

**Umweltforschungsplan
des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit**

Badegewässer

Förderkennzeichen (UFOPLAN) 201 62 216

**Evaluierung der hygienischen Wasserqualität unter besonderer
Berücksichtigung von Bakteriophagen am Beispiel eines Tagebausees**

von

Dipl. Biol. Sandro Wolf

**Institut für Mikrobiologie
der Technischen Universität Dresden
Lehrstuhl Angewandte Mikrobiologie
Prof. Dr. Isolde Röske**

**IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES**

Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Hygienische Anforderungen an das Wasser und virale Kontamination.....	6
1.2	Tagebauseen.....	14
1.3	Zielsetzung	15
2	HAUPTTEIL.....	17
2.1	Material und Methoden	17
2.1.1	Untersuchungen am Werbeliner See	17
2.1.2	Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser	23
2.1.3	Konzentrierung von Wasserproben und Extraktion der Nukleinsäuren.....	24
2.1.4	Qualitativer molekularer Nachweis enteraler Viren.....	24
2.1.5	Molekulare Quantifizierung enteraler Viren	26
2.1.6	Nachweis infektiöser Entero- und Adenoviren	27
2.1.7	Detektion und Quantifizierung von <i>E.coli</i> , Enterokokken und <i>Cl. perfringens</i> -Sporen.....	29
2.1.8	Detektion und Quantifizierung von Somatischen- und F+ RNA Coliphagen.....	30
2.1.9	Chemisch-analytische Verfahren	31
2.1.10	Bestimmung von Temperatur, O ₂ , pH-Wert, Leitfähigkeit und Chl-a-Konzentration	31
2.1.11	Statistische Auswertung	32
2.2	Ergebnisse	33
2.2.1	Reinigungsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental.....	33
2.2.2	Bereich zwischen Kläranlage und Werbeliner See	43
2.2.3	Limnologische Untersuchungen im Werbeliner See.....	52
2.2.4	Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser	53

2.3	Diskussion	59
2.3.1	Reinigungsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental.....	59
2.3.2	Bereich zwischen Kläranlage und Werbeliner See	68
2.3.3	Limnologische Untersuchungen am Werbeliner See	85
2.3.4	Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser	87
2.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	94
3	LITERATURVERZEICHNIS	101

Abkürzungsverzeichnis

293	Humane embryonale Zelllinie
BGM	Buffalo Green Monkey (Affennierenzelllinie)
Chl-a	Chlorophyll-a
<i>Cl. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CpE	Cytopathischer Effekt
DEPC	Diethyldicarbonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FKS	Fötales Kälber-Serum
Gen.äquiv.	Genomäquivalente
HDPE	High Density Polyethylen
KbE	Koloniebildende Einheit
MPN	Most Probable Number
Mw	Arithmetischer Mittelwert
n	Probenanzahl
nested-RT-PCR	nested-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaktion

NN	Normal Null
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PFU	Plaque Forming Unit (Plauebildende Einheit)
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaktion
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SRP	Soluble Reactive Phosphorus (Löslicher reaktiver Phosphor)
TG	Trockengewicht
TN	Gesamtstickstoff
TP	Gesamtposphor
v / v	Volumen / Volumen

1 Einleitung

1.1 Hygienische Anforderungen an das Wasser und virale Kontamination

Wasser hat für den Menschen eine außerordentliche Bedeutung. An kein Element ist sein Leben so eng geknüpft wie an Wasser. In fast allen Bereichen seines Lebens wird Wasser direkt oder indirekt von ihm genutzt: als Trink- und Brauchwasser, zur Bewässerung in der Landwirtschaft, zum Baden und anderen mit dem Wasser verbundenen Freizeitaktivitäten, für die industrielle Aquakultur von Fischen und Muscheln, zum Transport von Gütern oder als Energiequelle.

Wasser ist in vielen Regionen der Welt deshalb ein begrenzender Faktor für jede weitere wirtschaftliche und soziale Entwicklung. Neben der Verfügbarkeit spielt besonders die chemisch-biologische Qualität des Wassers eine fundamentale Rolle. Aus hygienischer Sicht wird die Wasserqualität – und damit die menschliche Gesundheit – vor allem durch die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen beeinträchtigt.

Quellen pathogener Mikroorganismen sind in der Regel kommunales und landwirtschaftliches Abwasser, das punktuell über Kläranlagen oder diffus ins Wasser gelangt. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch den Konsum kontaminierten Trinkwassers, durch Verschlucken von Wasser beim Baden, durch Hautkontakt oder Inhalation kontaminierter Aerosole. Roh verzehrtes Obst und Gemüse, das regelmäßig bewässert wurde, kann ebenfalls mit pathogenen Mikroorganismen kontaminiert sein. Ein vor kurzem in Walkerton, Kanada, aufgetretener Gastroenteritisausbruch wurde durch *Escherichia coli* O157:H7 verursacht und konnte direkt auf den Konsum kontaminierten Grundwassers zurückgeführt werden (HOWARD, 2001).

Neben pathogenen bzw. fakultativ pathogenen Bakterien stellen enterale Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko dar. In menschlichem Stuhl konnten bisher mehr als 140 verschiedene Viren identifiziert werden (LECLERC et al., 2000). Für die menschliche Gesundheit sind insbesondere Hepatitis A und E, Caliciviren (z.B. Noroviren), Rota-, Astro- und Enteroviren (Polio-, Coxsackie-, Echoviren u.a.) von Bedeutung. Man schätzt, dass in den USA 10 % der durch kontaminiertes Wasser verursachten Krankheitsausbrüche durch Viren

verursacht werden, wobei ihr tatsächlicher Anteil möglicherweise deutlich höher liegt (FOUT et al., 2003, PUSCH et al., 2005). Durchfallerkrankungen gelten in Entwicklungsländern als eine der häufigsten Todesursachen. Man geht davon aus, dass rund 20 % der Durchfallerkrankungen auf eine Infektion mit Rotaviren zurückzuführen sind (MODROW et al., 2003).

In vielen Abwässern lassen sich außerdem Parasitenentwicklungsstadien nachweisen. So finden sich im Durchschnitt pro Liter städtischen Abwassers 1 bis 10 Eier von *Ascaris lumbricoides* (BORNEFF, 1982).

Neben der Kontamination durch unzureichend aufbereitetes Abwasser können Pathogene z.B. im Badebetrieb, durch die Menschen direkt abgesondert werden. Die WHO (1979) schätzt, dass pro Schwimmer 10-50 ml Wasser verschluckt und ca. $2,3-2,6 \cdot 10^6$ Mikroorganismen, z.B. durch Abspülung in das Badewasser, abgesondert werden. Die unbeabsichtigte Freisetzung durch infizierte Personen beim Baden wird auf 10^8 Viruspartikel pro Person geschätzt (ANONYMUS, 1998a). Die Überwachung und Bewertung des Wassers entsprechend seiner Verwendung ist aus seuchenhygienischen Gründen deshalb von zentraler Bedeutung.

Aufgrund der Schwierigkeit jeden einzelnen Krankheitserreger direkt nachzuweisen, schätzt man in der Routineüberwachung i.d.R. die fäkale Belastung über sogenannte Indikatoren ab. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Indikatororganismen zusammen mit den Krankheitserregern von Menschen und Tieren über die Fäkalien ausgeschieden und mit dem Wasser verbreitet werden. Indikatoren sind demnach Mikroorganismen, die durch ihre Anwesenheit mögliche pathogene Mikroorganismen „indizieren“, wobei sie selbst keine pathogenen Eigenschaften besitzen müssen. Liegt die Indikatorkonzentration über einem bestimmten vorher festgelegten Grenzwert, ist das Wasser als hygienisch bedenklich einzustufen. Nach GRABOW (1986) und BOSCH (1998) sollten Indikatoren folgende Anforderungen erfüllen:

- sie müssen im Wasser nachweisbar sein, wenn Krankheitserreger nachweisbar sind
- sie sollten in gleicher oder höherer Zahl als die Krankheitserreger auftreten
- die Resistenz gegenüber Inaktivierung (z.B. in der Wasseraufbereitung) sollte bei den Indikatoren höher oder gleich sein, als bei den Pathogenen

- sie sollten spezifisch für eine fäkale Kontamination sein
- sie sollten sich, einmal in die Umwelt entlassen, möglichst nicht vermehren
- sie sollten selbst nicht pathogen und durch einfache, schnelle und preiswerte Methoden nachweisbar sein

Mit dem ausgehenden 19. Jh. sah man in dem Darmbakterium *Escherichia coli* einen geeigneten Indikator für eine fäkale Kontamination. Da die Methoden zum Nachweis von *E.coli* damals noch unausgereift waren, bediente man sich zunächst der Gesamtcoliformen, die über die Fähigkeit der Laktosefermentation in speziellen Nährmedien sicher und einfach nachzuweisen sind. Weitere Indikatoren, wie Enterokokken, *Clostridium perfringens*-Sporen u.a., etablierten sich. Dies führte mit der Zeit zu einer deutlichen Verbesserung in der Überwachung und der Abschätzung des Infektionsrisikos.

Dass die etablierten Indikatoren jedoch nicht immer zuverlässig greifen, zeigte sich drastisch im Jahre 1993 in Milwaukee, USA. Obwohl das Trinkwasser bezüglich der *E.coli*-Konzentration den gesetzlichen Richtlinien genügte, kam es zu einer Epidemie, verursacht durch Cryptosporidien, mit über 400.000 Erkrankungen. Seit den 1950er Jahren rückte außerdem die Übertragung von enteralen Viren durch kontaminiertes Wasser in den Blickpunkt der Forscher. Ausschlaggebend war eine Hepatitis E – Epidemie, die 1956 aus Indien gemeldet wurde und in deren Verlauf mehr als 30.000 Personen erkrankten und 73 an den Folgen starben. Als Ursache konnte der Fluss Jamuna ausgemacht werden, der als Trinkwasserquelle für Neu Delhi diente. Infolge schwerer Regenfälle kam es zu einer massiven Abwasserkontamination, die durch Rückstau des Flusswassers bis zur Trinkwasserentnahmestelle verursacht wurde. Sofortige Gegenmaßnahmen, wie Wasseraufbereitung und Hochchlorung, verhinderten die Verbreitung bakterieller pathogener Keime. Allerdings kam es 15 bis 50 Tage später (entsprechend der Inkubationszeit der Viren im Menschen) zu einem massiven Ausbruch an infektiöser Gelbsucht (MELNICK, 1990).

Es wurde klar, dass die etablierten bakteriellen Indikatoren das Infektionspotential bezüglich enteraler Viren nur sehr unzureichend widerspiegeln. Unter gewissen Umständen überleben Viren in der Umwelt deutlich länger als die bakteriellen Indikatoren. TELTZSCH UND KATZENELSON (1977) fanden, dass in Aerosolpartikeln unterhalb einer Verregnungsanlage coliforme Bakterien schneller abstarben als Enteroviren. WALTER (2000) beschreibt die

Gruppe der *Picornaviridae* (Enteroviren sowie Hepatoviren, einschließlich Hepatitis A-Virus) als sehr resistent gegenüber Alkohol, Äther, Chloroform, nichtionische Detergentien sowie pH-Verschiebungen. Sie können extreme Umweltbedingungen überstehen und dabei über einen langen Zeitraum infektiös bleiben. Hinzu kommt eine deutlich geringere minimale Infektionsdosis für Viren im Vergleich zu bakteriellen Krankheitserregern. Die minimale Infektionsdosis liegt bei 2-10 Viruspartikeln, die zum Ausbruch einer Krankheit führen kann (WALTER, 2000).

