossen. Die Bebrütung beider Röhrchen erfolgte für 72 Stunden bei 30°C.

Auswertung:

Durch visuellen Vergleich der Trübung von zueinandergehörenden Test- und Kontrollröhrchen konnte man das Ergebnis ablesen. Eine Trübung wies auf Wachstum hin.

Der Test wurde positiv gewertet, wenn in beiden Röhrchen eine Trübung festzustellen war. Die *Aeromonas*-Spezies wies damit ein Wachstum auch bei Anwesenheit von KCN auf. War das Vergleichsmedium trüb, das KCN-Röhrchen aber klar, wurde der Test als negativ gewertet. Bei fehlendem Wachstum im Kontrollröhrchen musste der Test wiederholt werden.

3.5.8 SIMMONS-Citrat-Agar

Prinzip:

Dieser Agar wurde von SIMMONS 1926 erstmals beschrieben. Er entwickelte den vollsynthetischen Testagar um Mikroorganismen zu identifizieren, die in der Lage sind, Citrat als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Die dabei auftretende Alkalisierung wird durch einen zugesetzten Indikator angezeigt. Bei positiver Citratverwertung findet ein Farbumschlag von Grün (pH-Wert = 6,6) auf Tiefblau (pH-Wert > 8) statt.

Herstellung:

Der SIMMONS-Citrat-Fertigagar (E.MERCK Art.Nr.1.02501) besteht aus:

1,0 g	Ammoniumdihydrogenphosphat - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
1,0 g	Dikaliumhydrogenphosphat - K_2HPO_4
5,0 g	Natriumchlorid - NaCl
2,0 g	Natriumcitrat
0,2 g	Magnesiumsulfat - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,08 g	Bromtymolblau - $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$
13,0 g	Agar-Agar

Von dem SIMMONS-Citrat-Fertigagar wurden 22,5g in 1000 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert von 6,6 bei 25°C überprüft. Schrägagarröhrchen wurden mit je 4 ml des gelösten Agars gefüllt und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Vor dem Wiedererstarren des Agars mussten die Röhrchen auf einer Schrägfläche ausgelegt werden.

Die Beimpfung erfolgte durch den Ausstrich der *Aeromonas*-Reinkultur auf der Schrägfläche. Anschließend wurde eine Bebrütung für 24-48 Stunden bei 30°C vorgenommen.

Auswertung:

Der Test wurde als positiv gewertet, wenn sich der Nährboden von Grün auf Tiefblau verfärbte. Blieb der Nährboden grün, war der Test negativ, denn nur die Verwertung von Citrat führt zu einer Alkalisierung des Nährbodens und damit zum Farbumschlag des Bromtymolblaus.

3.5.9 Indol-Reaktion in der Trypton-Tryptophan-Bouillon

Prinzip:

Mit der Indol-Reaktion in der Trypton-Tryptophan-Bouillon wurde festgestellt, ob *Aeromonas*-Spezies in der Lage sind, Tryptophan zu Indol abzubauen. Das entstandene Indol lässt sich im Nährmedium mittels KOVÁCS-Reagenz nachweisen.

Herstellung:

1000 ml Aqua dest.

10,0 g Trypton (DIFCO 0123-01)

1,0 g Tryptophan - $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (E.MERCK Art.Nr. 1.08375)

5,0 g Natriumchlorid - NaCl

wurden für 30 min in Dampftopf gelöst und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Bouillon wurde zu je 5 ml in Reagenzröhrchen gefüllt und an zwei Tagen für je 30 min im Dampftopf fraktioniert sterilisiert.

Nach Beimpfung der Trypton-Tryptophan-Bouillon von der Trypticase-Soy-Agarplatte schließt sich eine 24-stündige Bebrütung bei 30°C an.

Danach wurden einige Tropfen KOVÁCS-Indolreagenz (E.MERCK Art.Nr. 9293) hinzugegeben und leicht geschüttelt.

Auswertung:

Entstand an der Oberfläche ein roter Ring, wies dies auf eine Indolproduktion hin und der Test wurde als positiv gewertet. Erfolgte keine Rotfärbung des gelblichen Reagenzes war der Indoltest negativ.

Vor der Durchführung des Indoltestes konnte man die bebrüteten Trypton-Tryptophan-Bouillon zur Beimpfung der Fermentations-, Aesculin- und Kaliumcyanid-Bouillon verwenden.

3.6 Datenauswertung mit einer Hierarchischen Clusteranalyse

Die Hierarchische Clusteranalyse (*Average Linkage, between groups*) wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 10.0 for Windows erstellt. Bei der Clusteranalyse wurden die *Aeromonas*-Biovare anhand ihrer getesteten biochemischen Eigenschaften klassifiziert und ähnliche Biovare zu Gruppen zusammen gefasst. Als Analyseergebnis wurde ein Agglomerationsverzeichnis erstellt.

Im Verzeichnis werden in Spalte „*Stage*“ die Stufen der Hierarchischen Clusteranalyse, in Spalte „*Cluster Combined*“ die kombinierten Cluster und in Spalte „*Coefficient*“ die dazugehörigen Koeffizienten angegeben. Der Wert des Koeffizienten ist ein Maß für die Ähnlichkeit der Biovare. Je geringer der Zahlenwert ausfällt, je ähnlicher sind sich die analysierten Biovare. Der Spalte „*Stage Cluster First Appears*“ kann entnommen werden, welcher Stufe der Clusteranalyse die verglichene Gruppe entstammen. Der Wert „0“ steht für einer neuen der Analyse hinzugezogenen Biovar. Unter Spalte „*Next Stage*“ ist die Nummer des Analyseschrittes angegeben, in der diese Gruppe weiter klassifiziert wird. Die jetzt zusammengefasste Gruppe erhält dabei den Zahlenwert der unter „*Cluster Combined*“ erstgenannten Gruppe. Die graphische Darstellung der Hierarchischen Clusteranalyse erfolgt in einem dichotom aufgegliederten Dendrogramm.

4. ERGEBNISSE

4.1 Gesamtkoloniezahlbestimmung der aufgearbeiteten Proben

Die Koloniezahlbestimmung lieferte für die einzelnen unbehandelten Proben sehr unterschiedliche Ergebnisse (vgl. Tab. I im Anhang).

So konnten aus den Proben 1 und 7 keine *Aeromonas* isoliert werden. Aus den Proben 2 und 4 wurden mit über 10^3 koloniebildenden Einheiten pro ml (KBE/ml) eine hohe Anzahl von *Aeromonas*-Kolonien angezchtet, aus der Probe 6 wurden ca. 10^3 KBE/ml und aus den Proben 3 und 5 ca. 10^2 KBE/ml isoliert (vgl. Tab. I im Anhang und Abb. 4.1).

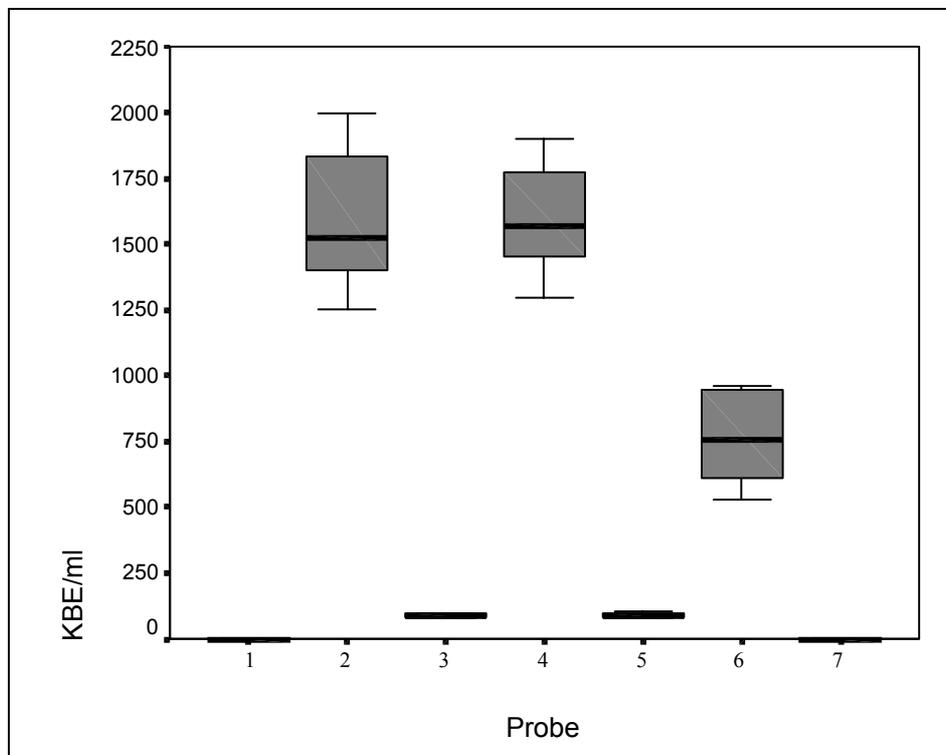


Abb. 4.1: Übersicht der Koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml in unbehandelter Probe. Graue Box: Interquartilbereich, schwarzer Strich: Medianwert der Gruppe, Balken: Extremwerte

Nach Umrechnung der Besiedlungsrate auf Flächeneinheiten ergaben sich für die Proben 2 und 4 die höchste Besiedlungsdichte mit $<10^3$ KBE/cm². Bei den Proben 3, 5 und 6 wurden weniger als 10^2 KBE/cm² nachgewiesen (vgl. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Übersicht der KBE/ml, der Gesamtkoloniezahl im entnommenen Rohrabschnitt und der Koloniedichte KBE/cm² in unbehandelter Probensuspension.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
mittlere KBE/ml	0	1588	83	1592	82	760	0
Gesamt-KBE	0	$1,5 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$	0
KBE/cm ²	0	475	24	746	32	75	0

Die mit Tween® vorbehandelten Proben lieferten bei der Koloniezahlbestimmung ähnliche Ergebnisse wie die unbehandelten Proben. So konnten auch hier aus den Proben 1 und 7 keine *Aeromonas* isoliert werden. Aus den Proben 2, 4 und 6 wurden die meisten *Aeromonas*-Kolonien angezüchtet, während die Werte für die koloniebildenden Einheiten aus den Proben 3 und 5 deutlich geringer waren (vgl. Tab. II im Anhang und Abb. 4.2).

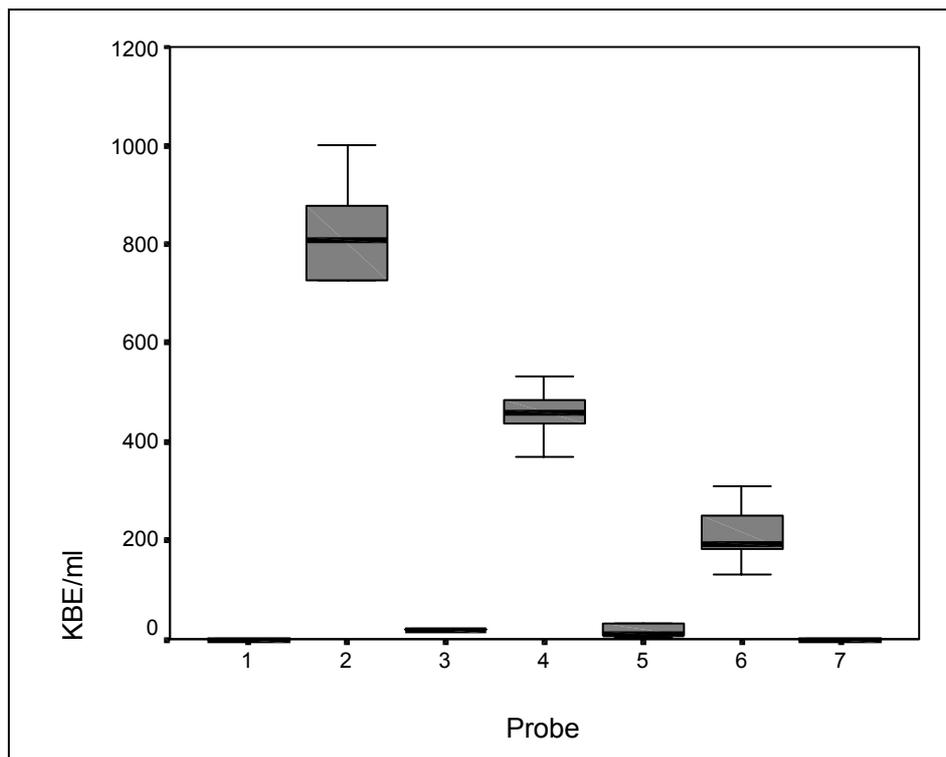


Abb. 4.2: Übersicht der Koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml in mit Tween® behandelter Probe. Graue Box: Interquartilbereich, schwarzer Strich: Medianwert der Gruppe, Balken: Extremwerte

Nach Umrechnung der Besiedlungsrate auf Flächeneinheiten ergaben sich für die mit Tween® behandelten Proben etwas höhere Besiedlungsraten als bei den unbehandelten Proben. Auch hier wurden für die Proben 2 und 4 die höchste Besiedlungsdichte mit $\approx 10^3$ KBE/cm² ermittelt. Bei der Probe 6 wurden $2 \cdot 10^2$ KBE/cm², den Proben 3 und 5 weniger als 10^2 KBE/cm² nachgewiesen (vgl. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Übersicht der KBE/ml, der Gesamtkoloniezahl im entnommenen Rohrabschnitt und der Koloniedichte KBE/cm² in mit Tween® behandelte Probensuspension.

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
mittlere KBE/ml	0	70	2	4	20	20	0
Gesamt-KBE	0	$6,5 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	0
KBE/cm ²	0	2093	58	2018	78	208	0

4.2 Ergebnisse der Probe 1

Aus Probe 1 waren keine *Aeromonas*-Arten zu isolieren. Dies gelang weder aus der unbehandelten noch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Eine Besiedlung der Rohrrinnenoberfläche durch vermehrungsfähige Aeromonaden konnte somit nicht nachgewiesen werden.

4.3 Ergebnisse der Probe 2

Aus der Rohrprobe 2 konnten Kolonien der Gattung *Aeromonas* angezüchtet werden. Dies gelang sowohl aus der unbehandelten als auch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe auf Oberflächenplatten (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Die Besiedlungsdichte für die Rohrrinnenoberfläche lag bei 475 KBE/cm² (vgl. Tab 4.1).

Alle isolierten *Aeromonas*-Kolonien gehörten der Art *A. hydrophila* an. Nach POPOFF et al. (1981) konnten 118 der 120 Kolonien als *A. hydrophila* 316 angesprochen werden. Sechs von ihnen waren dabei Aesculin negativ. Zwei der angezüchteten Kolonien konnten nicht in das Schema (POPOFF & VERON 1976, POPOFF et al. 1981) eingeteilt werden und wurden deshalb als *A. hydrophila* ssp. bezeichnet (vgl. Tab. 4.3 und Abb. 4.3).

