

**Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser
Band 81 - Mikrobiologische Lebend/tot-Unterscheidung**

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Bisherige Veröffentlichungen.....	II
Erklärung	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Zielsetzung.....	2
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Wasserhygiene	3
2.2 Trinkwassergewinnung und Aufbereitung	4
2.3 Krankheitsausbrüche durch kontaminiertes Wasser	8
2.4 Hygienisch relevante Organismen.....	9
2.5 Qualitätskontrolle mit dem Indikatorprinzip	13
2.6 Nachweisverfahren	14
2.6.1 Kulturverfahren	14
2.6.2 Molekularbiologische Verfahren (PCR)	16
2.6.3 Durchflusszytometrie	32
2.6.4 Raman-Mikrospektroskopie	35
2.7 Hygiene-Online-Monitoring (EDIT Projekt)	35
3 Ergebnisse und Diskussion	38
3.1 Übersicht der Versuche	38
3.2 Methodenentwicklung: Lebend/tot-Differenzierung von Bakterien und Viren	39
3.2.1 Standardbedingungen zur Entwicklung der Lebend/tot-Differenzierung.....	40
3.2.2 Test der PMA-qPCR	41
3.2.3 Entwicklung der Long amplicon qPCR	43
3.2.4 Long amplicon PMA-qPCR	65
3.2.5 Etablierung der Durchflusszytometrie	96
3.2.6 Zusammenfassung und Fazit der Methodenentwicklung	104
3.3 Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren	108
3.3.1 Thermische Desinfektion.....	109
3.3.2 Niederdruck-UV-Strahlung	122
3.3.3 Chlor	137

3.3.4	Ozon.....	146
3.3.5	Fazit Desinfektionsverfahren.....	153
3.4	Integration der Lebend/tot-Unterscheidung in ein Hygiene-online-Monitoring.....	156
3.4.1	Konzentrierung.....	157
3.4.2	Lab-on-Chip-Modul.....	161
3.4.3	Isothermale Amplifikation.....	166
3.4.4	Fazit	168
4	Zusammenfassung und Ausblick	169
5	Summary and outlook	173
6	Experimenteller Teil	177
6.1	Abkürzungsverzeichnis	177
6.2	Lister der Geräte und Materialien.....	179
6.2.1	Geräte.....	179
6.2.2	Kits und Reagenzien	179
6.2.3	Chemikalien	180
6.2.4	Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	181
6.2.5	Medien	182
6.3	Basismethoden.....	184
6.3.1	Bakterielle Stammlösungen.....	184
6.3.2	Virale Stammlösungen.....	185
6.3.3	Hitzebehandelte Arbeitslösung („tot“)......	185
6.3.4	Nachweisverfahren: Kulturverfahren.....	186
6.3.5	Nachweisverfahren: Mikroskopische Gesamtzellzahl.....	188
6.3.6	Nachweisverfahren: Durchflusszytometrie.....	189
6.3.7	Nachweisverfahren: qPCR	192
6.3.8	PMA-Behandlung.....	197
6.3.9	Extraktion	197
6.4	Entwicklung der LA-qPCR	198
6.4.1	Primer-Entwicklung.....	198
6.4.2	In silico Spezifitätstest	198
6.4.3	Herstellen von Standards	199
6.4.4	Optimierung der qPCR.....	201
6.4.5	Zusätzliche Entwicklungsschritte zum Nachweis aller Bakterien (16S).....	203
6.4.6	Bestimmung des 16S-Genom-Äquivalent	203
6.5	Entwicklung der LA-PMA-qPCR	205

6.5.1	Testverfahren mit Organismen	205
6.5.2	phiX174- und MS2-Bakteriophagen	207
6.5.3	<i>E. coli</i>	208
6.5.4	<i>E. faecalis</i>	209
6.5.5	Modifikation der PMA-qPCR	209
6.5.6	Gesamtbakterienzahl (auf Basis von 16S-rDNA)	209
6.6	Etablierung der Durchflusszytometrie	210
6.7	Anwendung der Lebend/tot-Unterscheidung bei Desinfektionsverfahren	210
6.7.1	Thermische Desinfektion.....	210
6.7.2	Chlorung	211
6.7.3	Ozon.....	212
6.7.4	UV	213
6.7.5	Raman-Mikrospektroskopie	215
6.8	Integration ins Hygiene-online-Monitoring (EDIT Projekt)	216
6.8.1	Aufkonzentrierung.....	216
6.8.2	Lab-On-Chip-Modul	217
7	Anhang.....	218
7.1	Sequenzen der Standards.....	218
7.2	Erstellte Software	220
7.3	F- und t-Test	221
7.4	Literaturliste zur PMA-Behandlung	222
8	Literaturverzeichnis.....	226