Adenoviren 40 / 41 wird eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des Magen- / Darmtraktes (Gastroenteritis) zugeschrieben. GIORDANO et al. (2001) führten in einer Studie in Cordoba-Stadt (Argentinien) eine Infektion mit Adenoviren 40 / 41 als Hauptursache für Gastroenteritis bei Kindern an, gefolgt von Rota- und Astroviren. SIMPSON et al. (2003) fanden bei Kindern unter 5 Jahren in East Anglia (Großbritannien) als virales Pathogen vor allem Rotaviren (27,9 %), Noroviren (13,4 %), enterale Adenoviren (7,9 %) und Astroviren (2,3 %). Auch eine Studie in Deutschland wies Rotaviren, Noroviren und enterale Adenoviren als wichtigsten Infektionsgrund bei Kindern nach, die wegen akuter Gastroenteritis ins Krankenhaus kamen (OH et al., 2003). Gastroenteritis gilt als eine der Hauptursachen für die hohe Kindersterblichkeit in den Entwicklungsländern und als die zweithäufigste Erkrankungsursache bei Kindern in den Industriestaaten. Nach LAVERICK et al. (2004) sind Noroviren für die meisten Fälle viraler Gastroenteritis bei Erwachsenen verantwortlich. Die WHO schätzt die Zahl der weltweit durch Gastroenteritis verursachten Todesfälle auf 5 bis 18 Millionen / Jahr (WALTER, 2000). Der schnelle und sichere Nachweis dieser Viren hat demnach eine große Bedeutung.

Der direkte Nachweis enteraler Viren ist, in Analogie zu bakteriellen Krankheitserregern, wenig sinnvoll. Viele pathogene Viren sind bis heute unbekannt oder entziehen sich auch aufgrund ihrer Vielzahl einem Direktnachweis in der Routineuntersuchung. Weiterhin kommen sie häufig in sehr geringen Konzentrationen vor, was nicht selten eine Untersuchung von mehr als 10 l Wasser nötig macht. Obwohl zahlreiche Methoden zum Nachweis enteraler Viren existieren, sind sie im Allgemeinen sehr teuer, technisch anspruchsvoll und zeitintensiv. Ferner existieren nicht für alle pathogenen Viren geeignete Kultivierungsmethoden. Die meisten Enteroviren, die eine eigene taxonomische Gruppe darstellen (einschließlich Poliovirus, Coxsackievirus und Echovirus), lassen sich gut auf Zellkultur nachweisen und sind deshalb gut charakterisiert. Andere Gruppen, wie z.B. einige Serotypen der Adenoviren oder Reoviren, lassen sich ebenfalls kultivieren, verursachen allerdings keine

gastrointestinalen Erkrankungen (WYN-JONES UND SELLWOOD, 2001). Die übrigen enteralen Viren bilden taxonomisch eine sehr heterogene Gruppe. Dazu gehören z.B. die Noro- und Rotaviren, Adenoviren des Serotyps 40 / 41, sowie Hepatitis A- und E-Viren. Diese Viren lassen sich, wenn überhaupt, nur sehr schlecht kultivieren.

Deshalb werden seit einigen Jahren in zunehmendem Maß molekularbiologische und immunologische Nachweismethoden entwickelt (BHATTACHARYA et al., 2004, JIANG UND CHU, 2004, LAVERICK et al., 2004, LECLERC et al., 2000, PUSCH et al., 2005, WYN-JONES UND SELLWOOD 2001). Die molekularen Methoden sind den klassischen Methoden vor allem in punkto Selektivität und Zeitbedarf klar überlegen. Für einige dieser Methoden ist sogar eine automatisierte Probenverarbeitung denkbar. Die heutigen Visionen zum Nachweis von Pathogenen reichen von Teststäbchen bis zur online-Messung mit Hilfe von antikörperbesetzten Glasfasern, die bei Pathogenkontakt Lichtsignale aussenden. HOT et al. (2003) führen den molekularen Nachweis von Enteroviren-RNA mittels RT-PCR als möglichen Indikator für die Anwesenheit enteraler Viren in Gewässern an. Allerdings, und das ist wahrscheinlich ihre größte Schwäche, weisen sowohl die molekularen als auch die immunologischen Methoden nur bestimmte Strukturen, wie z.B. bestimmte Zielsequenzen auf dem Genom oder spezifische Membranrezeptoren, nach. Über die tatsächliche Infektiösität des detektierten Pathogens kann keine Aussagen getroffen werden (BHATTACHARYA et al., 2004, LOPEZ-SABATER et al., 1997, RICHARDS, 1999).

Es wurde vorgeschlagen (und dies ist auch Bestandteil der derzeit noch gültigen EU-Badegewässerrichtlinie [76/160/EWG]), infektiöse Enteroviren als ein „Model-Virus“ und generellen Indikator für enterale pathogene Viren, wie z.B. Hepatitis A-Viren, Noroviren, Rotaviren und Astroviren, zu verwenden (DELEON et al., 1990, MARGOLIN et al., 1991, SCHWAB et al., 1993). Allerdings konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Enterovirenkonzentration und Hepatitis A-Viren (DUBROU et al., 1991, SHIEH et al., 1991, LEGUYADER et al., 1993, TSAI et al., 1993) und anderen enteralen Viren (BLOCK 1983, HOFF UND AKIN 1983, WEST 1991) bisher nicht schlüssig nachgewiesen werden. Auch aus inhaltlichen Überlegungen können z.B. die zu den Enteroviren gehörenden Cocksackie B-Viren wohl kaum in Zusammenhang mit den Gastroenteritis verursachenden Noroviren gebracht werden. Ein gleichzeitiges Auftreten im Ablauf einer Kläranlage wäre deshalb eher zufällig als inhaltlich begründet. Deshalb scheint der Nachweis bzw. Nichtnachweis von Enteroviren als Vorhersagemodel einer Kontamination mit anderen enteralen Viren und damit des potentiellen Gesundheitsrisikos eher ungeeignet (METCALF et al., 1995). In der geplanten

Novellierung der EU-Badegewässerrichtlinie soll auf den Enterovirus-Nachweis, vor allem auch wegen der aufwändigen Nachweismethode, verzichtet werden (DIZER et al., 2005).

Als Alternative oder Ergänzung bieten sich möglicherweise geeignetere Indikatoren für eine fäkale Kontamination mit Viren an. So sind vor allem die mit der Darmflora assoziierten Bakteriophagen seit längerer Zeit in der Diskussion (LECLERC et al., 2000). Nach GRABOW et al. (1995) soll ein Nichtnachweis an Somatischen- und F+ RNA Coliphagen eindeutig auch die Abwesenheit enteraler Viren indizieren. Bakteriophagen (oder kurz „Phagen“) sind selbst Viren, die Bakterien für ihren Vermehrungszyklus brauchen. Sie ähneln enteralen Viren zum Teil in Größe und Struktur und haben gegebenenfalls auch weitere Eigenschaften, wie beispielsweise die hohe Resistenz gegenüber verschiedenen Inaktivierungsfaktoren, mit diesen gemein.

Es gibt spezifische Phagen für fast allen bakteriellen Gruppen, selbst bei Cyanobakterien, Archaeobakterien und Mycoplasmen (GRABOW, 2000a). Taxonomisch lassen sich die zur Beurteilung der Wasserqualität in Frage kommenden Phagen aktuell, hauptsächlich auf Grund morphologischer Merkmale und der Art der Nukleinsäure, in sechs Familien einteilen (MANIOFF UND ACKERMANN, 1998) (Abbildung 1):

- *Myoviridae*: kubisches Capsid (icosahedral oder gestreckt), lineare doppelsträngige DNA (dsDNA), langer kontraktile Schwanz
- *Siphoviridae*: kubisches Capsid (icosahedral), lineare doppelsträngige DNA, langer nicht-kontraktile Schwanz
- *Podoviridae*: kubisches Capsid (icosahedral), lineare doppelsträngige DNA, kurzer nicht-kontraktile Schwanz
- *Microviridae*: kubisches Capsid (icosahedral), zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA), keinen Schwanz
- *Inoviridae*: filamentös oder stäbchenförmig, zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA), keinen Schwanz
- *Leviviridae*: kubisches Capsid (icosahedral), lineare einzelsträngige RNA (ssRNA), keinen Schwanz

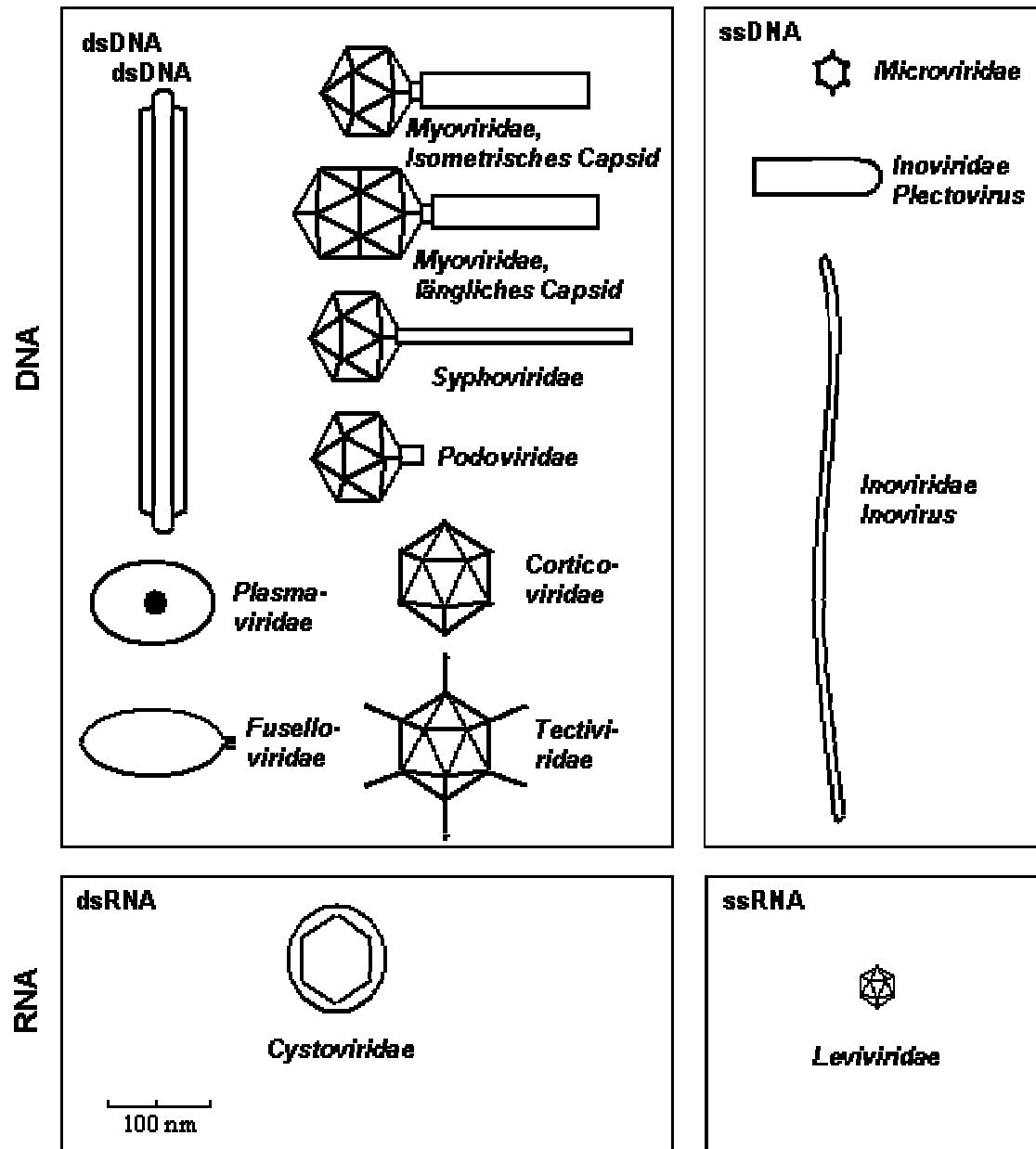


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur und Größe verschiedener Bakteriophagenfamilien (nach MURPHY et al., 1995)

Es existiert eine Anzahl weiterer Familien, wie *Cystoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Plasmaviridae*, *Rudiviridae* und *Fuselloviridae*, mit geringerer Bedeutung. Interessante Kandidaten als Indikatoren für enterale Viren in Gewässern sind Somatische Coliphagen, F+ RNA Coliphagen (*Leviviridae*) und *Bacteroides fragilis*-infizierende Phagen (*Syphoviridae*) (IAWPRC 1991, HAVELAAR, 1993, JOFRE et al., 1995).