Tab.4.3: Einteilung der isolierten *Aeromonas*-Kolonien aus Probe 2 nach Phänotypen (P: positiver Test, N: negativer Test)

Phänotyp	A. hydrophila 316 (Aesculin-negativ)	A. hydrophila 316	A. hydrophila ssp.
isolierte Stämme	6	112	2
Glucose-Gasbildung	P	P	P
Aesculin-Fermentation	N	P	P
Arabinose-Fermentation	P	P	P
Mannitol-Fermentation	P	P	P
Saccharose-Fermentation	P	P	P
Arginindihydrolase	P	P	P
Lysin-dehydrogenase	P	P	P
Ornithin-dehydrogenase	N	N	N
Butandioldehydrogenasereaktion	P	P	P
Lactat-Verwertung	N	N	P
Rhamnose-Verwertung	N	N	N

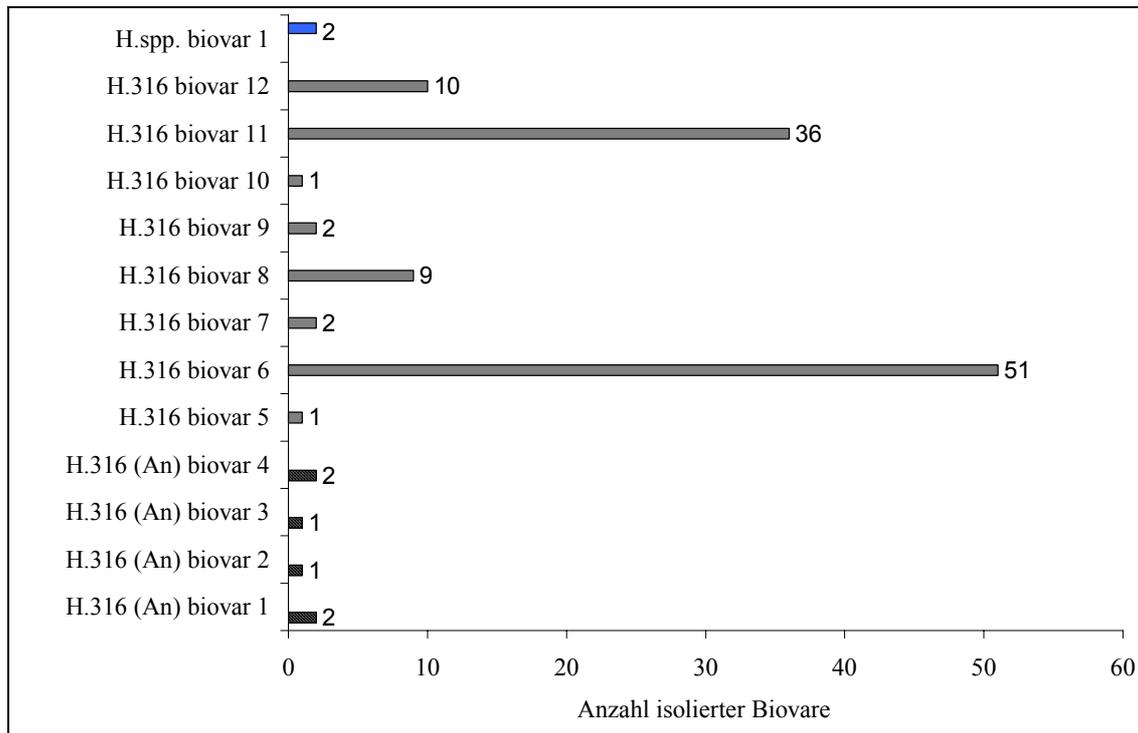


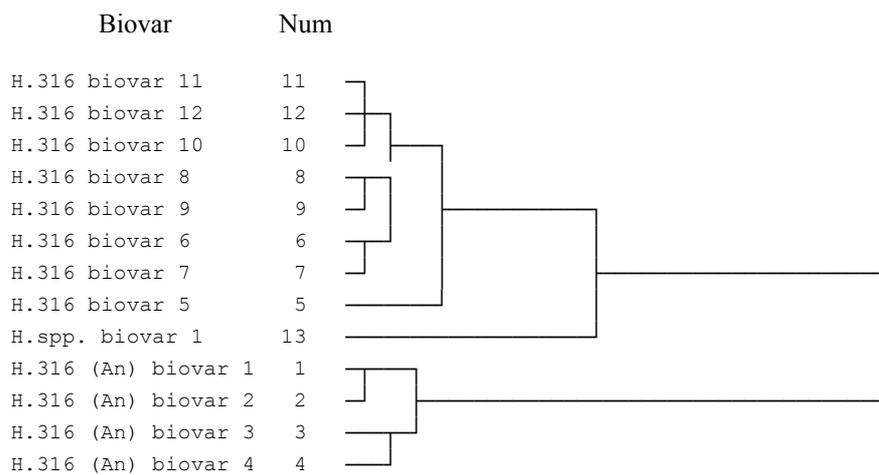
Abb.4.4: Übersicht der isolierten Biovare aus Probe 2 grau-schwarz: *A. hydrophila* 316 (Aesculin negativ), grau: *A. hydrophila* 316, blau: *A. hydrophila* spp.

Viele weitere biochemische Tests lieferten für alle isolierten *Aeromonas*-Kolonien der Probe 2 gleiche Ergebnisse und trugen somit nicht zur weiteren Unterteilung der *Aeromonas*-Arten bei (vgl. Tab. III und IV im Anhang).

Anhand einer Hierarchischen Clusteranalyse wurden die isolierten Biovare ihren biochemischen Eigenschaften nach klassifiziert. Die *Aeromonas*-Kolonien der Probe 2 bildeten drei größere Gruppen (vgl. Abb. 4.5). Diese Gruppeneinteilung nach biochemischen Eigenschaften entsprach der Artuntergliederung nach POPOFF et al.(1981): *A. hydrophila* 316, *A. hydrophila* 316 (Aesculin negativ) und *A. hydrophila* spp. (vgl. Tab. 4.3). Innerhalb der Gruppen waren die *Aeromonas*-Kolonien sehr ähnlich (vgl. niedriger Koeffizient in Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Agglomerationsverzeichnis der Probe 2 (vgl.3.6).

Stage	Cluster Combined		Coefficients	Stage Cluster First Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2		Cluster 1	Cluster 2	
1	11	12	1,000	0	0	5
2	8	9	1,000	0	0	6
3	6	7	1,000	0	0	6
4	1	2	1,000	0	0	9
5	10	11	1,500	0	1	8
6	6	8	2,000	3	2	8
7	3	4	2,000	0	0	9
8	6	10	2,333	6	5	10
9	1	3	2,500	4	7	12
10	5	6	3,857	0	8	11
11	5	13	6,625	10	0	12
12	1	5	18,639	9	11	0

Abb. 4.5: Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse von Probe 2. Num: Biovarnummerierung von Tab. 4.5 unter „Cluster Combined“, H.: *Aeromonas hydrophila*, An: Aesculin negativ

4.4 Ergebnisse der Probe 3

Aus der Rohrprobe 3 konnten Kolonien der Gattung *Aeromonas* angezüchtet werden. Dies gelang sowohl aus der unbehandelten als auch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe auf Oberflächenplatten (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Die Besiedlungsdichte für die Rohrrinnenoberfläche lag bei 24 KBE/cm² (vgl. Tab 4.1).

Von den isolierten *Aeromonas*-Kolonien wurden 96% der Art *A. hydrophila* und 4% der Art *A. sobria* zugeordnet. Die *A. sobria* wurden dabei in einen Aesculin-positiven und einen Aesculin-negativen Typ unterteilt. Von den 116 isolierten *A. hydrophila* waren 23 Aesculin-negativ, 10 Stämme zeigten eine negative Arabinose-Reaktion. Die anderen 83 *A. hydrophila* wurden nach POPOFF et al. (1981) in 4 *A. hydrophila* 212, 43 *A. hydrophila* 218 und 13 *A. hydrophila* 316 unterteilt. 23 Stämme wurden als *A. hydrophila* spp. angesprochen, da keine Einteilung in das POPOFF-Schema möglich war (vgl. Tab. 4.6 und Abb. 4.6).

Tab.4.6 Einteilung der isolierten *Aeromonas*-Kolonien aus Probe 3 nach Phänotypen (P: positiver Test, N: negativer Test)

	A. sobria	A. sobria (Aesculin negativ)	A. hydrophila (Arabinose neg.)	A. hydrophila 316 (Aesculin-neg.)	A. hydrophila spp. (Aesculin-neg.)	A. hydrophila 212	A. hydrophila 218	A. hydrophila 316	A. hydrophila spp.
isolierte Stämme	3	1	10	17	6	4	43	13	23
Glucose-Gasbildung	N	N	P	P	P	P	P	P	P
Aesculin-Fermentation	P	N	P	N	N	P	P	P	P
Arabinose-Fermentation	P	P	N	P	P	P	P	P	P
Mannitol-Fermentation	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Saccharose-Fermentation	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Arginindihydrolase	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Lysinhydrogenase	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ornithinhydrogenase	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Butandiolhydrogenase	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Lactat-Verwertung	N	N	N	N	P	P	N	N	P
Rhamnose-Verwertung	N	N	N	N	N	P	P	N	N

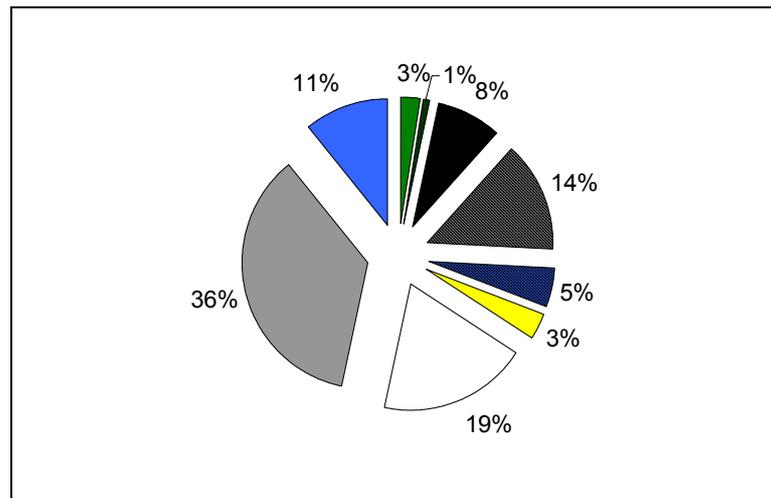


Abb. 4.6: Übersicht der prozentualen Verteilung der isolierten Phänotypen aus Probe 3. grün: *A. sobria*, grün-schwarz: *A. sobria* (Aesculin negativ), schwarz: *A. hydrophila* (Arabinose negativ), grau-schwarz: *A. hydrophila* 316 (Aesculin negativ), blau-schwarz: *A. hydrophila* ssp. (Aesculin negativ), gelb: *A. hydrophila* 212, weiß: *A. hydrophila* 218, grau: *A. hydrophila* 316, blau: *A. hydrophila* ssp.

Die drei *A. sobria* wurden aufgrund weiterer biochemischer Eigenschaften in drei Biovare unterteilt. Der Aesculin negative *A. sobria* Stamm wurde nur einmal isoliert. Die zehn Arabinose negativen *A. hydrophila* ssp. Kolonien wurden in sechs, die Aesculin negativen *A. hydrophila* 316 und *A. hydrophila* ssp. in 11 bzw. drei Biovare unterteilt. Die weiteren *A. hydrophila* untergliederten sich in sieben *A. hydrophila* ssp., vier *A. hydrophila* 212, 21 *A. hydrophila* 218 und acht *A. hydrophila* 316 Biovare. Die meisten so zugeordneten Biovare hatten lediglich noch einen isolierten Vertreter. Die größte Gruppe bildete *A. hydrophila* ssp. Biovar 6 mit 11 isolierten Kolonien (vgl. Tab. 4.7a,b).

Weitere biochemische Tests lieferten für alle isolierten *Aeromonas*-Kolonien der Probe 3 gleiche Ergebnisse und trugen somit nicht zur weiteren Unterteilung der *Aeromonas*-Arten bei (vgl. Tab. III und IV im Anhang).

Anhand einer Hierarchischen Clusteranalyse wurden die Biovare ihren biochemischen Eigenschaften nach klassifiziert. Die *Aeromonas*-Kolonien der Probe 3 bildeten 9 größere Gruppen (vgl. Abb. 4.8) Innerhalb der Gruppen waren die *Aeromonas*-Kolonien sehr ähnlich (vgl. niedriger Koeffizient in Tab. 4.8).

Tab. 4.7b: Weitere Unterteilung der eingeteilten Phänotypen aus Probe 3 nach biochemischen Eigenschaften (P: positiver Test, N: negativer Test, H.: *Aeromonas hydrophila*).

	H.212 biovar 1	H.212 biovar 2	H.212 biovar 3	H.212 biovar 4	H.218 biovar 1	H.218 biovar 2	H.218 biovar 3	H.218 biovar 4	H.218 biovar 5	H.218 biovar 6	H.218 biovar 7	H.218 biovar 8	H.218 biovar 9	H.218 biovar 10	H.218 biovar 11	H.218 biovar 12	H.218 biovar 13	H.218 biovar 14	H.218 biovar 15	H.218 biovar 16	H.218 biovar 17	H.218 biovar 18	H.218 biovar 19	H.218 biovar 20	H.218 biovar 21	H.316 biovar 1	H.316 biovar 2	H.316 biovar 3	H.316 biovar 4	H.316 biovar 5	H.316 biovar 6	H.316 biovar 7	H.316 biovar 8		
Isoliert Stämme	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	2	2	6	1	2	2	2	2	3	3	1	2	2	3	3	1	3	1	2	1	1	1		
Arbutin-Fermentation	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	
Cellubiose-Fermentation	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fucose-Fermentation	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Galactose-Fermentation	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N
Methyl-d-Glucosid-Fermentation	N	N	N	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P
Palatinose-Fermentation	P	P	P	P	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Pyranose 3Methyl-O-Fermentation	N	N	N	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N
Rhamnose-Fermentation	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Salicin-Fermentation	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	P
Sorbitol-Fermentation	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	N	N	N	P
Trehalose-Fermentation	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Glycerol-Gasbildung	N	P	P	P	N	N	P	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	P	P	
Mannitol-Gasbildung	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
KCN-Wachstum	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Alanin-Verwertung	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N
Arginin-Verwertung	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Cystein-Verwertung	P	N	P	N	P	P	P	N	N	P	P	P	N	P	N	N	P	P	P	N	N	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N	P	P	P

Tab. 4.8: Agglomerationsverzeichnis der Probe 3 (vgl.3.6).

Stage	Cluster Combined		Coefficients	Stage Cluster First Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2		Cluster 1	Cluster 2	
1	57	60	1.000	0	0	15
2	54	56	1.000	0	0	33
3	53	55	1.000	0	0	16
4	51	52	1.000	0	0	17
5	49	50	1.000	0	0	17
6	43	48	1.000	0	0	18
7	46	47	1.000	0	0	22
8	36	37	1.000	0	0	24
9	26	35	1.000	0	0	19
10	21	22	1.000	0	0	34
11	18	19	1.000	0	0	20
12	15	16	1.000	0	0	32
13	13	14	1.000	0	0	41
14	6	7	1.000	0	0	35
15	57	59	1.500	1	0	21
16	45	53	1.500	0	3	22
17	49	51	1.500	5	4	24
18	42	43	1.500	0	6	36
19	26	34	1.500	9	0	43
20	17	18	1.500	0	11	32
21	57	58	1.667	15	0	53
22	45	46	1.833	16	7	33
23	61	63	2.000	0	0	44
24	36	49	2.000	8	17	31
25	38	39	2.000	0	0	45
26	31	33	2.000	0	0	46
27	27	28	2.000	0	0	47
28	24	25	2.000	0	0	39
29	8	9	2.000	0	0	35
30	2	3	2.000	0	0	55
31	36	41	2.167	24	0	37
32	15	17	2.167	12	20	40
33	45	54	2.500	22	2	37
34	12	21	2.500	0	10	40
35	6	8	2.500	14	29	48
36	42	44	2.667	18	0	42
37	36	45	2.959	31	33	42
38	62	64	3.000	0	0	44
39	23	24	3.000	0	28	56
40	12	15	3.000	34	32	41
41	12	13	3.125	40	13	50
42	36	42	3.143	37	36	51
43	26	32	3.667	19	0	54
44	61	62	4.000	23	38	53
45	38	40	4.000	25	0	51
46	30	31	4.000	0	26	54
47	27	29	4.000	27	0	49
48	5	6	4.250	0	35	52
49	11	27	4.333	0	47	58
50	12	20	5.000	41	0	56
51	36	38	5.167	42	45	58
52	5	10	5.200	48	0	61
53	57	61	5.875	21	44	57
54	26	30	5.917	43	46	57
55	1	2	6.000	0	30	60
56	12	23	6.879	50	39	62
57	26	57	9.214	54	53	59
58	11	36	9.369	49	51	59
59	11	26	12.261	58	57	61
60	1	4	23.000	55	0	63
61	5	11	26.242	52	59	62
62	5	12	28.404	61	56	63
63	1	5	33.250	60	62	0

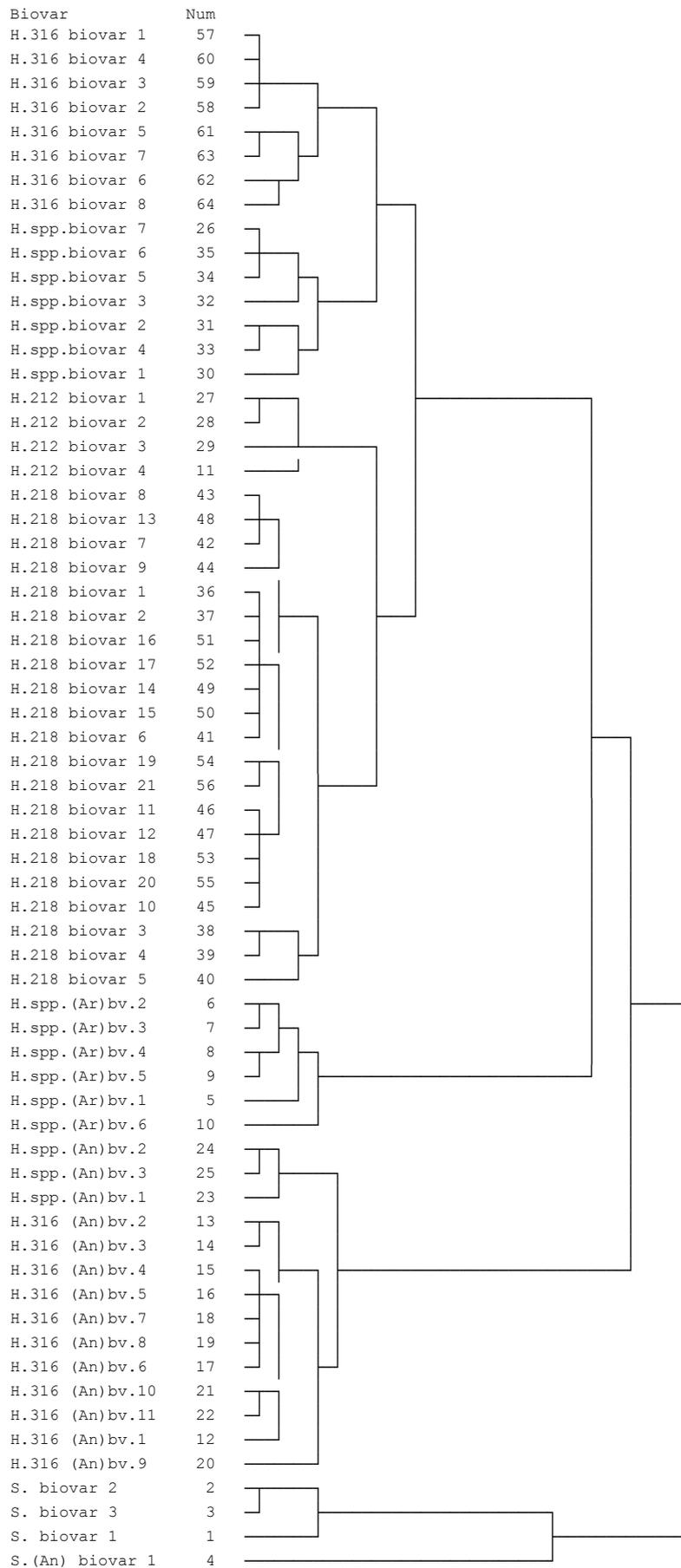


Abb. 4.8: Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse von Probe 3. Num: Biovarnummerierung von Tab. 4.8 unter „Cluster Combined“, H.: *A. hydrophila*, S.: *A. sobria*

4.5 Ergebnisse der Probe 4

Aus der Rohrprobe 4 konnten Kolonien der Gattung *Aeromonas* angezüchtet werden. Dies gelang sowohl aus der unbehandelten als auch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe auf Oberflächenplatten (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Die Besiedlungsdichte für die Rohrrinnenoberfläche lag bei 746 KBE/cm² (vgl. Tab 4.1). Die isolierten *Aeromonas*-Kolonien gehörten alle der Art *A. hydrophila* an. Nach POPOFF et al. (1981) konnten 117 der 120 Kolonien als *A. hydrophila* 316 und drei Kolonien als *A. hydrophila* 218 angesprochen werden (vgl. Tab. 4.9 und Abb. 4.9).

Tab.4.9 Einteilung der isolierten *Aeromonas*-Kolonien aus Probe 4 nach Phänotypen.
(P: positiver Test, N: negativer Test)

Phänotyp	A. hydrophila 316	A. hydrophila 218
isolierte Stämme	117	3
Glucose-Gasbildung	P	P
Aesculin-Fermentation	P	P
Arabinose-Fermentation	P	P
Mannitol-Fermentation	P	P
Saccharose-Fermentation	P	P
Arginindihydrolase	P	P
Lysinhydrogenase	P	P
Ornithinhydrogenase	N	N
Butandioldehydrogenasereaktion	P	P
Lactat-Verwertung	N	N
Rhamnose-Verwertung	N	P

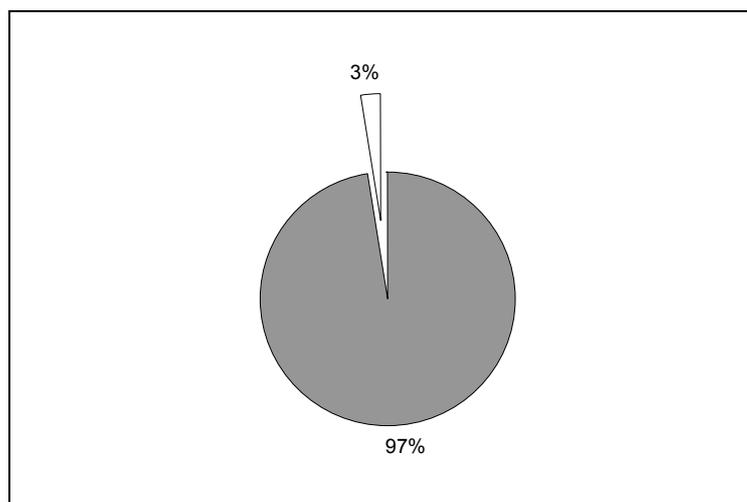


Abb. 4.9 Übersicht der prozentualen Verteilung der isolierten Phänotypen aus Probe 4.
grau: *A. hydrophila* 316, weiß: *A. hydrophila* 218.

Die 117 isolierten *A. hydrophila* 316 wurden aufgrund weiterer biochemischer Eigenschaften in acht Biovare unterteilt. Diese kamen dabei mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit vor. Den *A. hydrophila* 316 Biovaren 1 und 2 gehörten ca. 40 % aller isolierten Kolonien aus Probe 4 an. Von den Biovaren 7 und 8 wurde nur ein Vertreter isoliert. *A. hydrophila* 218 konnte anhand der Tests nicht weiter unterteilt werden (vgl. Tab. 4.10 und Abb. 4.10).

Tab 4.10 weitere Unterteilung der eingeteilten Phänotypen aus Probe 4 nach biochemischen Eigenschaften (P: positiver Test, N: negativer Test)

	H. 316 biovar 1	H. 316 biovar 2	H. 316 biovar 3	H. 316 biovar 4	H. 316 biovar 5	H. 316 biovar 6	H. 316 biovar 7	H. 316 biovar 8	H. 218 biovar 1
isolierte Stämme.	48	51	2	2	5	7	1	1	3
Glucerosl- Gasbildung	P	N	P	N	P	N	P	N	N
Methyl-d-Glycosid-Fermentation	P	P	N	N	P	P	P	P	P
Salicin-Fermentation	P	P	P	P	N	N	N	P	P
Cellulose-Fermentation	P	P	P	P	P	P	N	N	P

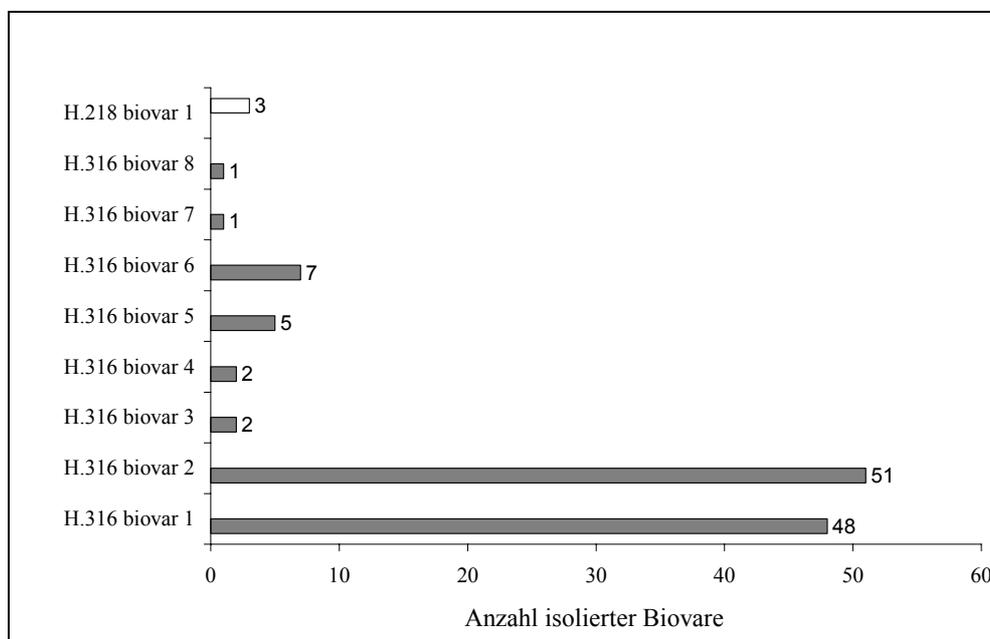


Abb. 4.10: Übersicht der isolierten Biotypen aus Probe 4. grau: *A. hydrophila* 316, weiß: *A. hydrophila* 218

Viele weitere biochemische Tests lieferten für alle isolierten *Aeromonas*-Kolonien der Probe 4 gleiche Ergebnisse und trugen somit nicht zur weiteren Unterteilung der *Aeromonas*-Arten bei (vgl. Tab. III und IV im Anhang).

Anhand einer Hierarchischen Clusteranalyse wurden die Biovare ihren biochemischen Eigenschaften nach klassifiziert. Die *Aeromonas*-Kolonien der Probe 4 bildeten zwei Gruppen (vgl. Abb. 4.11) Diese Gruppeneinteilung entsprach der Artuntergliederung anhand der biochemischen Eigenschaften nach POPOFF et al. (1981): *A. hydrophila* 316 und *A. hydrophila* 218 (vgl. Tab. 4.9). Die *A. hydrophila* 316 waren sich sehr ähnlich (vgl. Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Agglomerationsverzeichnis der Probe 4 (vgl. 3.6).

Stage	Cluster Combined		Coefficients	Stage Cluster First Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2		Cluster 1	Cluster 2	
1	2	8	1,000	0	0	4
2	5	7	1,000	0	0	5
3	3	4	1,000	0	0	7
4	2	6	1,500	1	0	6
5	1	5	1,500	0	2	6
6	1	2	2,000	5	4	7
7	1	3	2,333	6	3	8
8	1	9	5,375	7	0	0

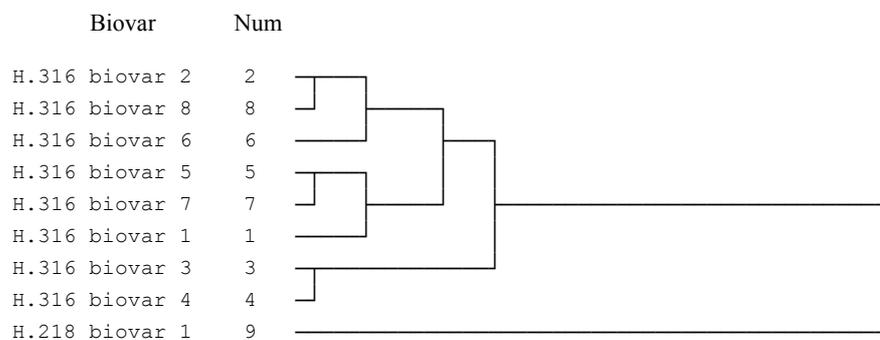


Abb. 4.11: Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse von Probe 4 (Num: Biovarnummerierung für Tab.4.5 unter „Cluster Combined“, H.: *A. hydrophila*).