Somatische Coliphagen gehören zu einer sehr heterogenen Gruppe von Phagen mit unterschiedlichen Charakteristika, die sich allerdings alle bestimmter Rezeptoren in der Zellwand des Wirtsbakteriums bedienen. Sie kommen in den Familien *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* und *Microviridae* vor. Die Wirtstämme sind *E.coli* bzw. eng mit *E.coli* verwandte *Enterobacteriaceae*.

Alle bekannten F+ RNA Coliphagen gehören zur Familie *Leviviridae*. Obwohl sie sich in einigen Eigenschaften unterscheiden, bilden sie eine homogene Gruppe (DURÁN et al., 2002). Ihre Wirte sind Bakterien, die das F-Plasmid besitzen, das ursprünglich bei *E.coli* K12 entdeckt wurde. Zu Beginn des Infektionsprozesses adsorbieren die F+ RNA Coliphagen an sogenannte F-Pili, für die das F-Plasmid codiert. Das F-Plasmid ist durch bakterielle genetische Austauschprozesse (horizontaler Gentransfer) auf zahlreiche Gram-negative Bakterien übertragbar.

Neben den F+ RNA Coliphagen können Bakterien mit F-Pili noch von F+ DNA Coliphagen (*Inoviridae*) infiziert werden. Das Wachstum der F+ RNA Coliphagen wird durch RNase gehemmt, wodurch man beim Nachweis F+ RNA Coliphagen von F+ DNA Coliphagen unterscheiden kann.

Die meisten Bakteriophagen, die *Bacteroides fragilis* infizieren, gehören zur Familie *Siphoviridae* und scheinen ebenfalls eine homogene Gruppe zu bilden (PUIG et al., 2000).

Zahlreiche Studien belegen für bestimmte Bedingungen eine höhere Resistenz, vor allem der *Bacteroides fragilis*-infizierenden Phagen, der Somatischen Coliphagen, insbesondere aus der Familie der *Siphoviridae*, bzw. der F+ RNA Coliphagen, gegenüber den klassischen Indikatoren. Allerdings sind die erzielten Resultate teilweise sehr widersprüchlich und scheinen stark von äußeren Bedingungen, z.B. dem verwendeten Wirtstamm, abzuhängen

(DAVIES-COLLEY et al., 1999, DURÁN et al., 2002, LUCENA et al., 2003, MUNIESA et al., 1999, NOBLE et al., 2004, SINTON et al., 2002).

1.2 Tagebauseen

Nach dem spürbaren Rückgang der Braunkohleindustrie in Europa in den letzten 10 bis 15 Jahren, vor allem in Polen, der ehemaligen Tschechoslowakei und auch in Deutschland, entstand ein riesiges Sanierungsgebiet. Das durch den Braunkohleabbau entstandene Massendefizit kann nachhaltig durch die Flutung mit Grund- oder Oberflächenwasser ausgeglichen werden. Die Schaffung von Tagebauseen ist daher ein wichtiger und richtiger Schritt in Richtung einer nachhaltig nutzbaren Bergbaufolgelandschaft. Dafür spricht auch ein gewisser Nutzungsdruck seitens der anwohnenden Bevölkerung. So leben beispielsweise im Mitteldeutschen Braunkohlerevier, im Großraum Leipzig – Halle – Merseburg – Bitterfeld, ca. 1,5 Mio. Menschen. Zur Gewährleistung der Nachhaltigkeit ist die Herstellung eines ausgeglichenen, sich weitestgehend selbst regulierenden Wasserhaushaltes unter Berücksichtigung der ökologischen Bedingungen und der geplanten Nutzungsziele erforderlich. Diese Sanierungsziele wurden 1992 gesetzlich verankert (HAFERKORN 1999).

Die meisten der stillgelegten Tagebaue werden momentan noch geflutet oder haben vor kurzem ihren geplanten Endwasserstand erreicht. Einige dieser Seen füllen sich über den natürlichen Wiederanstieg des Grundwassers. Aus verschiedenen Gründen ist allerdings die bevorzugte Strategie die Flutung mit Oberflächenwasser, z.B. aus nahegelegenen Flüssen, bzw. mit Sumpfungswasser benachbarter aktiver Tagebaue.

Dagegen sind die hygienische Qualität des verfügbaren Oberflächenwassers sowie die Fracht der importierten Nährstoffe, die maßgeblichen Einfluss auf die Trophie des gesamten Ökosystems des Tagebausees haben können, oft als bedenklich einzustufen. Für den späteren Nutzungszweck, z.B. als Bade- und Freizeitsee, sind die hygienische Qualität des Seewassers bzw. des Flutungswassers, sowie der trophische Zustand von übergeordneter Bedeutung.

Ziel muss die Einhaltung der Anforderungen der EU-Badegewässerrichtlinie, sowie eine niedrige Nährstoffkonzentration, zur Vermeidung von Massenentwicklungen von Cyanobakterien, sein.

1.3 Zielsetzung

Der im Mitteldeutschen Braunkohlerevier gelegene Tagebausee Delitzsch-SW (der zukünftige Werbeliner See) wird seit 1998 mit Oberflächenwasser aus der Neuen Luppe geflutet. Der Transport des Wassers von der Neuen Luppe zum Tagebausee erfolgt über eine Fernleitung. In die Neue Luppe leitet etwas oberhalb der Fernleitung die Kläranlage Leipzig-Rosental ein, die mit ca. 125.000 m³ pro Tag nahezu das gesamte Abwasser der Stadt Leipzig aufbereitet (nähere Ausführungen siehe Kapitel 2.1.1.1). Es gab also Grund zur Befürchtung, dass sich die ungenügende hygienische Beschaffenheit des Flutungswassers in der Wasserqualität des Tagebausees widerspiegeln könnte. In Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut-Berlin wurden in dieser Arbeit folgende Sachverhalte bzw. Zusammenhänge untersucht:

- der hygienische und trophische Zustand des Werbeliner Sees
- die Effizienz der Kläranlage Leipzig-Rosental hinsichtlich der Elimination fäkaler und viraler Indikatoren, sowie der Elimination Enteraler Viren
- der Einfluss der Neuen Luppe bzw. der Fernleitung auf die Konzentration fäkaler Bakterien und Bakteriophagen
- die Evaluierung von Bakteriophagen als Indikatoren für eine mögliche virale Kontamination
- der Zusammenhang zwischen molekularbiologischem Nachweis und Infektiösität von Enteroviren

Ziel der Arbeit war es, in wöchentlichen Routineuntersuchungen die Konzentrationen bakterieller und viraler Indikatoren, sowie die An- oder Abwesenheit enteraler Viren im Wassersystem von der Kläranlage Leipzig-Rosental über die Neue Luppe und die Fernleitung bis zum Werbeliner See, zu untersuchen. Als Indikatoren für den hygienischen Zustand dienten die Parameter *E.coli*, Enterokokken, sowie Sporen von *Clostridium perfringens*. Als mögliche Indikatoren einer viralen Kontamination wurden Somatische- und F+ RNA Coliphagen untersucht.

Das Untersuchungsgebiet stellt ein breites Spektrum an Gewässertypen dar, die sich in ihrer Struktur und dem Grad der fäkalen Kontamination stark unterscheiden. Die räumliche Anordnung vom Kläranlagen-Zulauf, Kläranlagen-Ablauf über das Fließgewässer Neue Luppe und der Fernleitung zum Standgewässer Werbeliner See lässt gleichzeitig eine Einordnung bezüglich des Alters der Kontamination zu.

Verschiedene, hygienische relevante enterale Viren (Entero-, Noro-, Astro-, Adeno-, Rotaviren, sowie Hepatitis A-Viren) sollten mittels geeigneter molekularbiologischer Methoden detektiert und quantifiziert werden. Für ausgewählte Probenahmepunkte sollte zusätzlich der Nachweis infektiöser Enteroviren bzw. Adenoviren auf Zellkultur erfolgen.

Obwohl zahlreiche Studien über die Inaktivierungsraten verschiedener Indikatorbakterien und -phagen existieren, lag der Fokus dieser Arbeiten häufig auf der Persistenz einzelner Laborstämme. Meist wurden nur einzelne Indikatoren, wie z.B. Bakteriophagen im Vergleich zu *E.coli*, Enterokokken oder *Cl. perfringens*-Sporen, untersucht (LUCENA et al., 2004, NOBLE et al., 2004, SINTON et al., 2002). Untersuchungen zur vergleichenden Bestimmung von Inaktivierungsraten von Bakteriophagen oder Bakterien gegenüber einem weiten Spektrum enteraler Viren finden sich dagegen nur selten (z.B. HOT et al., 2003). Deshalb sollten zusätzlich Laborexperimente weiteren Aufschluss über die Resistenz der verschiedenen bakteriellen Indikatoren, Bakteriophagen und enteralen Viren gegenüber Einflüssen aus der Umwelt liefern.

Zur Untersuchung des Trophiestatuses, des mit abwasserbelastetem Oberflächenwasser gefluteten Werbeliner Sees, wurden die Struktur und die Biomasse des Phyto- und Zooplanktons und die Primärproduktion des Phytoplanktons eingehender betrachtet. Diese Untersuchungen schlossen physikalisch-chemische Parameter, wie z.B. Phosphor- bzw. Stickstoffkonzentration, Sichttiefe, Sauerstoffkonzentration, sowie mögliche Versauerungstendenzen, mit ein.

2 Hauptteil

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Untersuchungen am Werbeliner See

2.1.1.1 Untersuchungsgebiet

Der Tagebaurestsee Delitzsch-SW (der zukünftige Werbeliner See) befindet sich im Nordraum des Mitteldeutschen Braunkohlereviers um Leipzig und liegt ca. 5 km südwestlich der Stadt Delitzsch (Abbildung 2). Im Gegensatz zum Südraum wird im Nordraum kein Braunkohleabbau mehr betrieben. Eine Nutzung von Sumpfungswässern aus noch benachbarten aktiven Tagebauen für die Flutung ist also nicht, oder nur in sehr geringem Umfang, möglich. Eine Füllung der Restlöcher kann demnach nur über den Grundwasserwiederanstieg oder durch Flutung mit Oberflächenwasser erfolgen. Die Flutung des Werbeliner Sees begann im November 1998 mit Wasser aus der Neuen Luppe (ca. $15 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$), einem Nebenarm der Weißen Elster. Das Wasser wird dazu mit einer ca. 10 km langen Fernleitung über eine vorhandene Pumpenstation in Höhe der Ortschaft Lützschena zum Tagebaurestsee transportiert (Abbildung 2). Der Zustrom von Grundwasser in den Tagebaurestsee beträgt nach HAFERKORN et al. (1999) für den Zeitraum der Flutung nur rund 0,4 % der Fremdflutungswassermenge aus der Neuen Luppe. Für den oberirdischen Zufluss sowie den Kippenwasserzufluß beträgt dieser Anteil ca. 5,9 %. Die Flutung des Sees wird 2005 / 06 mit einem Gesamtwasservolumen von ca. 43 Millionen m^3 und einem Wasserstand von +98 m NN (von +67 m NN zu Beginn der Flutung) beendet sein.

Tabelle 1 zeigt einige morphometrische und limnologische Merkmale des Werbeliner Sees. Das Tiefenprofil des Sees ist sehr heterogen, mit einer tiefen Mittelrinne (bis 32 m) in Nord-Süd Richtung und ausgeprägten Flachwasserbereichen bis 6 m im Ost- und vor allem im Westteil des Sees.

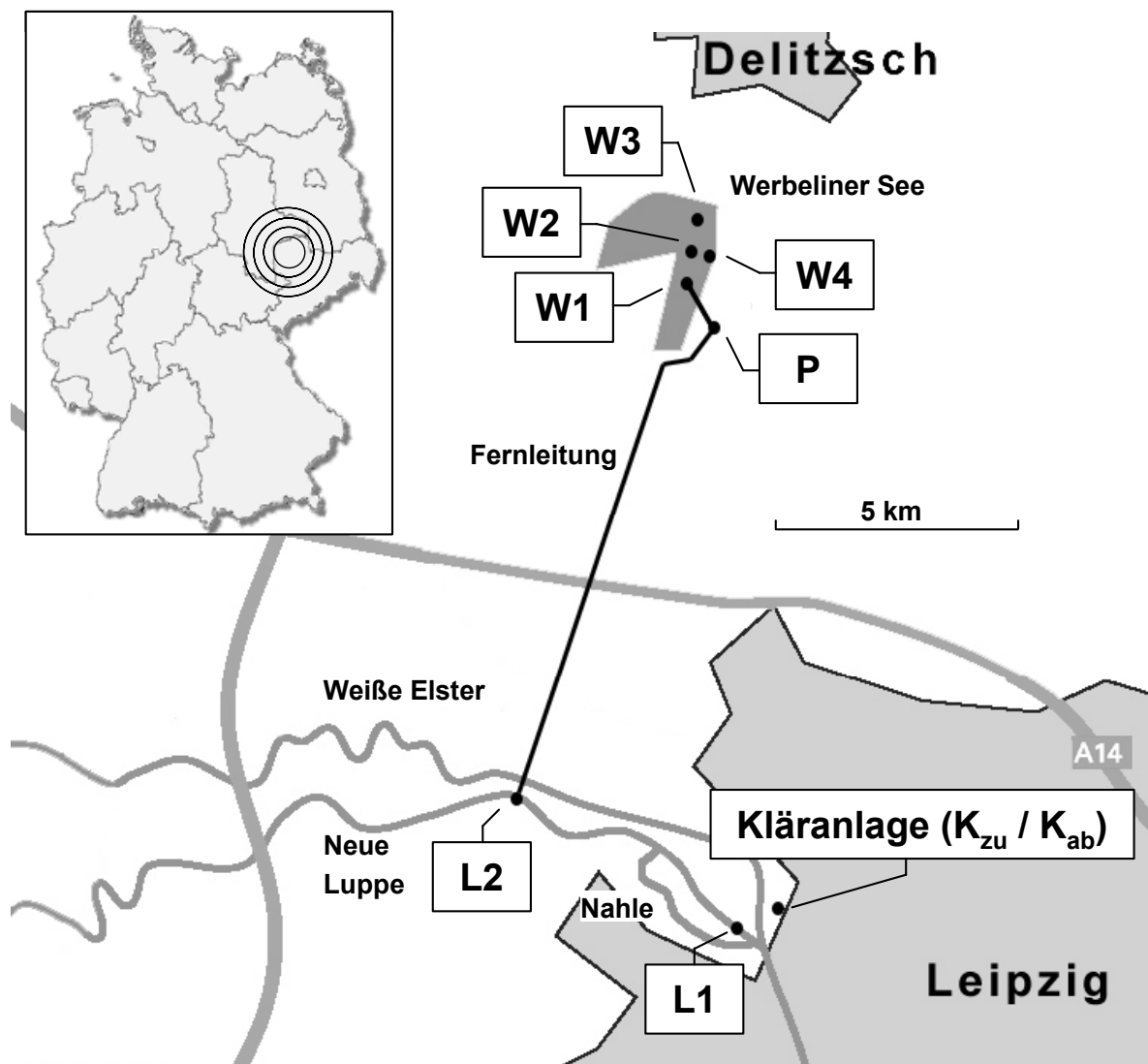


Abbildung 2: Mitteldeutsches Braunkohlerevier mit Probenahmegebiet und Probenahmepunkten um den Tagebausee Delitzsch-SW. Das behandelte Abwasser der Kläranlage Leipzig-Rosental mündet in die Neue Luppe und wird etwas stromabwärts mittels einer Fernleitung zum Tagebausee transportiert. K_{zu}, K_{ab}: Zu- und Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental, L1 (Neue Luppe, unmittelbar nach Einleitung der Kläranlage), L2 (Neue Luppe, Beginn der Fernleitung), P (Probenahmepunkt kurz vor Ende der Fernleitung), W1: Einleitungsstelle in den Werbeliner See, W2 und W3: 1000m bzw. 1500m nördlich von W1, W4: Ostufer

Tabelle 1: Morphometrische und limnologische Charakterisierung des Tagebaurestsees Delitzsch-SW

Morphometrische Eigenschaften			Limnologische Eigenschaften		
Höhe über NN	[mNN]	+98	pH	[-]	7,0 - 8,5
Wasservolumen	[m ³]	43 · 10 ⁶	Sichttiefe	[m]	2,5 - 9,5
Seeoberfläche	[m ²]	4,5 · 10 ⁶	SRP	[µg P · l ⁻¹]	< 10
Max. Tiefe	[m]	32	TN	[mg N · l ⁻¹]	2 - 3
Mittlere Tiefe	[m]	9,9	Chl-a	[µg · l ⁻¹]	< 10

Die Neue Luppe ist weitestgehend reguliert. Ihr Uferbereich besteht i.d.R. aus einem 30 m breiten Randstreifen, der in Deiche eingefasst dem Hochwasserschutz dient. Die Randstreifen werden durch intensive Mahd und durch Weidewirtschaft mit Schafen kurzgehalten.

Das Wasser aus der Neuen Luppe bestimmt maßgeblich die sich während der Flutungsphase einstellende Seewasserbeschaffenheit. Das Wasser der Neuen Luppe ist neutral und gut gepuffert, wird allerdings durch die Einleitung geklärten Abwassers aus der Kläranlage Leipzig-Rosental und durch Mischwasserabschläge bei Niederschlagsereignissen stark beeinflusst.

Die Kläranlage Leipzig-Rosental bereitet täglich ca. 125.000 m³ Rohabwasser auf. Der Anteil des geklärten Abwassers in der Neuen Luppe beträgt je nach Wasserstand der Neuen Luppe ca. 5 % (Mittlerer Abfluss der Neuen Luppe ca. 35 m³ · s⁻¹, gerechnet nach Vereinigung Neue Luppe – Nahle), kann im Niedrigwasserfall jedoch bis auf über 50 % ansteigen (Frau Dr. Carmienke, Regierungspräsidium Leipzig, persönliche Mitteilung). Im Falle von

Starkniederschlägen kann es vorkommen, dass das Abwasser durch mangelnde Kapazität der Kläranlage ungeklärt in die Neue Luppe fließt.

Die Fließstrecke der Neuen Luppe zwischen der Einleitungsstelle der Kläranlage Leipzig-Rosental und der Entnahmestelle Pumpstation Lützschena beträgt ca. 6 km. 2 km nach der Kläranlage vereinigt sich die Neue Luppe mit der Nahle, ebenfalls einem Nebenarm der Weißen Elster.

2.1.1.2 Probenahmestellen und Probenahmehäufigkeit

Im Untersuchungsgebiet wurden zwischen der Kläranlage Leipzig-Rosental, Neuer Luppe, Fernleitung und Werbeliner See insgesamt neun Probenahmestellen etabliert (Abbildung 2).

Auf der Kläranlage wurden der Zulauf (K_{zu}) und der Ablauf (K_{ab}) beprobt. Die Probenahmestelle L1 befand sich ca. 200 m stromabwärts von der Einleitungsstelle der Kläranlage in der Neuen Luppe. Nach ca. 6 km Fließstrecke wurde die Neue Luppe ein weiteres mal beprobt (Probenahmestelle L2). Die Entnahmestelle befand sich in Höhe der Pumpstation Lützschena, über die ein Teil des Luppewassers in der Fernleitung zum Werbeliner See transportiert wird. Ferner wurden zwischen Januar 2003 und Januar 2004 an drei Stellen im Mündungsbereich der Nahle in die Neue Luppe Proben genommen. Zwei Probenahmestellen befanden sich in der Neuen Luppe ca. 100 m vor bzw. 200 m nach dem Zusammenfluss mit der Nahle (L1b und L1c), ein dritter in der Nahle, kurz vor der Einmündung in die Neue Luppe (Probenahmestelle Nahle).

Kurz vor dem Ende der Fernleitung (Entfernung zum Werbeliner See ca. 1000 m) befindet sich ein Auslass aus der Fernleitung (Probenahmestelle P). Das Wasser dient der Vorfluterstützung des Baches Alter Lober. Die an dieser Stelle genommenen Wasserproben spiegeln somit direkt die Qualität des Flutungswassers wider.

Im See wurden an den Punkten W1 bis W4 Proben direkt an der Wasseroberfläche genommen. Die Fernleitung drückt das Flutungswasser am Gewässergrund in einer Tiefe zwischen 4 m (zu Beginn der Untersuchung im September 2002) und 6 m (Dezember 2004) in den See. Der Probenahmepunkt W1 befand sich in einem geschätzten Radius von nicht mehr als 20 m von dieser Stelle, bezogen auf die Wasseroberfläche. W2 und W3 lagen etwa 1000 m bzw. 1500 m nördlich von W1. Die Probenahmestellen W1 bis W3 waren durch Bojen markiert.

Während W1 (Einleitungsstelle) sich im östlichen Flachwasserbereich (< 6 m, siehe oben) befand, waren die Bojen W2 und W3 genau an einem unterseeischen Hang zwischen dem Flachwasserbereich und der Mittelrinne (siehe Kapitel 2.1.1.1) verankert. Da die Leine zwischen Boje und Verankerung wegen des Wasseranstieges etwas Spiel haben musste, variierte die Wassersäule unter den Bojen W2 / W3 je nach Windrichtung zwischen 16 und 25 m. An der Probenahmestelle W4, in Nord-Süd-Ausrichtung ungefähr in Höhe von W2, konnten Proben direkt vom Ostufer genommen werden.

In einem begrenzten Zeitraum der Untersuchung wurden zusätzlich Proben im Tiefenprofil unter W2 in 5 und 10 m Tiefe (Oktober 2002 bis Oktober 2003), sowie am Gewässergrund (Oktober 2002 bis März 2004) genommen.