4.6 Ergebnisse der Probe 5

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten mittels Overlayertechnik erfolgte erst ab Probe 5. Es wurden nur 22 statt 120 Kolonien untersucht, da sich viele Vertreter der von Oberflächenplatten überimpften Keime während der Tests in der bunten Reihe nicht als Mitglieder der Gattung *Aeromonas* erwiesen, obwohl sie auf DFS-Platten wuchsen und eine positive Cytochromoxidase-Reaktion zeigten. Der Versuch weitere

Aeromonas-Arten aus der noch vorhandenen, mehrere Tage alten Probensuspension zu isolieren schlug auch mittels Overlayertechnik fehl. Mit den 22 isolierten Kolonien der Gattung *Aeromonas* wurde dann analog der weiteren Proben verfahren.

Die Besiedlungsdichte für die Rohrrinnenoberfläche lag bei 32 KBE/cm² (vgl. Tab 4.1). Alle aus Probe 5 isolierten *Aeromonas*-Stämme wurden der Art *A. caviae* zugeteilt. Es konnte eine weitere Unterteilung in *A. caviae* vom Typ *punktata* 239 erfolgen (vgl. Tab.4.12 und Abb. 4.12).

Tab.4.12 Einteilung der isolierten *Aeromonas*-Kolonien aus Probe 5 nach Phänotyp (P: positiver Test, N: negativer Test)

Phänotyp	<i>A. caviae</i> Punktata-Typ 239
isolierte Stämme	22
Glucose-Gasbildung	N
Aesculin-Fermentation	P
Arabinose-Fermentation	P
Mannitol-Fermentation	P
Saccharose-Fermentation	P
Arginindihydrolase	P
Lysinhydrogenase	P
Ornithinhydrogenase	N
Butandiolhydrogenasereaktion	P

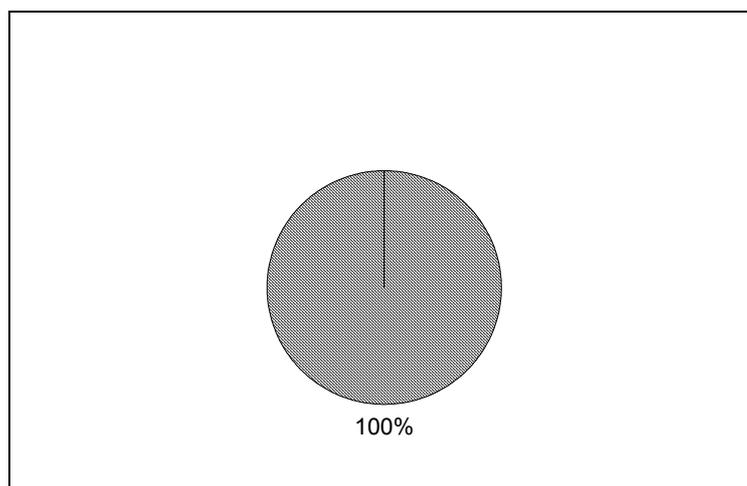


Abb. 4.12 Übersicht der prozentualen Verteilung der isolierten Phänotypen aus Probe 5. schwarz weiß: *A. punktata* 239

Die isolierten *A. caviae* vom Punktata-Typ 239 konnten aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften in zwei Biovare unterteilt werden. Dabei wurden rund 70% dem Biovar 1 zugeordnet (vgl. Abb. 4.13). Die Unterscheidung der beiden Biovare

war an fünf der getesteten Eigenschaften zu erkennen (vgl. Tab. 4.13). Eine Hierarchische Clusteranalyse wurde nicht durchgeführt, da für eine solche Analyse mehr als zwei Gruppen zu Verfügung stehen müssen.

Tab 4.13: Weitere Unterteilung der eingeteilten Phänotypen aus Probe 5 nach biochemischen Eigenschaften (P: positiver Test, N: negativer Test)

Subspezies	P.239 biovar 1	P.239 biovar 2
isolierte Stämme.	16	6
Raffinose-Fermentation	P	N
Alanin-Verwertung	P	N
Cystein-Verwertung	P	N
Histidin-Verwertung	P	N
Prolin-Verwertung	P	N
Rhamnose-Verwertung	P	N

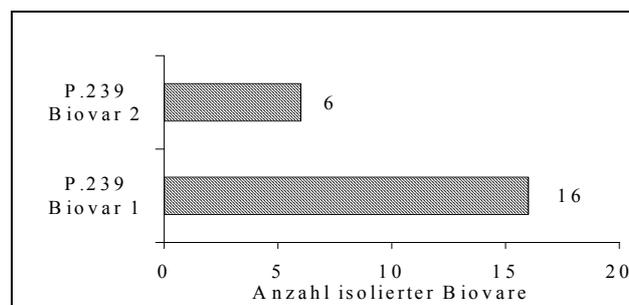


Abb. 4.13: Übersicht der isolierten Biotypen aus Probe 5 . schwarz weiß: *A. punktata* 239

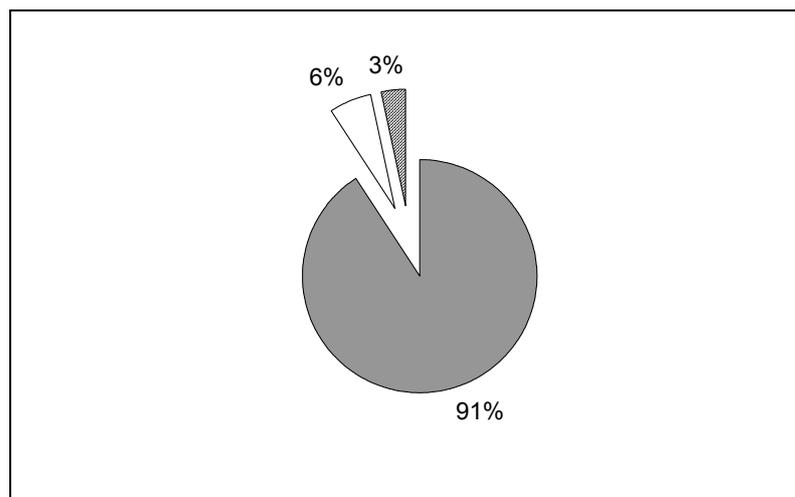
4.7 Ergebnisse der Probe 6

Aus der Rohrprobe 6 konnten Kolonien der Gattung *Aeromonas* angezüchtet werden. Dies gelang sowohl aus der unbehandelten, als auch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe auf Oberflächenplatten (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Die Besiedlungsdichte für die Rohrrinnenoberfläche lag bei 75 KBE/cm² (vgl. Tab 4.1).

Von den isolierten *Aeromonas*-Kolonien gehörten 97 % der Art *A. hydrophila* und 3 % der Art *A. caviae* an. Nach POPOFF et al. (1981) konnten 109 der 120 Kolonien als *A. hydrophila* 316 und 7 Kolonien als *A. hydrophila* 218 angesprochen werden (vgl. Tab. 4.14 und Abb. 4.14).

Tab. 4.14: Einteilung der isolierten *Aeromonas*-Kolonien aus Probe 6 nach Phänotypen (P: positiver Test, N: negativer Test)

Phänotyp	<i>A. hydrophila</i> 316	<i>A. hydrophila</i> 218	<i>A. caviae</i> Punktata-Typ 545
isolierte Stämme	109	7	4
Glucose-Gasbildung	P	P	N
Aesculin-Fermentation	P	P	P
Arabinose-Fermentation	P	P	P
Mannitol-Fermentation	P	P	P
Saccharose-Fermentation	P	P	P
Arginindihydrolase	P	P	P
Lysin-dehydrogenase	N	N	N
Ornithin-dehydrogenase	P	P	P
Butandioldehydrogenasereaktion	P	P	P
Lactat-Verwertung	N	N	N
Rhamnose-Verwertung	N	P	N

Abb. 4.14 Übersicht über die prozentuale Verteilung der isolierten Phänotypen aus Probe 6. grau: *A. hydrophila* 316, weiß: *A. hydrophila* 218, schwarz weiß: *A. caviae* Punktata-Typ 545

Die vier *A. caviae* wurden aufgrund weiterer biochemischer Eigenschaften in drei Biovare unterteilt. Die 109 *A. hydrophila* 316 wurden in 27 Biovare unterteilt. Dabei kamen die Biovare 3, 7 und 9 ca. 10 % der isolierten Kolonien relativ häufig vor, während die anderen Biovare mit nicht mehr als 5 % vertreten waren. Die sieben *A. hydrophila* 218 unterteilten sich in fünf verschiedene Biovare (vgl. Tab. 4.15 und Abb. 4.15).

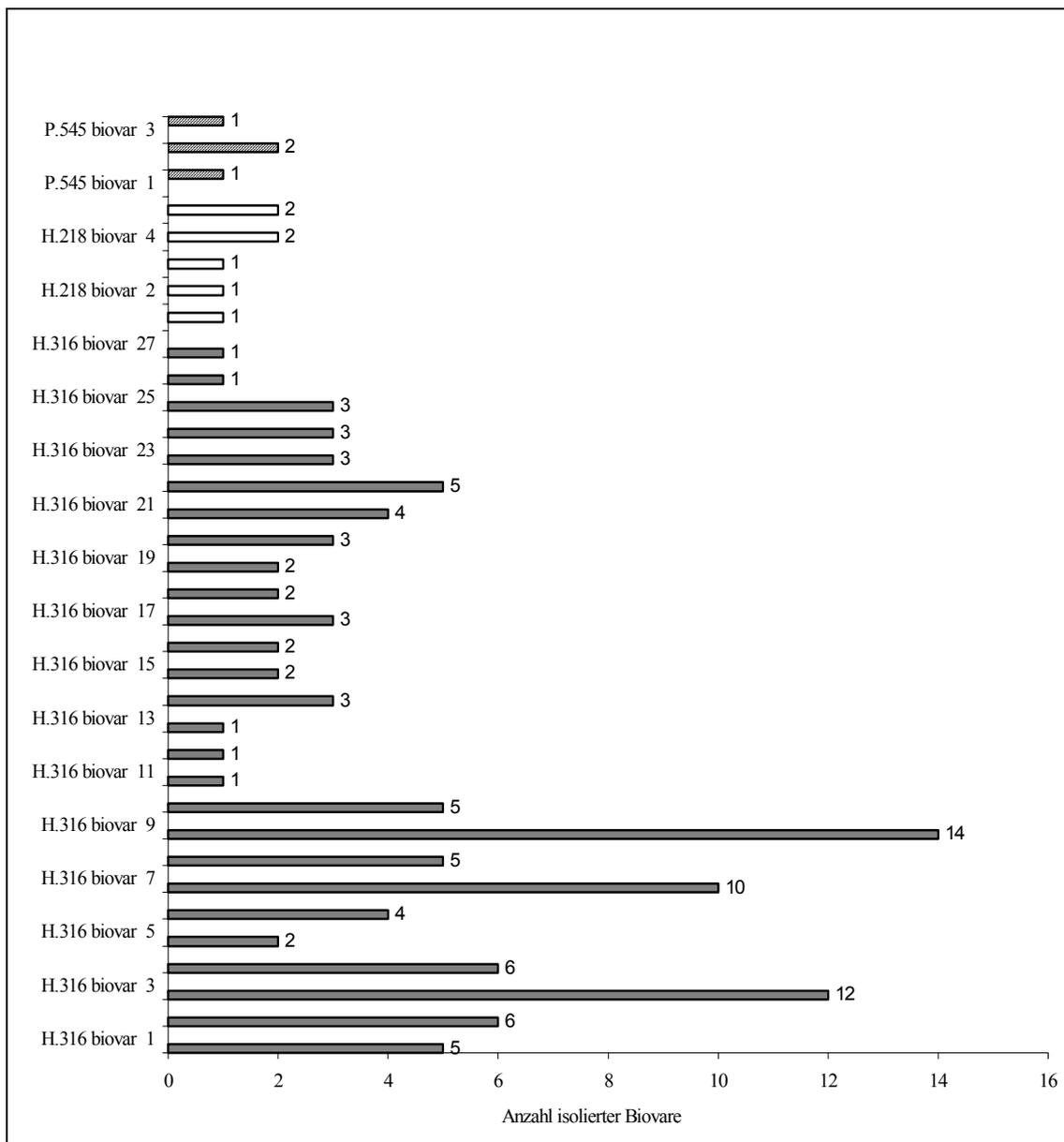


Abb. 4.15 Übersicht der isolierten Biovare aus Probe 2. grau: *A. hydrophila* 316, weiß: *A. hydrophila* 218, schwarz weiß: *A. punctata* 545

Weitere biochemische Tests lieferten für alle isolierten *Aeromonas*-Kolonien der Probe 6 gleiche Ergebnisse und trugen somit nicht zur weiteren Unterteilung der *Aeromonas*-Arten bei (vgl. Tab. III und IV im Anhang).

Anhand einer Hierarchischen Clusteranalyse wurden die Biovare ihren biochemischen Eigenschaften nach klassifiziert. Die *Aeromonas*-Kolonien der Probe 6 bildeten drei Gruppen (vgl. Abb. 4.16) Diese Gruppeneinteilung entsprach der Artuntergliederung anhand der biochemischen Eigenschaften: *A. hydrophila* 316, *A. hydrophila* 218 und *A. caviae* (vgl. Tab. 4.16).

Tab. 4.16: Agglomerationsverzeichnis der Probe 6 (vgl.3.6).