Alle Probenahmestellen wurden hinsichtlich der Konzentration an *E.coli*, Enterokokken, Somatischen- und F+ RNA Coliphagen und *Cl. perfringens*-Sporen untersucht. Zusätzlich wurden die Probenahmestellen K_{zu}, K_{ab}, P und W4 hinsichtlich der Konzentration bzw. der Anwesenheit enteraler Viren untersucht.

Als chemisch-physikalische Parameter wurden Temperatur, O₂, pH-Wert, Leitfähigkeit, Sichttiefe und Chl-a (Seeproben außer W4) vor Ort und Gesamtphosphor (TP), Gelöster Reaktiver Phosphor (SRP), NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, SO₄²⁻, sowie Cl⁻ im Labor gemessen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Probenahmestellen und die Häufigkeit der Probenahmen.

Der Probentransport zum Labor erfolgte in gekühlten Transportbehältern. Die Proben wurden im Labor bis zur Untersuchung (innerhalb von 12 h) bei 4 °C gelagert. Teilproben zur Untersuchung der Bakteriophagenkonzentration sowie für die chemischen Analysen, die am Ionenchromatographen erfolgten (siehe Kapitel 2.1.9), wurden bei -20 °C aufbewahrt (Untersuchung innerhalb von 8 Wochen).

Tabelle 2: Überblick über die untersuchten Probenahmestellen und die Probenahmehäufigkeit (*Cl.perfringens*-Sporen = CP)

	Bakterielle Indikatoren und Bakteriophagen	Molekularer Nachweis enteraler Viren	Chemische Parameter
K_{zu}	mindestens monatlich (CP unregelmäßig)	mindestens monatlich	mindestens monatlich
K_{ab} / P / W4	wöchentlich (CP unregelmäßig)	wöchentlich (zusätzlich Enteroviren- Nachweis einiger RT- PCR-positiver Proben auf Zellkultur)	14-tägig
L1 / L2 / W1 / W2	14-tägig (CP unregelmäßig)	-	14-tägig
L1b / L1c / Nahle	10 mal zwischen Jan. 03 und Jan. 04	-	-
W2 5m / W2 10m	14-tägig zwischen Okt. 02 und Okt. 03 (CP unregelmäßig)	-	14-tägig zwischen Okt. 02 und Okt. 03
W2 Grund / W3	14-tägig zwischen Okt. 02 und März 04 (CP unregelmäßig)	-	14-tägig zwischen Okt. 02 und März 04

2.1.2 Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser

In einem Laborversuch wurde die Inaktivierung bakterieller und viraler Indikatoren, sowie enteraler Viren über die Zeit verfolgt. Dabei wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen gewählt, um den Einfluss verschiedener Faktoren zu bestimmen, die eine Inaktivierung begünstigen (Licht, Temperatur etc.).

Dazu wurde verdünntes Rohabwasser der Kläranlage Leipzig-Rosental (1:10 Verdünnung mit Wasser aus dem Werbeliner See) in Dialyseschläuche á 750 ml gefüllt und mit Dialyseschlauchklemmen an beiden Enden verschlossen. Zur Entfernung des enthaltenen Glycerins und etwaiger Schwermetalle wurden die Dialyseschläuche im Vorfeld 6 h unter schwach fließendem Wasser gespült. In drei mit Wasser aus dem Werbeliner See befüllten 60 l – Fässer (HDPE) wurden je zwölf Dialyseschläuche in ca. 30 bis 50 cm Wassertiefe exponiert. Ein Fass wurde bei 6 °C ohne Licht aufgestellt, das zweite bei Raumtemperatur (ca. 17 °C), ebenfalls ohne Licht. Das dritte Fass wurde bei Raumtemperatur zusätzlich mit einer Lampe (Fa. Leipziger Leuchten GmbH, Leuchtmittel Halogenmetall dampflampe OSRAM HQI-TS 150W, Farbtemperatur 5200K (Tagslicht)) in ca. 1,5 m Abstand von der Wasseroberfläche beschienen.

Die genauen Bedingungen des Lichteinflusses wurden nicht definiert. Das Leuchtmittel besaß einen gewissen UV-Anteil, wie viel davon durch die Wassersäule über den Dialyseschläuchen bzw. durch die Dialyseschläuche selbst absorbiert wurde, ist aber unbekannt.

In zeitlich definierten Abständen wurden je zwei Schläuche entnommen, gepoolt und hinsichtlich der Konzentration an *E.coli*, Enterokokken, *Cl. perfringens*-Sporen sowie Somatischen und F+ RNA Coliphagen untersucht. Entero-, Noro-, Astro-, Rota-, Adeno- und Hepatitis A-Viren wurden qualitativ mittels nested-PCR bzw. nested-RT-PCR nachgewiesen. Für Entero-, Noro- und Astroviren wurde zusätzlich eine Quantifizierung der Genome durchgeführt. Zudem wurden Teilproben auf infektiöse Enteroviren untersucht. Regelmäßig wurden O₂, pH-Wert und Temperatur im Expositionswasser kontrolliert.

2.1.3 Konzentrierung von Wasserproben und Extraktion der Nukleinsäuren

Zum Nachweis enteraler Viren war es wegen der zu erwartenden geringen Konzentrationen nötig, die Proben durch verschiedene Maßnahmen aufzukonzentrieren. Die Ausgangsvolumina der Proben waren für K_{zu} 28 ml, K_{ab} 5 l, P und W4 je 10 l.

Die K_{zu}-Proben wurden bei 9.400 x g (10 min bei Raumtemperatur) zentrifugiert, die Überstände bei 186.000 x g (1,5 h, 4 °C) ultrazentrifugiert und das Pellet in 3 ml DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die Konzentrate wurden aliquotiert und bei –20 °C bis zur Extraktion der viralen Nukleinsäuren aufbewahrt.

Die Proben der Probenahmestellen K_{ab}, P und W4 wurden mittels Flockung mit Al₂(SO₄)₃, wie bei WALTER UND RÜDIGER (1981) beschrieben, aufkonzentriert. Die erhaltenen Konzentrate wurden anschließend ultrazentrifugiert (146.000 x g, 4 h, 4 °C), und die Pellets in phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert (Endvolumen 4 ml).

Für die unter Kapitel 2.1.2 beschriebenen Laborversuche wurden jeweils 1 l Wasser wie oben beschrieben mittels Flockung, Ultrazentrifugation und Resuspension aufkonzentriert (Endvolumen 2 ml).

Für die Extraktion der viralen Nukleinsäuren wurden pro Probe 140 µl (Probenahmestellen K_{zu}, K_{ab}, P und W4) bzw. 200 µl (Laborversuche, siehe Kapitel 2.1.2) mittels eines kommerziellen Kits (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet. Die Elution der RNA / DNA erfolgte in 60 µl (Probenahmestellen K_{zu}, K_{ab}, P und W4) bzw. 50 µl (Laborversuche) 10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Alle Proben wurden auf die Anwesenheit von Entero-, Noro-, Astro-, Rota-, Adeno- und Hepatitis A-Virus-Nukleinsäuren mittels nested-PCR getestet.

2.1.4 Qualitativer molekularer Nachweis enteraler Viren

Der Nachweis enteraler RNA-Viren (Entero-, Noro-, Astro-, Rota-, Hepatitis A-Viren) erfolgte durch nested-RT-PCR bzw. durch nested-PCR für die DNA-tragenden Adenoviren. In einem ersten Schritt wurden dazu die Nukleinsäuren der RNA-Viren in die entsprechende

cDNA mittels Reverser Transkriptase (Gesamtreaktionsvolumen 10 µl) umgeschrieben. 5 µl der cDNA bzw. 5 µl DNA (Adenoviren) wurden in einer ersten PCR eingesetzt und amplifiziert.

In der anschließenden nested-PCR wurden 1 µl (Rota-, Noro-, Astro-, Hepatitis A-Viren) bzw. 2 µl (Adeno- und Enteroviren) des Amplifikats der ersten PCR als Template verwendet. Die Reaktionsbedingungen und die verwendeten Primer entsprechen denen in OH et al. (2003) und PUSCH et al. (2005).

Das Ergebnis einer PCR bezieht sich unter Berücksichtigung des Ausgangsvolumens der jeweiligen Probe (10 l, 5 l, 1 l bzw. 28 ml, siehe Kapitel 2.1.3), des Elutionsvolumens der Viren im entsprechenden Puffer (4 ml, 3 ml bzw. 2 ml, siehe Kapitel 2.1.3), der Probemenge für die Nukleinsäureextraktion, des Elutionsvolumens der RNA / DNA in Tris-HCl (60 µl bzw. 50 µl, siehe Kapitel 2.1.3), sowie des Volumens der in der ersten PCR eingesetzten Aliquots (5 µl) auf die in Tabelle 3 angegebenen Volumina. Bsp.: eine im Kläranlagen-Zulauf positiv auf Noroviren getestete Probe bezieht sich auf 0,109 ml Originalwasser. Negative Befunde werden nicht als „0“ angegeben, sondern als die theoretische Nachweisgrenze.

Tabelle 3: Den nested-PCR Ergebnissen zugrunde liegende Originalvolumina und daraus resultierende theoretische Nachweisgrenzen für die einzelnen Probenahmestellen, sowie für die Proben aus den Laborversuchen (siehe Kapitel 3.2).

Herkunft der Proben	Volumen [ml]	Resultierende theoretische Nachweisgrenze [Genome · l ⁻¹]
K _{zu}	0,109	9,2
K _{ab}	14,6	68,5
P / W4	29,2	34,2

Laborversuche

10

100

Nested-PCR-positive Proben von Entero-, Noro-, Hepatitis A-, Adeno-, Astro-, sowie Rotaviren wurden mittels ABI Prism 377 DNA sequencer und Big Dye Terminator Cycle Sequencing Mix (Perkin Elmer, Wellesley, USA) sequenziert. Die Chromatogramme wurden mit der Software Sequencher sequence analysis program version 3.1.1 (Gene Code Corp., Ann Arbor, MI) analysiert und mit publizierten Referenzsequenzen (NCBI-Datenbank, Heidelberg) mittels BLAST-Algorithmus verglichen.

2.1.5 Molekulare Quantifizierung enteraler Viren

Neben dem qualitativen Nachweis der enteralen Viren wurden die Wasserproben zusätzlich hinsichtlich der Konzentration der Genome von Noro-, Astro- und Enteroviren untersucht. Quantifiziert wurde die Mehrheit der mittels nested-RT-PCR positiv getesteten Proben (siehe Kapitel 2.1.4).

Tabelle 4: Theoretische Nachweisgrenzen der mittels real-time-PCR quantifizierten Genomkonzentrationen für die einzelnen Probenahmestellen, sowie für die Proben aus den Laborversuchen (siehe Kapitel 3.2).

Herkunft der Proben	Resultierende theoretische Nachweisgrenze [Genome · l ⁻¹]
K _{zu}	18,5
K _{ab}	137
P / W4	68,5
Laborversuche	200

Für die Quantifizierung wurde eine real-time-PCR (TaqMan) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine spezifische single-tube Methode mittels Quantitect Probe RT-PCR TaqMan Kit (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland). Für die real-time-PCR wurden jeweils 2,5 µl extrahierte RNA eingesetzt (nähere Angaben dazu bei PUSCH et al. (2005)). Unter der Annahme, dass ein einzelnes RNA-Molekül ausreicht, um ein positives Signal zu erhalten, lagen die theoretischen Nachweisgrenzen für die einzelnen Probenahmestellen in der real-time-PCR bei den in Tabelle 4 aufgeführten Werten.

2.1.6 Nachweis infektiöser Entero- und Adenoviren

Um Informationen über das Infektiöspotential molekularbiologisch positiv getesteter Wasserproben zu erhalten, wurde versucht, einzelne Proben auf verschiedenen Zelllinien zu kultivieren. Die Kultivierbarkeit gilt dabei als eindeutiges Zeichen für eine Infektiösität. Je nach Probenahmeort bzw. Fragestellung erfolgte die Kultivierung aus organisatorischen Gründen in verschiedenen Laboratorien und nach unterschiedlichen Protokollen.

Der Enterovirusnachweis für den Probenahmeort K_{ab} , sowie einzelne P und W4-Proben erfolgte auf RD-Zellen (Rhabdomyosarkoma-Zellen) und wurde am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt. Details können der Arbeit von PUSCH et al. (2005) entnommen werden.

Im Rahmen einer Diplomarbeit (BRUNBEN, 2005) wurden zudem sämtliche im Untersuchungszeitraum genommene Proben von den Entnahmestellen P und W4 hinsichtlich infektiöser Enteroviren auf BGM-Zellen (Buffalo Green Monkey Nierenzelllinie) am Medizinisch Theoretischen Zentrum des Universitätsklinikums der TU-Dresden untersucht. Für die Kultivierung auf BGM-Zelllinien wurden für die P-Proben 800 µl und für die W4-Proben 1000 µl der Wasserkonzentrate (Kapitel 2.1.3) verwendet. Rückgerechnet auf die nicht-konzentrierten Wasserproben entspricht dies einem Originalvolumen von 2 l (Probenstandort P) bzw. 2,5 l (Probenstandort W4). Für einige Proben der Probenahmestelle P erfolgte zusätzlich ein Adenovirus-Nachweis auf 293-Zellen (Humane embryonale Nierenzelllinie). Dafür wurden 500 µl Wasserkonzentrat des Probenstandortes P (= 1,25 l Originalwasser) verwendet.

Für die in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Laborversuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser wurde ebenfalls ein

Nachweis infektiöser Enteroviren auf BGM-Zelllinie durchgeführt. Dabei wurde versucht, durch ein MPN-Verfahren (most probable number) mit Mikrotiterplatten und verschiedenen Probenverdünnungen infektiöse Enteroviren zu quantifizieren.

Dazu wurden BGM-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen (Fa. Greiner) mit D-MEM Medium (Fa. Gibco) unter Zusatz von 5 % (v/v) FKS (Fötales Kälber-Serum) und 0,5 % (v/v) Ciprofloxacinlactat (Ciprobay 200, Fa. Bayer) als Breitbandantibiotikum kultiviert. Subkonfluente Kulturen (der Zellverband ist im mikroskopischen Bild zu 70-80 % zusammengewachsen) wurden unter Verwendung von Trypsin-EDTA (Fa. Gibco) und frischem Medium auf Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten (Fa. Greiner) vereinzelt und frisch eingesät. Sobald die Zellen einen konfluenten (vollständiger Zellverband) Zellrasen ausgebildet hatten, wurden die Mikrotiterplatten mit den Wasserproben beimpft.

Dazu wurde 1 ml des gewonnenen Probenkonzentrats aus den Dialyseschläuchen (dieses Volumen entspricht 500 ml Originalwasser) bei 7.500 U · min⁻¹ für 15 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Überstand I). Das Pellet wurde mit 200 µl Beefextrakt (3 %ig) für 30 min gewaschen und erneut bei 7.500 U · min⁻¹ für 15 min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mit dem Überstand I vereinigt. Diese Prozedur entfernt sehr effektiv in der Probe enthaltene Bakterien und Pilze, die eventuell störend auf das Wachstum der BGM-Zellen wirken.

Das in den Mikrotiterplatten enthaltene Medium wurde durch einfaches Abgießen entfernt. Pro Kavität wurden 75 µl Probe zugesetzt, davon elf Kavitäten mit unverdünnter Probe, elf mit einer 1 : 4 Verdünnung (PBS) und zwei Kavitäten als Negativkontrolle mit dem entsprechenden Volumen D-MEM Medium. Die beimpften Zellkulturen wurden bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Proben vorsichtig mit 100 µl D-MEM Medium versetzt und das Probe-Mediumgemisch wieder entfernt. Jede Kavität wurde anschließend mit 1,5 ml frischem D-MEM Medium versetzt. Die Platten wurden anschließend mindestens zehn Tage bei 37 °C inkubiert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte eine mikroskopische Kontrolle hinsichtlich cytopathischer Effekte, die eindeutig durch ein großflächiges Ablösen des Zellrasens identifiziert werden konnten.

2.1.7 Detektion und Quantifizierung von *E.coli*, Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen

E.coli und Enterokokken wurden durch eine miniaturisierte MPN-Methode [DIN EN ISO 7899-1 bzw. DIN EN ISO 9803-1] auf Mikrotiterplatten mit einem spezifischen dehydrierten Substrat (MUG [4-methyl-umbelliferyl-beta-D-glucuronid] für *E.coli* und MUD [4-methyl-umbelliferyl-beta-D-glucosid] für Enterokokken) nachgewiesen (Fa. BIO-RAD, Frankreich). Dazu wurden jeweils 200 µl der zu untersuchenden Probe pro Kavität pipettiert. Für den MPN-Ansatz wurden die Proben mit einem Spezialverdünner für Mikrotiterplatten (Fa. BIO-RAD, Frankreich) verdünnt, wobei sich die Anzahl der Verdünnungsstufen aus der geschätzten Keimzahl der Probe ergab. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Anzahl der Verdünnungsstufen, die Anzahl beimpfter Kavitäten pro Verdünnungsstufe und den Messbereich für die einzelnen Probenahmeorte. Für die in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Laborversuche wurden in Abhängigkeit vom Probenahmetag unterschiedliche Verdünnungsstufen gewählt. Die Inkubationszeit betrug 48 h bei 44 °C. Der Nachweis der MUG bzw. MUD positiven Kavitäten erfolgte unter UV-Licht (366 nm).

Tabelle 5: Überblick über die Anzahl der Verdünnungsstufen, die Anzahl beimpfter Kavitäten pro Verdünnungsstufe und den Messbereich für die einzelnen Probenahmestandorte zur Bestimmung der Konzentrationen an *E.coli* und Enterokokken mittels miniaturisierter MPN-Methode mit Mikrotiterplatten.

Herkunft der Proben	Verdünnungsstufen	Anzahl der Kavitäten pro Verdünnungsstufe	Messbereich [Bakterien · (100 ml) ⁻¹]
K _{zu}	3	32 bei 1 : 100.000	1,4 · 10 ² – 1,7 · 10 ⁷
		32 bei 1 : 10.000	
		32 bei 1 : 1.000	
K _{ab} / L1	3	32 bei 1 : 1.000	1,4 · 10 ⁰ – 1,7 · 10 ⁵
		32 bei 1 : 100	
		32 bei 1 : 10	
L1b / Nahle / L1c /	3	48 bei 1 : 1	1,9 · 10 ⁻¹ – 3,9 · 10 ²

L2 / P		48 bei 1 : 20	
W1 / W2 / W3	1	96 bei 1 : 1	$1,0 \cdot 10^{-1} - 4,6 \cdot 10^1$
W4	1	288 bei 1 : 1	$3,5 \cdot 10^{-2} - 5,7 \cdot 10^1$

Bei Proben mit sehr geringer Enterokokkenkonzentration wurde teilweise der Nachweis mittels Membranfilterverfahren durchgeführt (DIN EN ISO 7899-2). Die statistische Analyse der mittleren Differenzen zwischen MPN- und Membranfilterverfahren mittels t-Test bei gepaarten Stichproben ergab dabei einen deutlich *nicht* signifikanten Unterschied ($p > 0,05$, $n = 8$), was die gleichzeitige Anwendung beider Methoden prinzipiell gestattet.

Der Nachweis von *Clostridium perfringens*-Sporen erfolgte mittels Membranfiltration nach ISO WD 6461-2.

2.1.8 Detektion und Quantifizierung von Somatischen- und F+ RNA Coliphagen

Die Konzentration an Somatischen Coliphagen wurde nach DIN EN ISO 10705-2 ermittelt. Für den Phagennachweis wurde eine *E.coli* C-Arbeitskultur (ATCC 13706) in MSB-Medium (modified Scholten's broth) bei 37 °C 2 bis 3 h geschüttelt. Die Inkubation wurde nach Erreichen einer OD der Bakteriensuspension von 0,10-0,15 (1 cm Schichtdicke, 578 nm) beendet. Vorversuche zeigten, dass dieser OD eine Bakterienkonzentration von $10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$ entspricht. Der Ansatz wurde auf Eis gegeben und umgehend verarbeitet. Je 1 ml Wasserprobe wurden mit 1 ml frischer *E.coli* C-Suspension und 2,5 ml verflüssigtem ssMSA-Medium (semi-solid modified Scholten's agar, 45 °C) vermischt. Das Gemisch wurde unverzüglich auf eine Agarplatte (vorbehandelt mit einer festen Schicht modified Scholten's agar, MSA) gegossen und kurz geschwenkt. Eine unbeimpfte *E.coli* C-Suspension wurde als Kontrolle mitgeführt.

F+ RNA Coliphagen wurden auf *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC 12484) nach DIN EN ISO 10705-1 nachgewiesen. Eine *S. typhimurium*-Arbeitskultur wurde ca. 3 h in trypton-yeast extract-glucose broth (TYGB) unter Schütteln inkubiert. Die OD für 10^8 Zellen pro ml lag bei 0,20. Der Versuchsansatz erfolgte analog zu den somatischen Coliphagen,

jedoch unter Verwendung von trypton-yeast extract-glucose-agar (TYGA) bzw. semi-solid trypton-yeast extract-glucose-agar (ssTYGA). Zur Unterscheidung zwischen F⁺ RNA Coliphagen und F⁺ DNA Coliphagen wurde zusätzlich in Parallelansätzen das verwendete ssTYGA mit 100 µl RNase (1 mg · ml⁻¹) versetzt.

Die Platten wurden bis zum Erstarren des Agars ca. 20 min stehen gelassen und mit der Agarseite nach oben bebrüht (37 °C, 16-20 h). Die Plaques (sich bildende Löcher im *E.coli*- bzw. *S. typhimurium*-Rasen) wurden gezählt und in plaque forming units (PFU) pro ml Wasserprobe umgerechnet.

2.1.9 Chemisch-analytische Verfahren

Die Konzentration an NO₃⁻-N, NO₂⁻-N, SO₄²⁻-S sowie Cl⁻ wurden ionenchromatographisch (IC20 Ion Chromatograph mit EG40 Eluent Generator und AS40 Automated Sampler, Fa. DIONEX) nach EN ISO 10 304-2 bestimmt. Der Messung ging ein Filtrationsschritt (0,45 µm) voraus.

NH₄⁺ (DIN 38 406-5), TP und SRP (DIN EN 1189) wurden nasschemisch bestimmt. Im Untersuchungszeitraum kamen dabei die Photometer DR / 2000, Fa. HACH und U-2000 Spectrophotometer, Fa. HITACHI zum Einsatz.

Die Angabe der Ergebnisse bezieht sich jeweils auf die Konzentration des Stickstoff-, Phosphor- bzw. Schwefelatoms (also NO₃⁻-N, SO₄²⁻-S, etc.).