Stage	Cluster Combined		Coefficients	Stage Cluster First Appears		Next Stage
	Cluster 1	Cluster 2		Cluster 1	Cluster 2	
1	21	27	1,000	0	0	14
2	22	26	1,000	0	0	13
3	23	25	1,000	0	0	12
4	10	24	1,000	0	0	16
5	19	20	1,000	0	0	15
6	17	18	1,000	0	0	23
7	3	16	1,000	0	0	14
8	2	15	1,000	0	0	18
9	13	14	1,000	0	0	22
10	7	12	1,000	0	0	22
11	5	6	1,000	0	0	17
12	9	23	1,500	0	3	24
13	8	22	1,500	0	2	26
14	3	21	1,500	7	1	25
15	1	19	1,500	0	5	18
16	10	11	1,500	4	0	23
17	4	5	1,500	0	11	25
18	1	2	1,833	15	8	26
19	34	35	2,000	0	0	31
20	30	32	2,000	0	0	28
21	28	29	2,000	0	0	28
22	7	13	2,000	10	9	27
23	10	17	2,167	16	6	24
24	9	10	2,333	12	23	27
25	3	4	2,333	14	17	29
26	1	8	2,467	18	13	30
27	7	9	2,688	22	24	29
28	28	30	3,000	21	20	32
29	3	7	3,012	25	27	30
30	1	3	3,191	26	29	33
31	33	34	4,000	0	19	34
32	28	31	4,500	28	0	33
33	1	28	7,141	30	32	34
34	1	33	19,479	33	31	0

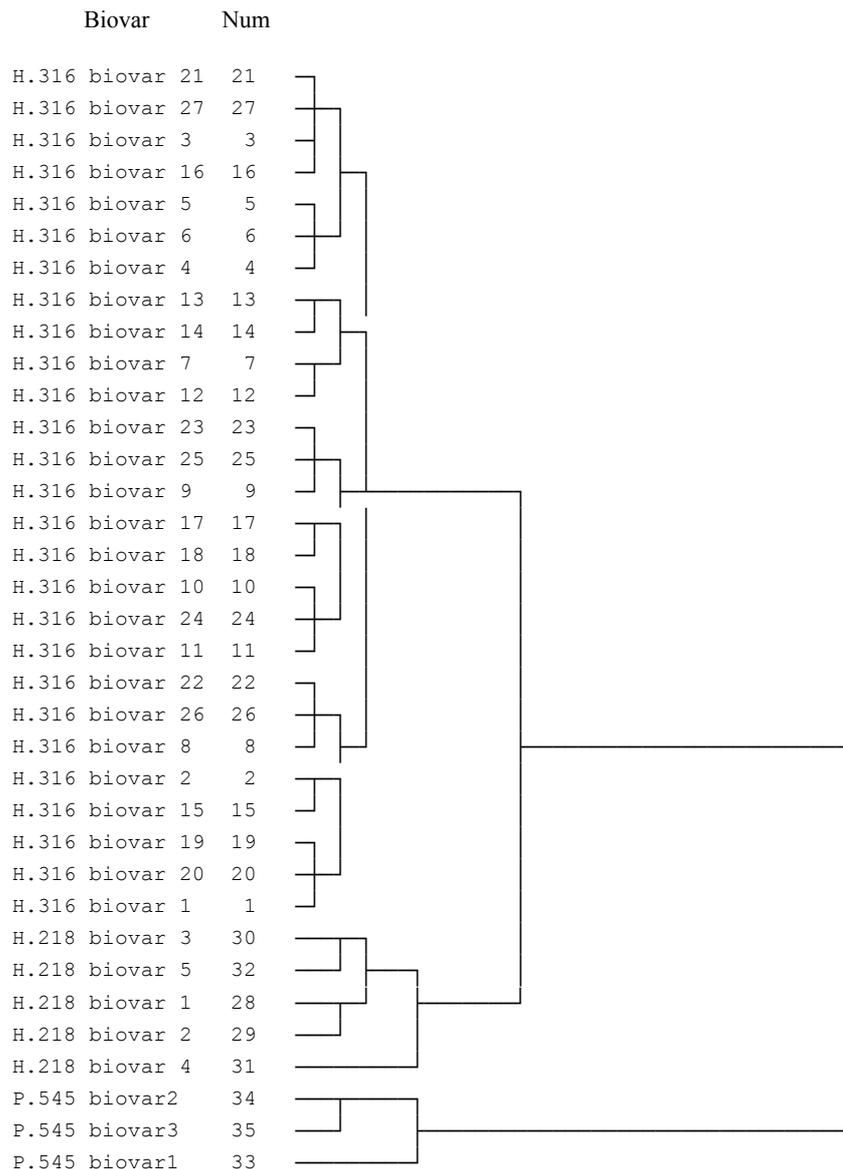


Abb. 4.16: Dendrogramm der Hierarchischen Clusteranalyse von Probe 6 (Num: Biovarnummerierung für Tab. 4.5 unter „Cluster Combined“, H.: *A. hydrophila*, P.: *A. caviae* vom Punktata-Typ).

4.8 Ergebnisse der Probe 7

Aus Probe 7 waren keine *Aeromonas*-Arten zu isolieren. Dies gelang weder aus der unbehandelten noch aus der mit Tween® vorbehandelten Probe (vgl. Tab. I und II im Anhang, Abb. 4.1 und 4.2). Auch mittels Overlayertechnik konnten keine *Aeromonas*-Arten aus der Belagssuspension angezüchtet werden. Eine Besiedlung der Rohrrinnenoberfläche durch vermehrungsfähige Aeromonaden konnte somit nicht nachgewiesen werden.

4.9 KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom Entnahmemonat

Zwischen dem Entnahmemonat und der KBE/cm² *Aeromonas* der einzelnen Proben bzw. der Anzahl der Biovare konnte kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. So ließen sich zwar aus den Proben der Monate März und November keine *Aeromonas* anzüchten, während der Sommermonate schwankte jedoch die KBE/cm² und die Anzahl der Biovare sehr stark (vgl. Abb.4.17 links bzw. rechts und Tab. V im Anhang).

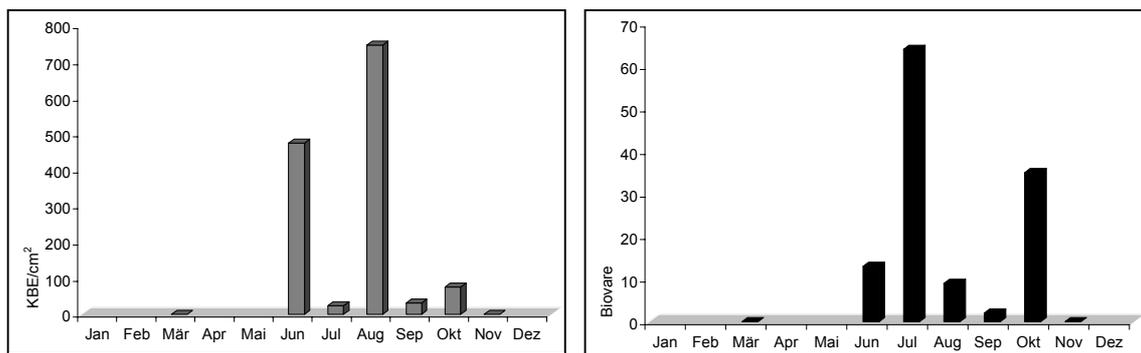


Abb.4.17: Zusammenhang zwischen dem Entnahmemonat der Proben und der isolierten KBE/cm² von *Aeromonas* (links) und der isolierten Anzahl Biovare (rechts).

4.10 KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom pH-Wert

Zwischen pH-Werten von 7,5 und 8 wurden qualitativ und quantitativ die meisten *Aeromonas* ermittelt (vgl. Abb. 4.18 und Tab. V im Anhang). Außerhalb dieses Bereiches konnte nur bei Probe 5 *Aeromonas* nachgewiesen werden. Das pH-Wert Spektrum, aus dem *Aeromonas* isoliert wurde, lag zwischen 6,65 und 7,91.

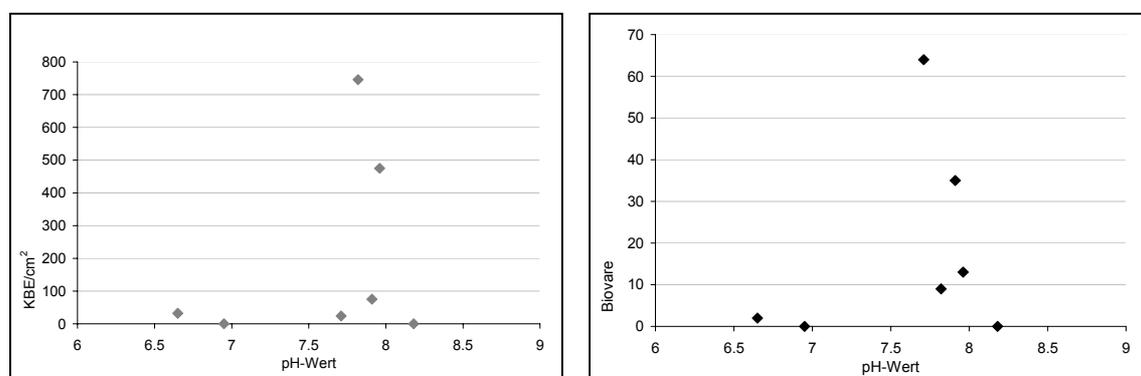


Abb. 4.18: Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der KBE/cm² (links) und der Anzahl isolierter Biovare (rechts) von *Aeromonas*-Kolonien aus den zu untersuchenden Proben.

4.11 KBE und Anzahl der Biovare in Abhängigkeit vom Rohrmaterial

Ein Zusammenhang zwischen dem Rohrmaterial der untersuchten Trinkwasserleitungen und der Anzahl der isolierten *Aeromonas*-Kolonien bzw. der verschiedenen Anzahl der Biovare war nicht nachweisbar. Sowohl in den Graugussrohren als auch in den PVC-Rohren war die KBE/cm² bzw. die Anzahl der Biovare sehr variabel (vgl. Tab. 4.17 und Tab. V im Anhang).

Tab. 4.17: Zusammenhang zwischen dem Rohrmaterial der Trinkwasserleitungen und der KBE/cm² der isolierten *Aeromonas* bzw. der Anzahl der Biovare.

Rohrmaterial	Grauguss	PVC
KBE/cm ²	0 - 746	0 - 475
Biovarzahl	0 - 64	0 - 35

5. DISKUSSION

Vorkommen und Besiedlungsdichte von *Aeromonas* im Biofilm der Inkrustationen und Beläge von Trinkwasserverteilungsrohren

Aus 70% der gewonnenen Belagssuspensionen konnten Bakterien der Gattung *Aeromonas* isoliert werden. Dies ist ein Beweis für die Existenz von *Aeromonas* in den Biofilmbelägen der untersuchten Trinkwasserverteilungsrohre. Damit ist *Aeromonas* nicht nur Bestandteil der Wasserphase des Verteilungssystems (MOYER 1996, KUHN et al. 1997a), sondern hat auch in den Inkrustationen und Belägen einen Überlebensraum gefunden. Im Trinkwasser von Verteilungssystemen werden in $\approx 25\%$ (KNOCHEL & JEPPESEN 1990, LEGNANI et al. 1998) bis 80% (KROVACEK et al. 1992, GHANEM et al. 1993) der Proben *Aeromonas* nachgewiesen.

Aus zwei Belagsproben gelang keine Anzüchtung von *Aeromonas*. Es ist deshalb davon auszugehen, dass in diesen entnommenen Rohrstücken keine vermehrungsfähigen *Aeromonas* vorhanden waren oder die *Aeromonas*-Keime im Laufe der Entnahme, der Suspendierung bzw. des Transportes abgestorben sind. Diese Probleme treten immer wieder bei Versuchen auf, die nicht *in situ* durchgeführt werden können (VAN DER WENDE & CHARACKLIS 1989, MACDONALD & BROZEL 2000) und machen die Bedeutung einer optimalen Probenentnahme für das Überleben der Mikroorganismen deutlich (REINHEIMER 1991).

Die Besiedlungsdichte der Rohrrinnenoberflächen durch *Aeromonas* lag bei allen Proben unter 10^3 KBE/cm², bei 70% sogar unter 10^2 KBE/cm². Die Gesamtbakteriendichte von Trinkwasserbiofilmen wird in der Literatur mit 10^7 - 10^{10} KBE/ml (DOTT & SCHOENEN 1985) bzw. 10^9 KBE/cm² (OLSEN 1982) angegeben. Legt man diese Zahlen zu Grunde, zeigt sich das *Aeromonas* nur einen minimalen Bruchteil der Gesamtbiofilmflora des Trinkwasserverteilungssystems ausmacht. Bei den untersuchten Proben wurden Koloniedichten ermittelt, die den *Aeromonas*-Konzentrationen der Trinkwasserphase entsprechen. Hier werden in der Regel 10^2 - 10^3 KBE/ml gefunden (HOLMES et al. 1996).

Die Artenzusammensetzung im Biofilm

Aeromonas hydrophila war mit 94% die dominierende Art der aus den Biofilmsuspensionen des Trinkwasserverteilungssystems isolierten *Aeromonas*-Spezies. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch KNOCHEL & JEPPESEN (1990) bei

Untersuchungen von Trinkwasser in Dänemark. Auch KROVACEK et al. (1992) isolierten *Aeromonas hydrophila* als dominanten *Aeromonas*-Keim des Trinkwasserverteilungssystems.

In einigen Proben konnten anhand der biochemischen Artendifferenzierung *Aeromonas sobria* und *Aeromonas caviae* vom Punktata-Typ nachgewiesen werden. Diese beiden Arten sind relativ häufig im Trinkwasserverteilungssystem vorhanden (HAVELAAR 1990, KUHN et al. 1997a). Aus einer Probe wurde ausschließlich *Aeromonas caviae* isoliert. Auch *Aeromonas caviae* (ARAUJO et al. 1991) und *Aeromonas sobria* (STELZER et al. 1992) werden als dominante *Aeromonas*-Arten von Trinkwasserverteilungssystemen beschrieben.

Der Nachweis von *Aeromonas*-Arten aus den Biofilmsuspensionen führte somit zu Ergebnissen, wie sie für Trinkwasser in Verteilungssystemen (HAVELAAR et al. 1990, HOLMES et al. 1996) bekannt sind. Dies verdeutlicht den Zusammenhang, der zwischen den im Biofilm und den planktonisch vorkommenden Mikroorganismen besteht (van der WENDE & CHARACKLIS 1989, 1990; FLEMMING 1991, 1992). Dabei stimmt in unchlorierten Systemen die mikrobielle Artenzusammensetzung in beiden „Lebensräumen“ weitestgehend überein (VAN DER WENDE et al. 1989).

Die weitere Aufspaltung der isolierten *Aeromonas*-Arten

Bei der weiteren biochemischen Analyse der einzelnen *Aeromonas*-Spezies fand eine Aufspaltung in mehrere Unterarten und Biovare statt. Die Untergliederung war von Probe zu Probe sehr unterschiedlich. Im Wesentlichen stimmten die Klassifizierungsergebnisse der Unterarten anhand biochemischer Eigenschaften mit den von POPOFF & VERON (1976) bzw. POPOFF et al. (1981) beschriebenen Einteilungen von *Aeromonas* überein.

Besonders bei der Probe 3 und 6 war die Aufspaltung von *Aeromonas hydrophila* in 60 bzw. 32 verschiedene Biovare sehr ausgeprägt. Im Zusammenhang mit der niedrigen Besiedlungsrate kann die hohe Varietätenvielfalt nicht durch Vermehrung einzelner *Aeromonas*-Keime entstanden sein. Sie ist vielmehr Resultat einer zeitlich versetzten Besiedlung des Biofilms aus der Wasserphase. So haben *Aeromonas*-Keime im Biofilm zwar einen Lebensraum gefunden, in welchem Überleben und Wachstum möglich sind, eine Vermehrung aber limitiert wird.

Aus den Proben 2, 4 und 5 wurden nur wenige Biovare aus den Biofilmsuspensionen isoliert. Diese niedrige Biovaranzahl lässt die Theorie zu, dass eine Massenvermehrung

einzelner Biovare im Biofilm stattgefunden und in bestimmten Abschnitten des Biofilms eine dominante Rolle eingenommen hat. Nachwüchse einzelner Spezies sind in Trinkwassersystemen nicht ungewöhnlich (FLEMMING 1992) und werden insbesondere für Coliforme oft nachgewiesen (EDBERG et al. 1994). LE-CHEVALLIER et al. (1982) beschreiben sie auch bei *Aeromonas*.