2.1.10 Bestimmung von Temperatur, O₂, pH-Wert, Leitfähigkeit und Chl-a-Konzentration

Die Parameter Temperatur, Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und Leitfähigkeit wurden mittels Sondenmessung vor Ort bestimmt. Dabei kamen Sonden der Fa. WTW zum Einsatz (Oxi 197-S, pH 197-S bzw. LF 197-S). Alle Sonden wurden in regelmäßigen Abständen (< 4 Wochen) kalibriert. Die dafür verwendeten Kalibrationslösungen stammten ebenfalls von der Fa. WTW.

Als unschätzbarer Vorteil erwies sich zudem die Verwendung eines Fluorospektrometers (Dr. Haardt Optik, Deutschland) zur Bestimmung der Chl-a-Konzentration direkt im See. Da die Ergebnisse online abgelesen werden konnten, war es möglich innerhalb kurzer Zeit Chl-a-Profile, als Summenparameter für die Phytoplanktonkonzentration, anzufertigen.

2.1.11 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 12.0.1. (SPSS Inc.) bzw. mit den Statistikfunktionen von Microsoft Excel 2000 durchgeführt. Die in Kapitel 2.2.4 erhaltenen Regressionskoeffizienten wurden nach Logarithmierung nach einem Verfahren zum Vergleich zweier einfacher linearer Regressionskoeffizienten bei Varianzinhomogenität nach RASCH et al. (1978) untersucht. Alle MPN-Ergebnisse wurden mit der Freeware MPN-Calculator Version 0.72 von Mike Curiale berechnet. Die Ergebnisse der statistischen Analysen wurden bei $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,01$ als hochsignifikant gewertet.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Reinigungsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental

2.2.1.1 Phosphor- und Stickstoffeliminierung

Die TP- und SRP-Konzentration wurde durch die Kläranlage Leipzig-Rosental im Untersuchungszeitraum im Mittel um 96 % bzw. 95 % reduziert (Tabelle 6 und Abbildung 3). Die gemessenen Konzentrationen im Ablauf der Kläranlage waren dabei ganzjährig relativ stabil. Für TP lagen die Konzentrationen i.d.R. deutlich unter $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Die Reduktion des Gesamtstickstoffs und des Ammoniums durch die Kläranlage lag im Mittel bei rund 64 % bzw. 76 %. Des weiteren stieg die Nitratkonzentration zwischen Kläranlagenzulauf und -ablauf im Mittel von $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ auf $5,9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($> 390 \%$) (Abbildung 3).

Tabelle 6: Mittlere Zulauf- und Ablaufkonzentrationen der Kläranlage Leipzig-Rosental für TP, SRP und TN und NH_4^+ (September 2002 bis Dezember 2004)

Chemischer Parameter	Konzentration im Kläranlagen-Zulauf [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	Konzentration im Kläranlagen-Ablauf [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	Reduktion [%]
TP	8,9	0,28	96 %
SRP	3,2	0,15	95 %
TN	44,6	16,2	64 %
NH_4	42,9	10,2	76 %

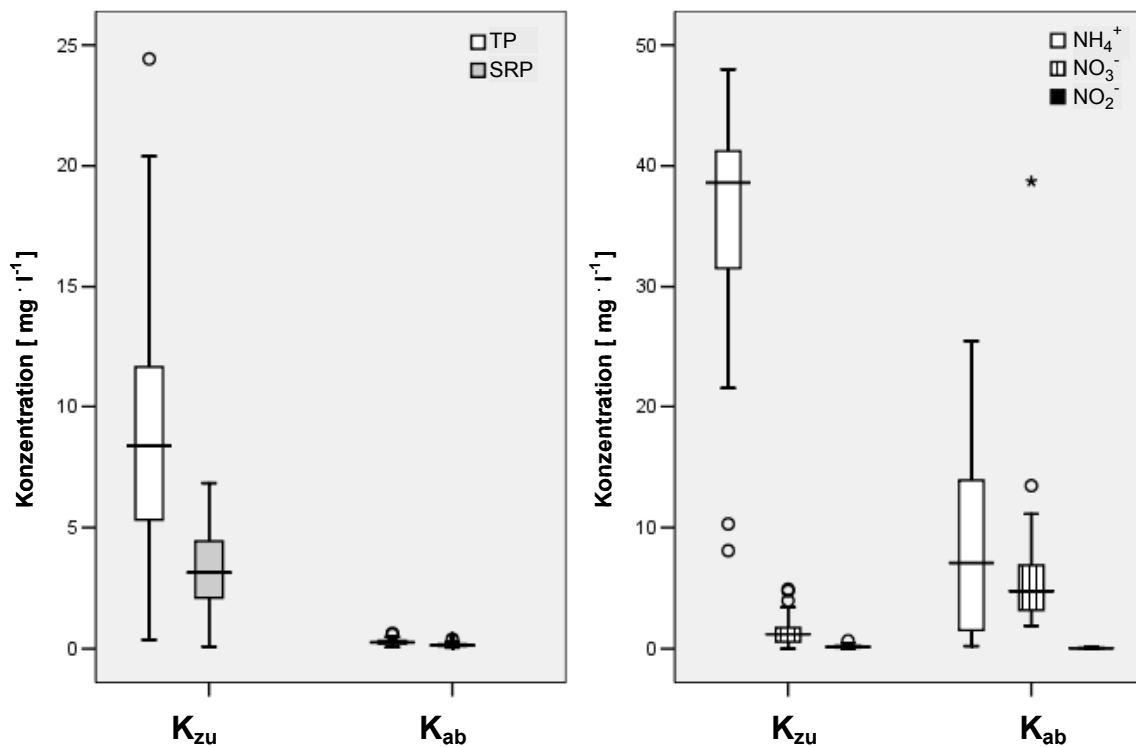


Abbildung 3: Zulauf- und Ablaufkonzentrationen der Kläranlage Leipzig-Rosental für TP, SRP, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻ (September 2002 bis Dezember 2004). Der Boxplot besteht aus Median, 25 bzw. 75 % Perzentile und dem kleinsten bzw. größten Wert (ohne Ausreißer) der Verteilung. Extremwerte sind mit einem Stern bzw. Kreis dargestellt.

2.2.1.2 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen

Die mittleren Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken, Somatischen Coliphagen und F+ RNA Coliphagen im Zu- und Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental sind in Tabelle 7 und Abbildung 4 dargestellt. In jeder Probe konnten die untersuchten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die Konzentrationen an Somatischen- und F+ RNA Coliphagen sowie *Cl. perfringens*-Sporen lagen immer unter denen von *E.coli* und Enterokokken.

Tabelle 7: Zulauf- und Ablaufwerte der Kläranlage Leipzig-Rosental hinsichtlich *E.coli*, Enterokokken, *Cl.perfringens*-Sporen, Somatischen Coliphagen und F+ RNA Coliphagen zwischen September 2002 und Dezember 2004. Konzentrationsangaben in MPN, KbE bzw. PFU · ml⁻¹.

	<i>E.coli</i>	Enterokokken	<i>Cl. perfringens</i> - Sporen	Somatische Coliphagen	F+RNA Coliphagen
K_{zu}					
n	61	63	19	57	58
% positiv	100	100	100	100	100
Max	$5,5 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$
Min	$6,8 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$
Mw	$1,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^2$	$7,1 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^2$
SD	$8,4 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^3$
K_{ab}					
n	98	99	38	99	99
% positiv	100	100	100	100	100
Max	$9,0 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^2$	$9,4 \cdot 10^1$
Min	$4,6 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^0$	$2,5 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
Mw	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^1$
SD	$1,2 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^1$	$4,2 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$

Die Eliminierung fäkaler Mikroorganismen durch die Kläranlage lag für *E.coli* zwischen 84,4 % und >99,9 %, für Enterokokken zwischen 77,2 % und >99,9 %, für Somatische Coliphagen zwischen 67,8 % und 99,9 %, für F+ RNA Coliphagen zwischen 78,4 % und 99,9 % und für *Cl. perfringens*-Sporen zwischen 91,7 % und 99,8 %. Im Mittel lag die Eliminationsleistung bei ca. zwei Größenordnungen.

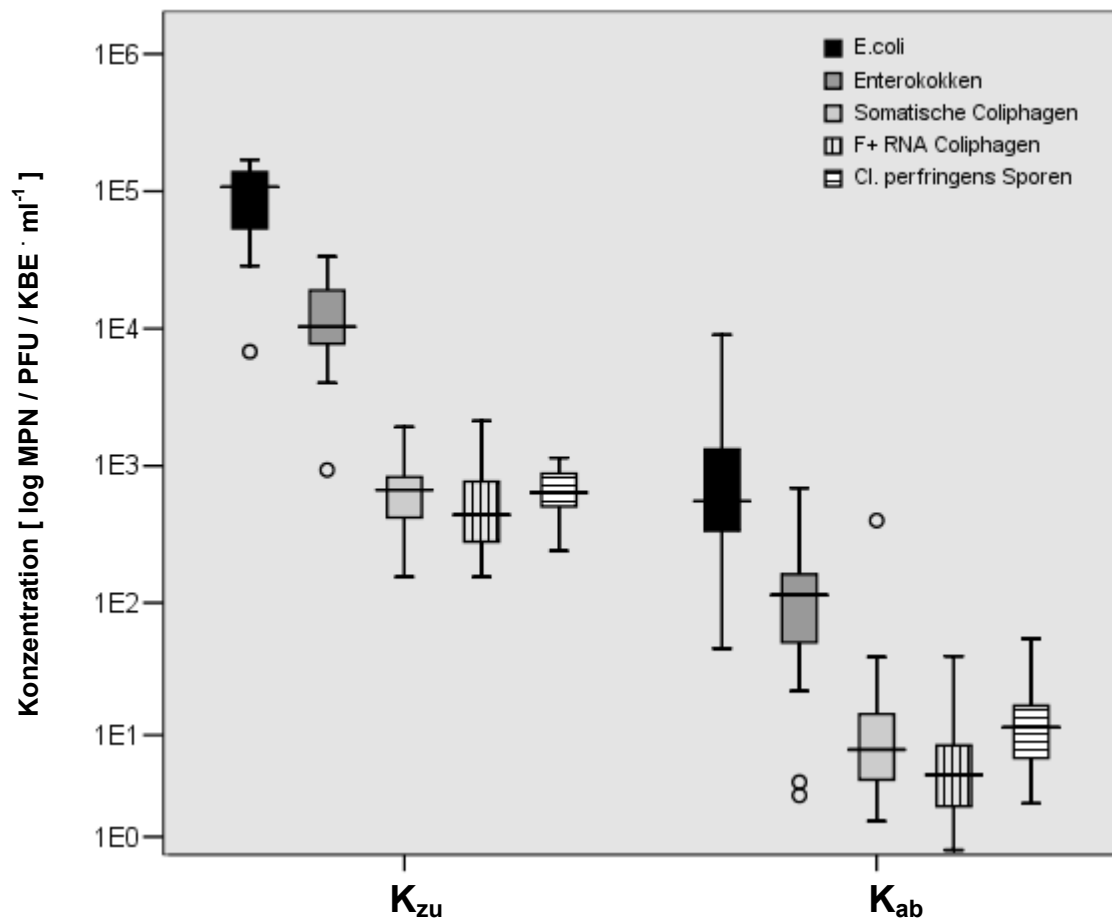
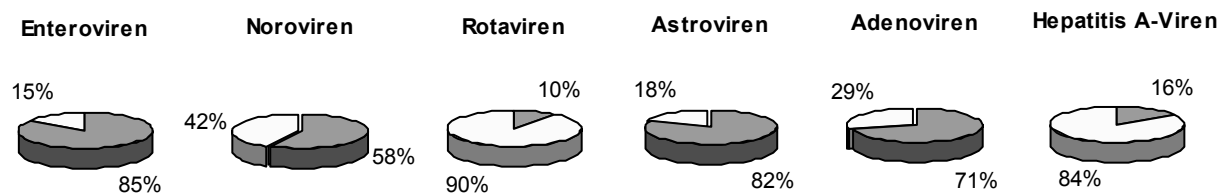


Abbildung 4: Zulauf- und Ablaufwerte der Kläranlage Leipzig-Rosental hinsichtlich *E.coli*, Enterokokken, Somatischen Coliphagen, F+ RNA Coliphagen und *Cl. perfringens*-Sporen (September 2002 bis Dezember 2004). Der Boxplot besteht aus Median, 25 bzw. 75% Perzentile und dem kleinsten bzw. größten Wert (ohne Ausreißer) der Verteilung. Extremwerte sind mit einem Kreis dargestellt.