Zieht man die ermittelten *Aeromonas*-Keimzahlen von 10^3 KBE/cm² mit in die Betrachtung ein, zeigt sich jedoch, dass in den untersuchten Inkrustationen der Rohrabschnitte selbst eine solche Massenvermehrung nicht stattgefunden hat. Für die erhöhte *Aeromonas*-Dichte im Biofilm ist eher eine höhere Konzentration von *Aeromonas* in der Wasserphase verantwortlich (HAVELAAR et al. 1990, KERSTERS et al. 1995). Ursache hierfür ist eine Massenvermehrung vor der Aufbereitung des Wassers, was bei gleicher Effektivität des Wasserwerks höhere Keimzahlen einzelner Biovare in die Wasserphase des Verteilungssystems abgibt (MEHEUS & PEETERS 1989). Ein entsprechender Anstieg von Keimen mit gleichen biochemischen Merkmalen im Biofilm ist die Folge.

In den untersuchten Biofilmen scheint *Aeromonas* aufgrund der niedrigen Besiedlungsrate und der hohen Anzahl von Biovaren nur einen Überlebensraum gefunden zu haben. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Massenvermehrung in den Inkrustationen des Trinkwasserverteilungssystems ausschließen und generell nur ein geringer Teil der im Wasser vorkommenden *Aeromonas*-Arten humanpathogene Eigenschaften besitzt (SCHUBERT 1999), ist von einer gesundheitsgefährdenden Kontaminationen des Trinkwassers durch biofilmassoziierte *Aeromonas* nicht auszugehen.

Einfluss abiotischer und biotischer Faktoren auf Koloniezahl und Artenspektrum von *Aeromonas* im Biofilm

Die Probenentnahme erfolgte zu unterschiedlichen Jahreszeiten und an verschiedenen Orten des Trinkwasserversorgungsgebietes einer städtischen Wasserwerksgesellschaft in Nordrhein-Westfalen (vgl. Abschn. 3). Unterschiede in den biotischen und abiotischen Faktoren der einzelnen Proben waren dadurch vorhanden.

Die Konzentration an freiem Chlor im Trinkwasser sollte keinen Einfluss auf die unterschiedlichen Ergebnisse der Koloniezahlbestimmung haben, da nur bei Probe 4

eine Konzentration von 0,1 mg/l an freiem Chlor vorlag. Alle anderen Wasserproben waren ungechlort. Studien haben gezeigt, dass der Chlorgehalt ein Haupteinflussfaktor auf das Vorkommen von *Aeromonas* ist (KNOCHEL 1991) und dass Konzentrationen von 0,3mg/l eine signifikante Schädigung der Bakterien bewirken (MEDEMA et al. 1991). Ein Einfluss des Chlors auf die Artenzusammensetzung und Anzahl der vorhandenen Biovare ist aufgrund der nicht bzw. kaum gechlorten Proben ebenfalls auszuschließen. Höhere Chlortoleranzen von *Aeromonas hydrophila* gegenüber *Aeromonas caviae* und *sobria* werden zwar beschrieben, die Signifikanz dieser Untersuchungsergebnisse wird in der Literatur jedoch unterschiedlich bewertet (KNOCHEL 1991, SISTI et al. 1998).

In den Sommermonaten war ein Konzentrationsanstieg von *Aeromonas* im Biofilm zu erkennen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen zahlreicher Untersuchungen von Trinkwasserproben (HOLMES & NICCOLLS 1995, GAVRIEL et al. 1998). Grund hierfür könnte die Massenentwicklung von *Aeromonas* während der Sommermonate in Oberflächengewässern sein (SCHUBERT 1967c). Trotz weitestgehender Eliminierung von *Aeromonas* bei der Wasseraufbereitung erfolgt eine höhere Einschwemmung der Bakterien in das Verteilungssystem während dieser Zeit (HUYS et al. 1995, KERSTERS et al. 1995) mit entsprechendem Einfluss auf die Biofilmbesiedlung. Für das Aufkeimen des Wassers durch die biofilmassoziierten Mikroorganismen (BLOCK 1992) stellten HOLMES et al. (1996) für *Aeromonas* einen signifikanten Einfluss ab 14°C fest. In den untersuchten Rohrsystemen sind die saisonalen Wassertemperaturunterschiede nicht so ausgeprägt wie im Oberflächenwasser und überschreiten diese Schwelle nicht wesentlich.

Auch eine Änderung der Artenvielfalt der angezüchteten *Aeromonas* war zu beobachten. Da mesophile *Aeromonas* eine hohe Temperaturtoleranzrate haben (POPOFF 1984, SCHUBERT & PORSCH 1998), kann dieses Resultat nicht ausschließlich auf die Wassertemperatur zurückgeführt werden. Eine Veränderung der Populationszusammensetzung wäre nach HOLMES & NICCOLLS (1995) erst bei sehr starker Temperaturabnahme zu erwarten, da *Aeromonas caviae* hier eine signifikante Wachstumsabnahme aufweist.

Die pH-Werte der Proben lagen mit 6,65 bis 8,18 im beschriebenen pH-Toleranzbereich (5,2 bis 9,8) von *Aeromonas* (MOYER 1996). Es zeigte sich jedoch, dass *Aeromonas* hauptsächlich zwischen pH-Werten von 7,5 und 8 anzüchtbar waren. Hier wurde auch

die größte Anzahl von Biovaren isoliert. Dieser Bereich liegt oberhalb des angegebenen pH-Optimums von 6,5 bis 7,5 (PALUMBO et al. 1985). Durch ihre pH-Toleranz im alkalischen Milieu (KNOCHEL & JEPSEN 1990), kann ein Ausweichen von *Aeromonas* ins basischere durch Konkurrenzdruck anderer Mikroorganismen des Biofilms angenommen werden. Weiter muss die Frage geklärt werden, ob sich bei höheren pH-Werten die *Aeromonas*-Konzentration im Verhältnis zu anderen Biofilmbewohnern verändert, und ob ihr Vorkommen im alkalischen Milieu Ursache dieses erhöhten Konkurrenzdrucks bei ihrem pH-Optimum ist. Dies würde auch den Erfolg der selektiven Anzucht von *Aeromonas* aus Umweltproben im alkalischen Bereich erklären (HUDSON et al. 1992).

Mesophile *Aeromonas* stellen an ihre Nährstoffe keine speziellen Ansprüche (KERSTERS et al. 1996), dabei können Konzentrationen von 10 µg C/l ausreichen (VAN DER KOOIJ & HIJNEN. 1988, VAN DER KOOIJ 1991). Diese Tatsachen verhelfen *Aeromonas* auch zu einem Überleben im Biofilm des Trinkwasserverteilungssystems (HOLMES & NICCOLLS 1996), wobei durch das nährstoffarme Trinkwasser (O'CONNOR & BANERJI 1984) die Koloniezahl und die Artenverteilung stark beeinflusst werden. Bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden in den Biofilmsuspensionen *Aeromonas*-Konzentrationen von max. 10³ KBE/cm² ermittelt, welche damit den Konzentrationen des Trinkwassers entsprechen, aber deutlich unter denen der nährstoffreicheren Fluß-, Brauch- oder Abfallgewässer liegen (SCHUBERT 1991, KROVACEK et al. 1992). Die erfasste Dominanz von *Aeromonas hydrophila* gegenüber *Aeromonas sobria* und *Aeromonas caviae* ist oft für Trinkwasser beschrieben (MOYER 1996). Aus nährstoffreicheren Gewässern werden eher *Aeromonas sobria*, vor allem aber *Aeromonas caviae*, isoliert (SCHUBERT 1975, RAMTEKE et al. 1993). Das Überlebenspotential der drei isolierten *Aeromonas*-Arten in den einzelnen Gewässertypen unterscheidet sich nach Angaben von BRANDI et al. (1999) allerdings nicht voneinander. Vermutlich ist *Aeromonas hydrophila* in oligotrophen Gewässern nur konkurrenzstärker und begrenzt damit die ökologische Nische anderer *Aeromonas*-Arten.

Die Anzahl der verschiedenen isolierten Biovare scheint hingegen nicht im Zusammenhang mit dem *total organic Carbon* (TOC) zu stehen, da deren Anzahl stark schwankte.

Ein Zusammenhang zwischen der Art des Rohrmaterials und der Koloniezahl (KBE) von *Aeromonas* aus den gewonnenen Belagssuspensionen war nicht nachweisbar. So wurden sowohl bei den PVC-Rohren als auch bei den Graugussrohren sehr hohe,

niedrige und gar keine *Aeromonas*-Konzentrationen erfasst. Im Gegensatz zu den glatten, hydrophoben PVC-Rohren wird zwar bei den rauen, hydrophilen Gussrohren aufgrund der größeren Oberfläche und des besseren Schutzes vor Scherkräften des Wasserflusses eine höhere Gesamtkoloniezahl von Mikroorganismen immer wieder diskutiert (FLETCHER & MARSHALL 1982, PEDERSEN 1990), allerdings wurde dies noch nie für die Gattung *Aeromonas* untersucht. Im Bereich der Inkrustationen von Graugussrohren war die Belagsansammlung erwartungsgemäß zwar stärker ausgeprägt als bei den PVC-Rohren, die *Aeromonas*-Dichte der Belagssuspension zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Rohrmaterialien. Auswirkungen des Materials auf die Artenvielfalt von Mikroorganismen konnten für *Aeromonas* ebenfalls nicht ermittelt werden.

Turbulenzen und Strömungsgeschwindigkeiten (PERCIVAL et al. 1999) sowie der Mineralgehalt des Wassers (VERSTEEGH et al. 1989) besitzen auch einen Einfluss auf die Belagsbildung und Besiedlungsstärke. Bei der Bewertung der abiotischen Einflussfaktoren (Temperatur, pH-Wert, Chlorgehalt, Rohrmaterial) zum Vorkommen von *Aeromonas* in den Krustationen und Belägen des Trinkwasserverteilungssystems sollte noch berücksichtigt werden, dass nicht nur ein einzelner Parameter die Besiedlung der Mikroorganismen bestimmt, sondern dass hierbei ein komplexes Zusammenspiel sowohl abiotischer als auch biotischer Faktoren, z.B. Konkurrenz oder Prädation, verantwortlich sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Oft wurden *Aeromonas* aus Trinkwassersystemen isoliert und ihre Eigenschaften beschrieben. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit wurden ihre Existenz und ihre Artendiversität in den Biofilmen von Trinkwasserverteilungssystemen in Nordrhein-Westfalen (Deutschland) näher beleuchtet. Hierzu wurden vermehrungsfähige *Aeromonas*-Arten aus Rohrinkrustationen und Belägen der Rohrrinnenoberflächen von Grauguss- und PVC-Trinkwasserrohren isoliert und auf ihre phänotypischen Eigenschaften untersucht. Anhand zahlreicher biochemischer Tests wurden die isolierten *Aeromonas*-Arten in Unterarten und Biovare unterteilt und mittels Hierarchischer Clusteranalyse weiter klassifiziert.

Insgesamt wurden aus fünf der 7 Proben *Aeromonas* isoliert. Für die Besiedlungsdichte wurden Werte zwischen 24 und 746 KBE/cm² ermittelt. Eine Abhängigkeit zwischen dem Rohrmaterial (PVC, Grauguss) bzw. dem pH-Wert und der Koloniezahl von isolierten *Aeromonas* konnte nicht festgestellt werden. Während der warmen Jahreszeit wurde in den Belägen eine höhere Koloniezahl von *Aeromonas* ermittelt.

502 *Aeromonas*-Kolonien wurden weiter untersucht. Bei 94% der nachgewiesenen *Aeromonas*-Keime handelte es sich um *Aeromonas hydrophila*. Außerdem wurden *Aeromonas caviae* (5%) und *Aeromonas sobria* (1%) in den Belagssuspensionen identifiziert. *Aeromonas caviae* nahm in einem System sogar die dominante Rolle ein.

Je Probe wurden 120 *Aeromonas*-Kolonien weiter klassifiziert. Dabei wurden teilweise 35 bzw. 64 Biovare mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften identifiziert. Bei einigen Proben war die Unterteilung von *Aeromonas*-Isolaten in weitere Biovare kaum ausgeprägt. Die niedrige Besiedlungsrate und die hohe Anzahl von Biovaren schließen eine Massenvermehrung einzelner *Aeromonas* innerhalb des Biofilms aus. Vielmehr hat *Aeromonas* hier nur einen Überlebensraum gefunden. Die hohe Anzahl der Biovare ist auf eine zeitlich versetzte Besiedlung von *Aeromonas* in den Belagsinkrustationen zurückzuführen.

7 SUMMARY

In recent years, *Aeromonas* were often isolated from drinking water systems and characterized. In this study, the occurrence and diversity of *Aeromonas* in biofilms of drinking water supply systems in Nordrhein-Westfalen (Germany) were analyzed. Viable *Aeromonas*-species were isolated from incrustations of pipeline segments (PVC, cast-iron) and their phenotypic characteristics were studied. In numerous biochemical tests the *Aeromonas*-species were subdivided in subspecies and varieties and classified by a hierarchical cluster analysis.

In 5 of the 7 samples *Aeromonas* was isolated. A population density between 24 and 746 KBE/cm² were obtained. There was no correlation between the pipe material (PVC, cast-iron) as well as the pH and the count of the colonies of *Aeromonas*. During the warm season a higher number of *Aeromonas* was determined in the incrustations of pipeline segments.

502 colonies of *Aeromonas* were examined in more detail. 94% of the detectable *Aeromonas*-species were *Aeromonas hydrophila*. Also *Aeromonas caviae* (5%) and *Aeromonas sobria* (1%) were isolated from the incrustations of the pipes. *Aeromonas caviae* was in one of the drinking water supply systems even the dominant bacterium.

Per sample 120 *Aeromonas*-colonies were classified. 35 respectively 64 varieties with different biochemical characteristics were identified. In some of the samples, the subdivision of *Aeromonas*-species was hardly marked. The low colonisation rate and the high number of varieties exclusive a mass propagation of some *Aeromonas* in the biofilm. Rather *Aeromonas* found only a habitat for survival. The high number of varieties suggest a chronological displacement of *Aeromonas* settlement in the incrustations.

8. LITERATUR

- ALLEN, M.J., TAYLOR, R.H., GELDREICH, E.E. (1980): The occurrence of microorganisms in water main encrustations. – J Am Water Works Assoc **72**: 614-625
- ARAUJO, R.M., ARRIBAS, R.M., PARES, R. (1991): Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. – J Appl Bacteriol **71**: 182-186
- AULICINO, F.A.L.P., ORSINI, P. (1996): Presence of biofilm in a drinking water system in Piemonte. – Igiene Moderna **105**: 29-40
- BARRITT, M. (1936): The intensification of the VOGES-PROSKAUER reaction by the addition of α -naphthol. – J Path Bact **42**: 441-454
- BLOCK, J.C. (1992): Biofilms in drinking water distributions systems. In: BOTT, T.R., MELO, L., FLETCHER, M., CAPDEVILLE, B. (Eds.): Biofilms-Science and Technology. – Kluwer, Dordrecht: 469-485
- BOUWER, E.J. (1989): Transformation of Xenobiotics in Biofilms. In: CHARACKLIS, W.G., WILDERER, P. (Eds.): Structure and function of biofilms. – John Wiley & Sons Ltd., New York: 251-267
- BURKE, V., ROBINSON, J., GRACEY, M., PETERSON, D., PARTRIDGE, K. (1984): Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: Seasonal correlation with clinical isolates. – Appl Environ Microbiol **48**: 361-366
- BRANDI, G., SISTI, M., GIARDINI, F., SCHIAVANO, G.F., ALBANO, A. (1999): Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas spp.* in different types of water. – Lett Appl Microbiol **29**: 211-215
- CARNAHAN, A.M., ALTWEGG, M. (1996): Numerical Taxonomy. – In: AUSTIN, B., ALTWEGG, M., GOSLING, P.J., JOSEPH, S. (Eds.): The Genus *Aeromonas*. – John Wiley & Sons Ltd., Chichester: 4-15
- CARTA, F., PINNA, A., ZANETTI, S., CARTA, A., SOTGIU, M., FADDA, G. (1994): Corneal ulcer caused by *Aeromonas* species. – Am J Ophthalmol **118**: 530-531
- CHARACKLIS, W.G., WILDERER, P. (Eds.) (1989): Structure and function of biofilms. – John Wiley & Sons Ltd., New York
- CHESTER, F.D. (1901): A Manual of Determinative Bacteriology. – Macmillan, New York: 235
- CRYAN, B., FLYNN, J., GARVEY, M., O’GORMAN, T. (1990): *Aeromonas* associated diarrhoea in an otherwise healthy 70-year old man. – J Infect **20**: 169-184
- CUNNINGHAM, A.B. (1989): Hydrodynamics and Solute Transport at the Biofilm Interface. – In: CHARACKLIS, W.G., WILDERER, P. (Eds.): Structure and function of biofilms. – John Wiley & Sons Ltd., New York: 19-31

- DOTT, W., SCHOENEN D. (1985): Qualitative and quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. –7. Mitt.: Entwicklung der Aufwuchsflora auf Werkstoffen im Trinkwasser. – Zbl Bakt Hyg **180**: 436-447
- DRYDEN, M., MUNRO, R. (1989): *Aeromonas septicemia*: relationship of species and clinical features. – Pathology **21**: 111-114
- EDBERG, S.C., PATTERSON, J.E., SMITH, D.B. (1994): Differentiation of distribution systems, surface water and clinical coliforms by DNA analysis. – J Clin Microbiol **32**: 139-142
- EDDY, B.P. (1960): Cephalotrichous, fermentative Gram-negative bacteria: the genus *Aeromonas*. – J Appl Bacteriol **23**: 216-249
- EDDY, B.P., CARPENTER, K.P. (1964): Further studies on *Aeromonas*. II. Taxonomy of *Aeromonas* and C27 strains. – J Appl Bacteriol **27**: 96-109
- EMMERICH, R., WIEBEL, C. (1894): Über eine durch Bakterien erzeugte Seuche bei Forellen. – Arch Hyg **21**: 1-21
- ERNST, P. (1890): Die Frühjahrsseuche der Frösche und ihre Abhängigkeit von Temperatureinflüssen. – Beitr Pathol Anatomie **8**: 203-220
- EWING, W.H., JOHNSON, J.G. (1960): The differentiation of *Aeromonas* and C27 strains from *Enterobacteriaceae*. – Int Bull Bacteriol Nomen Taxon **10**: 223-230
- FERRIS, F.G., SHOTYK, W., FYFE, W.S. (1989): Mineral formation and decomposition by microorganisms. – In: BEVERIDGE, T.J., DOLY, R.J. (Eds.): Metal ions and bacteria. – John Wiley & Sons Ltd., New York: 413-441
- FLEMMING, H.C. (1991): Biofilme und Wassertechnologie, Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. – GWF Wasser Abwasser **132/4**: 197-207
- FLEMMING, H.C. (1992): Biofilme und Wassertechnologie, Teil II: Unerwünschte Biofilme-Phänomene und Mechanismen. – GWF Wasser Abwasser **133/3**: 119-130
- FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., MAYER, C. (1998): Extracellular polymeric substances: The material which forms the biofilm. – Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent **63 (4A)**: 1129-1136
- FLETCHER, M., MARSHALL, K.C. (1982): Are solid surfaces of ecology significance to aquatic bacteria? – In: MARSHALL, K.C. (Ed.): Advances in Microbiol Ecology. – Plenum Press, New York, Vol. **6**: 199-236
- GHANEM, E.H., MUSSA, M.E., ERAKI, H.M. (1993): *Aeromonas*-associated gastroenteritis in Egypt. – Zbl Microbiol **148**: 441-447
- GAVRIEL, A.A., LANDRE, J.P., LAMB, A.J. (1998): Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. – J Appl Microbiol **84**: 383-392

- HAVELAAR, A.H., VERSTEEGHG, J.F.M., DURING, M. (1990): The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in the Netherlands. – Zbl Hyg **190**: 236-256
- HAZEN, T.C., FLIERMAN, C.B., HIRSCH, R.P., ESCH, G.W. (1978): Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. – Appl Environ Microbiol **36**: 731-738
- HOLMES, P., NICCOLLS, L.M. (1995): Aeromonads in drinking water supplies - their occurrence and significans. – J Chartered Inst Water Environ. Manage **5**: 464-469
- HOLMES, P., NICCOLLS, L.M., SARTORY, D.P. (1996): The Ecology of mesophilic *Aeromonas* in the Aquatic Environment. – In: AUSTIN, B., ALTWEGG, M., GOSLING, P.J., JOSEPH, S. (Eds.): The Genus *Aeromonas*. – John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 127-150
- HUDSON, J.A., MOTT, S.J., DALACY, K.M., EDRIDGE, A.L. (1992): Incidence and coincidence of *Listeria spp.*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. – Int J Food Microbiol **16**: 99-108
- HUR, T., CHENG, K-C., HSIEH, J-M. (1995): *Aeromonas hydrophila* lung abscess in a previously healthy man. – Scand J Infect Dis **27**: 295
- HUYS, G., KAMPFER, P., ALTWEGG, M., KERSTERS, I., LAMB, A., COOPMAN, R., LUTHY-HOTTENSTEIN, J., VANCANNEYT, M., JANSSEN, P., KERSTERS, K. (1997): *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. – Int J Syst Bacteriol **47**: 1165-1171
- HUYS, G., KERSTERS, I., VANCANNEYT, M., COOPMAN, R., JANSSEN, P., KERSTERS, K. (1995): Diversity of *Aeromonas* sp. in Flemish drinking water production plants as determined by gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES). – J Appl Bacteriol. **78**: 445-455
- JANDA, J.M., ABBOTT, S.L (1996): Human Pathogens. – In: AUSTIN, B., ALTWEGG, M., GOSLING, P.J., JOSEPH, S. (Eds.): The Genus *Aeromonas*. – John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 151-174
- JANDA, J.M., ABBOTT, S.L., MORRIS JR., J.G. (1995): *Aeromonas*, *Pleisiomonas* and *Edwardsiella*. – In: BLASER, M.J. et al. (Eds.): Infections of the Gastrointestinal Tract. – New York, Raven Press **5**: 905-917
- JANDA, J.M., BRENDEN, R. (1987): Importance of *Aeromonas sobria* in *Aeromonas* bacteremia. – J Infect Des **155**: 589-591
- JOSEPH, S.W., CARNAHAN, A.M., BRAYTON, P.R., FANNING, G.R., ALMAZAN, R., DRABICK, C., TRUDO, E.W., COLWELL, R. (1991): *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. – J Clin Microbiol **29**: 565-569
- KAYSER, G., FLEMMING, H.C. (1989): Legionellen in Warmwassersystemen. – Eine Literaturstudie in Auftrag der KfA Jülich

- KERSTERS, I., HUYS, G., VAN DUFFEL, H., VANCANNEYT, M., KERSTERS, K., VERSTRAETE, W. (1996): Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. – J Appl Bacteriol **80**: 266-276
- KERSTERS, I., VAN VOOREN, L., HUYS, G., JANSSEN, P., KERSTERS, K., VERSTRAETE, W. (1995): Influence of temperature and process technology on the occurrence of *Aeromonas* species and hygienic indicator organisms in drinking water production plants. – Microbial Ecol **30**: 203-218
- KLUYVER, A.J., VAN NIEL, C.B. (1936): Prospects for a natural system of classification of bacteria. – Zbl Bakteriol Parasitenk **94**: 369-403
- KNOCHEL, S. (1991): Chlorine resistance of motile *Aeromonas* spp. – Water Sic Technol **24**: 327-330
- KNOCHEL, S., JEPSEN, C. (1990): Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. – J Food Microbiol **10**: 317-322
- KROVACEK, K., FARIS, A., BALODA, S.B., LINDBERG, T., PETERZ, M., MANSSON, I. (1992): Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. – Food Microbiol **9**: 215-222
- KUHN, I., ALLESTAM, G., HUYS, G., JANSSEN, P., KERSTERS, K., KROVACEK, K., STENSTROM, T.A. (1997a): Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. – Appl Environ Microbiol **63**: 2708-2715
- KUHN, I., HUYS, G., COOPMAN, R., KERSTERS, K., JANSSEN, P. (1997b): A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. – Can J Microbiol **43**: 9-16
- LECHEVALLIER, M.W., EVANS, T.M., SEIDLER, R.J., DAILY, O.P., MERREL, B.R., ROLLINS, D.M., JOSEPH, S.W. (1982): *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. – Microb Ecol **8**: 325-333
- LEGNANI, P., LEONI, E., SOPPELSA, F., BURIGO, R. (1998): The occurrence of *Aeromonas* species in drinking water supplies of an area of the Dolomite Mountains, Italy. – J Appl Microbiol **85**: 271-276
- LEIFSON, E. (1932): An improved reagent for the acetyl-methyl-carbinol test. – J Bact **23**: 353-354
- MACDONALD, R., BROZEL, V.S. (2000): Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. – Water Res **34**: 2439-2446
- MACINNES, J.I., TRUST, T.J., CROSA, J.H. (1979): Deoxyribonucleic acid relationships among members of the genus *Aeromonas*. – Can J Microbiol **25**: 579-586
- MACKERNES, C.W., COLBOURNE, J.S., KEEVIL, C.W. (1991): Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* in a distribution system biofilm model. – Proc UK Symp Health-Related Water Microbiol London IAWPRC: 131-138

- MAJEED, K.N., EGAN, A.F., MAC RAE, I.C. (1990): Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. – J Appl Bacteriol **69**: 332-337
- MASCHER, F., REINTHALER, F.F., STÜRZNER, D., LAMBERGER, B. (1988): *Aeromonas* Spezies in einer zentralen Wasserversorgungsanlage in Mitteleuropa; Biotypisierung und Toxinnachweis. – Zbl Bak Hyg B **186**: 333-337
- MAYER, C., MORITZ, R., KIRSCHNER, C., BORCHARD, W., MAIBAUM, R., WINGENDER, J., FLEMMING, H.C. (1999): The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. – Int J Biol Macromol **26(1)**: 3-16
- MCCARTHY, D.H. (1975): The bacteriology and taxonomy of *Aeromonas liquefaciens*. – Technical Report Series **2**, Weymouth, Dorset: 2
- MEDEMA, G.J., WONDERGEM, E., VAN DIJK-LOOYAARD, A.M., HAVELAAR, A.H. (1991): Effectivity of chlorin dioxide in drinking water distribution systems. – Water Sci Technol **24**: 325-326
- MEHEUS, J., PEETERS, P. (1989): Preventive and corrective actions to cope with *Aeromonas* growth in water treatment. – Water Supply **7**: 101-104
- MENGE, H., WAGNER, J., SKUBIS, R., SIMES, G., HAHN, H., RIECKEN, E.O. (1987): *Aeromonas hydrophila* als autochtoner Erreger einer infektiösen Enteritis in Deutschland. – Dtsch med Wschr **112**: 1134-1136
- MØLLER, V. (1955): Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. – Acta path microbiol scand **36**: 158-172
- MOMBA, M.N.B., KFIR, R., VENTER, S.N., CLOETE, T.E. (2000): An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. – Water S A Pretoria **26**: 59-66
- MOYER, N. P. (1996): Isolation and Enumeration of Aeromonads. – In: AUSTIN B., ALTWEGG, M., GOSLING, P.J., JOSEPH, S. (Eds.): The Genus *Aeromonas*. – John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 127-150
- NAGY, L.A., OLSON, B.H. (1986): A comparison of media for the enumeration of filamentous fungi from aqueduct biofilm. – Zbl Bakt Hyg **182**: 478-484
- O'CONNOR, J.T., BANERJI, S.K. (1984): Biologically mediated corrosion and water quality deterioration in distributions system. – U.S. Environmental Protecting Agency **600**: 52-56
- O'MEARA, R. (1931): A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrates. – J Path Bact **34**: 401-406
- OAKEY, H.J., WALKER, S.J. (1993): *Aeromonas hydrophila*: a review. – Technical Bulletin No. **95**, Campden Food & Drink Research Association
- OLSON, B. (1982): Assessment and implication of bacterial regrowth in water distribution systems. – US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio

- PALUMBO, S.A., MORGAN, D.R., BUCHANAN, R.L. (1985): Influence of temperature, NaCl and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. – J Food Sci 50: 1417-1421
- PEDERSEN, K. (1990): Biofilm development on stainless steel and PVC surface in drinking water. – Water Res 24: 239-243
- PERCIVAL, S.L., KNAPP, J.S., WALES, D.S., EDYVEAN, R.G.J. (1999): The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. – J Industrial-Microbiol Biotechnol 22: 152-159
- POPOFF, M. (1984): Genus III. *Aeromonas*. KLUYVER and VAN NIEL 1936. – In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1. – Baltimore, Williams and Wilkins: 545-548
- POPOFF, M., COYNAULT, C., KIREDJIAN, M., LEMELIN, M. (1981): Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. – Current Microbiol 5: 109-114
- POPOFF, M., VERON, M. (1976): A Taxonomic Study of the *Aeromonas hydrophila* – *Aeromonas punctata* Group. – J Gen Microbiol 94: 11-22
- QUIGNON, F., KIENE, L., LEVI, Y., SARDIN, M., SCHWARTZBROD, L. (1997): Virus behaviour within a distribution system. – Water Sci Technol 35: 311-318
- RAMTEKE, P.W., PATHAK, S.P., GAUTAM, A.R., BHATTACHERJEE, J.W. (1993): Association of *Aeromonas caviae* with sewage pollution. – J Environ Sci Health A28: 859-870
- REINES, H.D., COOK, F.V. (1981): Pneumonia and bacteremia due to *Aeromonas hydrophila*. – Chest 80: 264-267
- RHEINHEIMER, G. (Ed.) (1991): Mikrobiologie der Gewässer. –Gustav Fischer, Jena, 5.Auflage
- ROBINSON, P.J., WALKER, J.T., KEEVIL, C.W., COLE, J. (1995): Reporter genes and fluorescent probes for studying the colonisation of biofilms in a drinking water supply line by enteric bacteria. – FEMS Microbiol Lett 129: 183-188
- RODRIGUE, L., LANGLOIS, S., BOIVIN, P., NADEAU, N., SIMARD, P. (1999): Evaluation of analytical techniques to monitor the microbial colonisation implicated in biological corrosion of aqueduct systems. – Vecteur Environnement 32: 44-50
- ROLSTEN, K.V.I., ZANDVLIET, S.E., RODRIGUES, S., NGUYEN, H.T., BODEY, G.P. (1991): Spectrum of *Aeromonas* and *Plesiomonas* infection in patients with cancer and AIDS. – Experimenta 47: 437-439
- SANARELLI, G. (1891): Über einen neuen Mikroorganismus des Wassers, welcher für Thiere mit veränderlicher und konstanter Temperatur patogen ist. – Zbl Bakteriol Parasitenk 9: 222-228
- SCHMITT, J., FLEMMING, H.C. (1999): Water binding in biofilms. – Water Sci Technol 39: 77-82

- SCHOPF, J.W., HAYES, J.M., WALTER, M.R. (1983): Evolution on earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. – In: SCHOPF, J.W (Ed.): Earth's earliest biosphere. – Princeton University Press, New Jersey: 361-384
- SCHUBERT, R.W.H. (1963): Über die biochemischen Eigenschaften von *Aeromonas hydrophila*. – Zbl Bak Hyg **188**: 62-69
- SCHUBERT, R.W.H. (1967a): Das Vorkommen der Aeromonaden in oberirdischen Gewässern. – Arch Hyg **150**: 688-708
- SCHUBERT, R.W.H. (1967b): Die Pathogenität der Aeromonaden für Mensch und Tier. – Arch Hyg **150**: 709-716
- SCHUBERT, R.W.H. (1967c): Experimentelle Untersuchungen über die für die Massentwicklung der Aeromonaden im Abwasser wichtigen Faktoren. – Arch Hyg **151**: 409-436
- SCHUBERT, R.W.H. (1975): Die Relation von aerogenen zu anaerogenen Aeromonaden der „Hydrophila-Punktata-Gruppe“ in Fließgewässern in Abhängigkeit von der Abfallstoffbelastung. – Zbl Bakt Hyg **160**: 237-245
- SCHUBERT, R.W.H. (1976): Der Nachweis von Aeromonaden der „Hydrophila-Punktata-Gruppe“ im Rahmen der Hygienischen Trinkwasserbeurteilung. – Zbl Bakt Hyg **161** : 482-497
- SCHUBERT, R.W.H. (1981): Ätiologie und klinische Krankheitsbilder der *Aeromonas*-Infektion des Menschen. – Umweltmed **4**: 61-62
- SCHUBERT, R.W.H. (1991): Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. – J Appl Bacteriol Sym Suppl **70**: 131-135
- SCHUBERT, R.W.H. (1997): Der Nachweis von psychrotrophen Aeromonaden aus dem Trinkwasser. – Zbl Hyg Umweltmed **200**: 571-574
- SCHUBERT, R.W.H. (2000): Intestinal cell adhesion and maximum growth temperature of psychrotrophic aeromonads from surface water. – Int J Hyg Environ Health **203**: 83-85
- SCHUBERT, R.W.H., BLUM, K.H. (1999): Modellversuche zum Verhalten von resistenten Biofilmen unter nährstoffarmen Randbedingungen im Anwendungsbereich von Medizinprodukten und Bedarfsgegenständen. – Hyg Med **24**: 357-366
- SCHUBERT, R.W.H., HOLZ-BREMER, A., KUHNIGK, C. (1996a): Der Nachweis der Humanpatogenität von psychrotrophen *Aeromonas*-Isolaten. – Hyg Med **21**: 279-289
- SCHUBERT, R.W.H., HOLZ-BREMER, A., KUHNIGK, C. (1996b): Darmzelladhäsive psychrotrophe Aeromonaden im Oberflächenwasser und im aus Oberflächenwasser aufbereiteten Trinkwasser. – Hyg Med **21**: 516-524

- SCHUBERT, R.W.H., PORSCH, G. (1998): The Maximum Growth Temperature and Human Pathogenicity of Psychrotrophic Aeromonads. – Zbl Hyg Umweltmed **201**: 199-203
- SCHULZE-RÖBBECKE, R., FISCHER, R. (1989): *Mycobacteria* in biofilms. – Zbl Bakt Hyg **188**: 385-390
- SEIFERTH, R., KRÜGER, W. (1950): Überraschend hohe Reibungsziffer einer Fernwasserleitung. – VDI **92**: 189-191
- SIBILLE, I., SIME-NGANDO, T., MATHIEU, L., BLOCK, J.C. (1998): Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. – Appl Environ Microbiol **64**: 197-202
- SIMMONS, J.S. (1926): A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. – J Inf Dis **39**: 209-241
- SISTI, M., ALBANO, A., BRANDI, G. (1998): Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas spp.* in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. – Letters Appl Microbiol **26**: 347-351
- SIXL, W., SIXL, K., SIXL-VOIGT, B. (1999): Quality of water-quality of life. – Cent Eur J Public Health **7(4)**: 216-220
- SMITH, I.W. (1963): The classification of *Bacterium salmonicida*. – J Gen Microbiol **33**: 263-274
- SMITH, J.A. (1980): Ocular *Aeromonas hydrophila*. – Am J Ophthalmol **89**: 449-451
- SNIESZKO, S.F. (1957): Genus IV *Aeromonas* KLUYVER and VAN NIEL, 1936. – In: BREED, R.S., MURRAY, E.G.D., SMITH, N.R. (Eds.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. – 7th Edn., Baltimore, Williams and Wilkins: 189
- STAL, L.J. (1989): Group Report: Cellular Physiology and Interactions of Biofilm Organisms. In: CHARACKLIS, W.G., WILDERER, P. (Eds.): Structure and function of biofilms. – John Wiley & Sons Ltd., New York: 269-286
- STELZER, W., JACOB, J., FEUERPFEL, I., SCHULZE, E. (1992): Untersuchungen zum Vorkommen von Aeromonaden in einem Trinkwasserversorgungssystem. – Zbl Mikrobiol **147**: 231-235
- VAN DER KOOIJ, D. (1988): Eigenschaften der Aeromonaden, ihr Vorkommen und ihre hygienische Bedeutung im Trinkwasser. – Zbl Bakt Hyg **187**: 1-17
- VAN DER KOOIJ, D. (1991): Nutritional requirements of aeromonads and their multiplication in drinking water. – Experientia **47**: 444-446
- VAN DER KOOIJ, D., HIJNEN, W.A.M. (1988): Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. – Appl Environ Microbiol **54**: 2842-2851

-
- VAN DER WENDE, E., CHARACKLIS, W.G. (1989): Structure and function of biofilms. – In: CHARACKLIS, W.G., WILDERER, P. (Eds.): Structure and function of biofilms. – John Wiley & Sons Ltd., New York: 5-17
- VAN DER WENDE, E., CHARACKLIS, W.G. (1990): Biofilms in potable water distribution systems. – In: MCFETERS, G.A. (Ed.): Drinking water microbiology. – Springer, Heidelberg, New York: 249-268
- VERSTEEGH, J.F., HAVELAAR, A.H., HOEKSTRA, A.C., VISSER, A. (1989): Complexing of copper (CU) in drinking water samples to enhance recovery of *Aeromonas* and other bacteria. – J Appl Bacteriol **67**: 561-566
- VOGES, O., PROSKAUER, B. (1898): Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur Differentialdiagnose der hämorrhagischen Septicämie. – Zbl Hyg Infekt **28**: 20-32
- ZIMMERMANN, O.E.R. (1890): Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwässer. – Berl Naturwiss Ges Chemnitz **11**: 86-87

Tab. III: Übersicht der Gasbildungs- und Fermentationstests von Probe 2 bis 6. N: negative Testergebnisse, P: positive Testergebnisse, keine Angabe: positive und negative Testergebnisse (vgl. Ergebnisteil)

Test	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Glucose-Gasbildung	P	▪	P	N	▪
Glycerol-Gasbildung	▪	▪	▪	N	▪
Lactat-Gasbildung	N	N	N	N	N
Manitol-Gasbildung	P	▪	P	N	▪
2,3-Butandiol-Fermentation	N	N	N	N	N
Aesculin-Fermentation	▪	▪	P	P	P
Agmatin-Fermentation	N	N	N	N	N
Amygdalin-Fermentation	N	N	N	P	P
Arabinose-Fermentation	P	▪	P	P	P
Arbutin-Fermentation	P	▪	P	P	P
Cellubiose-Fermentation	P	▪	▪	P	P
Dulcitol-Fermentation	N	N	N	N	N
Fucose-Fermentation	N	▪	N	P	P
Galactose-Fermentation	▪	▪	P	P	▪
Glucose-Fermentation	P	P	P	P	P
Glycerol-Fermentation	P	P	P	P	P
Inositol-Fermentation	N	N	N	N	N
Lactose-Fermentation	N	N	N	N	N
Maltose-Fermentation	P	P	P	P	P
Mannitol-Fermentation	P	P	P	P	P
Mannose-Fermentation	P	P	P	P	P
Melibiose-Fermentation	▪	N	N	P	P
Methyl-d-Glucosid-Fermentation	▪	▪	▪	P	P
N-Acethylgalactosamin-Fermentation	P	P	P	P	P
N-Aceylglucoamin-Fermentation	P	P	P	P	P
Palatinose-Fermentation	▪	▪	P	P	P
Pyranose-3-Methyl-O-Fermentation	N	▪	N	N	N
Raffinose-Fermentation	▪	N	N	▪	N
Rhamnose-Fermentation	▪	▪	P	P	P
Saccharose-Fermentation	P	P	P	P	P
Salicin-Fermentation	▪	▪	▪	P	▪
Sorbitol-Fermentation	N	▪	N	N	N
Trehalose-Fermentation	P	▪	P	P	P

Tab IV: Übersicht weiterer Tests der Proben 2 bis 6. N: negative Testergebnisse, P: positive Testergebnisse, keine Angabe: positive und negative Testergebnisse (vgl. Ergebnisteil)

Test	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Arginindihydrolase	P	P	P	P	P
Lysinhydrogenase	P	P	P	P	P
Ornithinhydrogenase	N	N	N	N	N
Butandiolhydrogenase-Reaktion	P	P	P	P	P
Voges-Proskauer-Reaktion	P	P	P	P	P
Alanin-Verwertung	P	▪	P	▪	▪
Arginin-Verwertung	P	▪	P	N	P
Cystein-Verwertung	N	▪	N	▪	▪
Histidin-Verwertung	P	P	P	▪	▪
Lactat-Verwertung	▪	▪	N	N	N
Prolin-Verwertung	P	P	P	▪	P
Rhamnose-Verwertung	N	▪	▪	▪	▪
Threonin-Verwertung	P	▪	P	N	▪
KCN-Wachstum	P	▪	P	P	P
Simmons-Citrat-Wachstum	P	P	P	P	P
Indol-Produktion	P	P	P	P	P

Tab V: Übersicht der ermittelten KBE/cm² und der Anzahl der Biovare der isolierten *Aeromonas*-Kolonien der untersuchten Proben sowie der zugehörige Entnahmemonat, der pH-Wert bzw. das Rohrmaterial der Trinkwasserleitung

Probe	1	2	3	4	5	6	7
KBE/ cm ²	0	475	24	746	32	75	0
Anzahl Biovare	0	13	64	9	2	35	0
Entnahmemonat	März	Juni	Juli	August	September	Oktober	November
pH-Wert	6,95	7,96	7,71	7,82	6,65	7,91	8,18
Rohrmaterial	Grauguss	PVC	Grauguss	Grauguss	Grauguss	PVC	PVC

10 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. R.H.W. Schubert danke ich sehr für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums der Hygiene - Institut für Hygiene und Umweltmedizin - der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main danken. Zu besonderen Dank bin ich hier Frau Rosemarie Schmidt verpflichtet, die mir während der Einarbeitung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden sehr behilflich war. Aber auch bei der Bearbeitung der Proben trug sie durch ihre hilfsbereite Art und ihr Fachwissen wesentlich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit bei.

Dank gilt auch den Mitarbeitern der Abteilung Aquatische Mikrobiologie der Gerhard-Mercator-Universität Duisburg für die gute Zusammenarbeit.

Bei Rita Heuck und Simone Pfeiffer möchte ich mich für die Korrekturlesung von Teilen der Arbeit bedanken.

Besonders meiner Familie danke ich für die großzügige Unterstützung meines Studiums und der Promotion. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin Inken bedanken. Ihre stetige Mithilfe half mir wesentlich bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Karst

Vorname: Knut

Geburtsdatum: 12. Dezember 1971

Geburtsort: Erfurt/Thüringen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

1978-1988 Polytechnische Oberschule in 99195 Stotternheim

1988-1990 Erweiterte Oberschule in 99192 Neudietendorf

WEHRERSATZDIENST

01.09.1990-23.08.1991 Pflegertätigkeit in der Hufelandklinik in 99087 Erfurt

TÄTIGKEIT VOR DEM STUDIUM

01.10.1991-31.09.1992 Angestellter bei der Kassenzahnärztlichen Vereinigung Thüringen in 99084 Erfurt

STUDIUM

01.10.1992-15.06.1999 Zahnmedizinstudium an der J. W. Goethe-Universität in 60596 Frankfurt a. Main

22.09.1993 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

15.03.1996 Zahnärztliche Vorprüfung

15.06.1999 Zahnärztliche Prüfung

24.06.1999 Approbation als Zahnarzt

PROMOTION

Seit 01.06.1999 Doktorand am Zentrum für Hygiene und Umweltmedizin des Klinikums der J.W. Goethe-Universität in 60596 Frankfurt a. Main

BERUFSERFAHRUNG

Seit 15.03.2000 Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis Dr. med. P. Bracke in 99330 Gräfenroda/Thüringen

SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

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

**„Vorkommen von vermehrungsfähigen Aeromonasarten
in Rohrinkrustationen eines städtischen Wasserversorgungssystems.“**

im Zentrum der Hygiene
Institut für Hygiene und Umweltmedizin

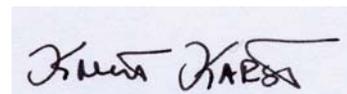
unter Betreuung und Anleitung von
Herrn Professor Doktor R.W.H. Schubert

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als 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.

Frankfurt, 29.08.2001



Knut Karst