2.2.1.3 Enterale Viren im Zu- und Ablauf der Kläranlage

Genome Enteraler Viren konnten im Zulauf in 36 von 39 (= 92,6 %) und im Ablauf in 72 von 99 (= 72,7 %) untersuchten Proben gefunden werden. Der Nachweis bezieht sich, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, im Kläranlagenablauf auf 0,11 ml und im Ablauf auf 14,6 ml. Abbildung 5 gibt einen Überblick über den Anteil PCR-positiver Proben an beiden Probenahmepunkten. Entero-, Astro-, Adeno- und Noroviren konnten in einem Großteil der Proben des Kläranlagen-Zulaufes gefunden werden (zwischen 58 % und 85 %), wohingegen Hepatitis A- und Rotaviren in deutlich geringeren Anteilen detektiert wurden (16 % bzw. 10 %). Im Kläranlagen-Ablauf zeigt sich ein ähnliches Bild. Enteroviren, Noroviren und Astroviren konnten am häufigsten nachgewiesen werden (65 %, 51 % bzw. 45 %). Adenoviren-positive Proben nahmen zwischen Kläranlagen-Zulauf und –Ablauf deutlich ab. Auffällig ist eine Erhöhung PCR-positiver Rotaviren auf 24 % (Abbildung 5).

K_{zu}



K_{ab}

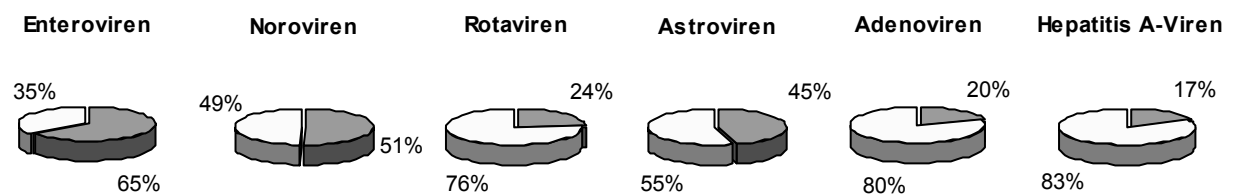


Abbildung 5: Anteil PCR-positiver (grau) und PCR-negativer Proben (weiß) im Zulauf und Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental.

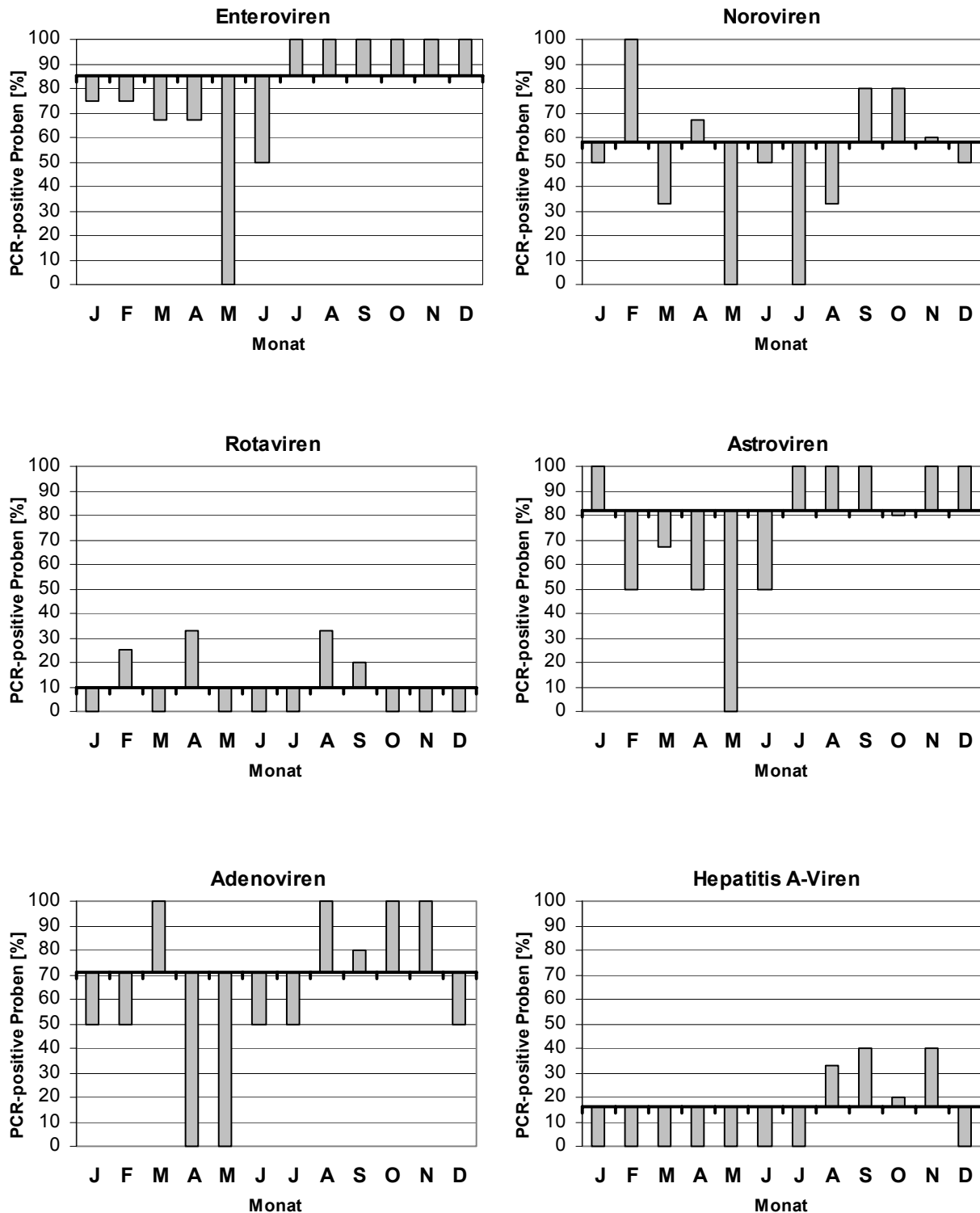


Abbildung 6: Saisonale Verteilung PCR-positiver Proben (n=39) an Entero-, Noro-, Rota-, Astro-, Adeno- und Hepatitis A-Viren im Zulauf der Kläranlage Leipzig-Rosental (September 2002 bis Dezember 2004). Der Schnittpunkt der x-Achse mit der y-Achse entspricht dem mittleren Anteil PCR-positiver Proben im Untersuchungszeitraum (siehe Abbildung 5).

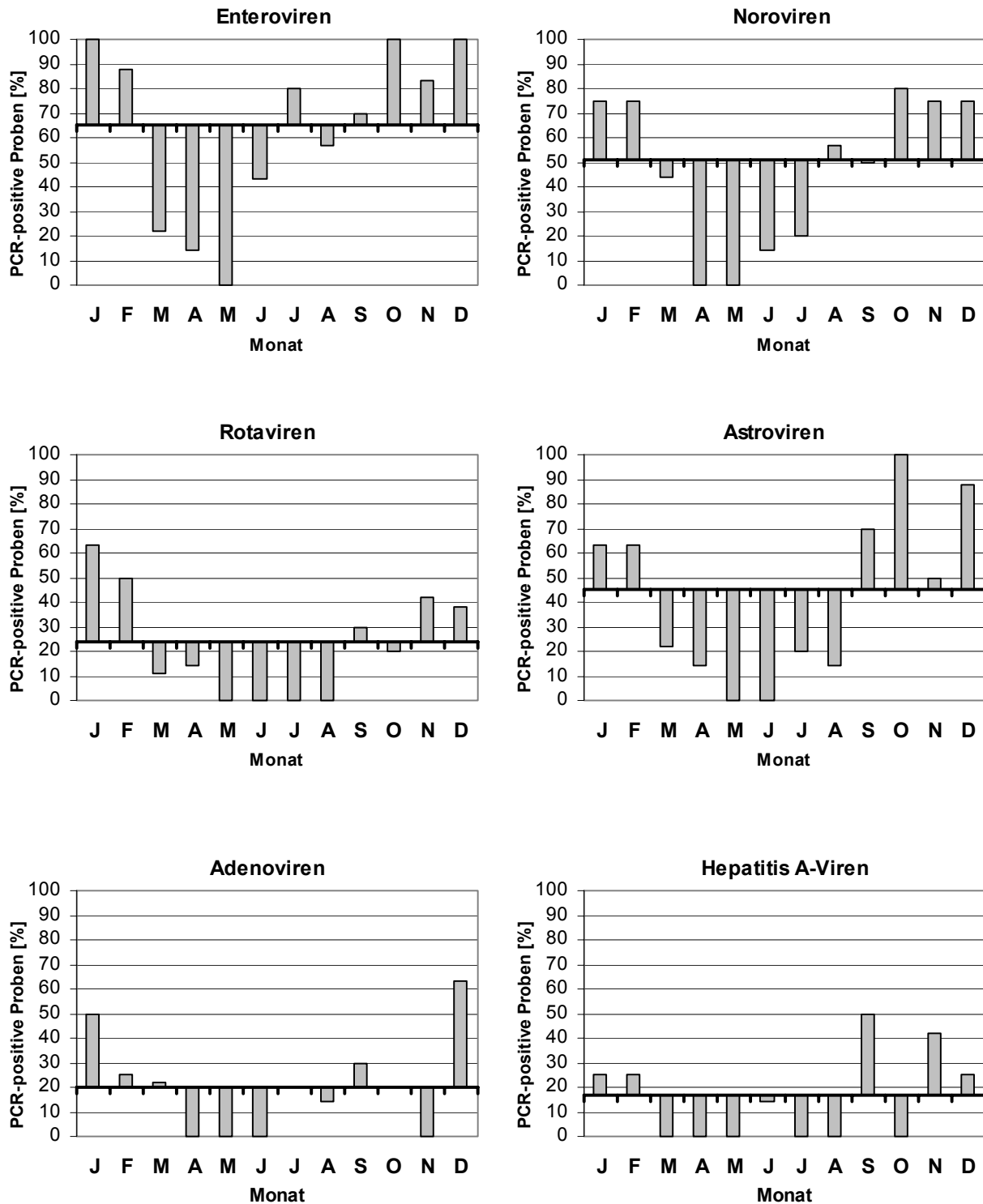


Abbildung 7: Saisonale Verteilung PCR-positiver Proben (n=99) an Entero-, Noro-, Rota-, Astro-, Adeno- und Hepatitis A-Viren im Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental (September 2002 bis Dezember 2004). Der Schnittpunkt der x-Achse mit der y-Achse entspricht dem mittleren Anteil PCR-positiver Proben im Untersuchungszeitraum (siehe Abbildung 5).

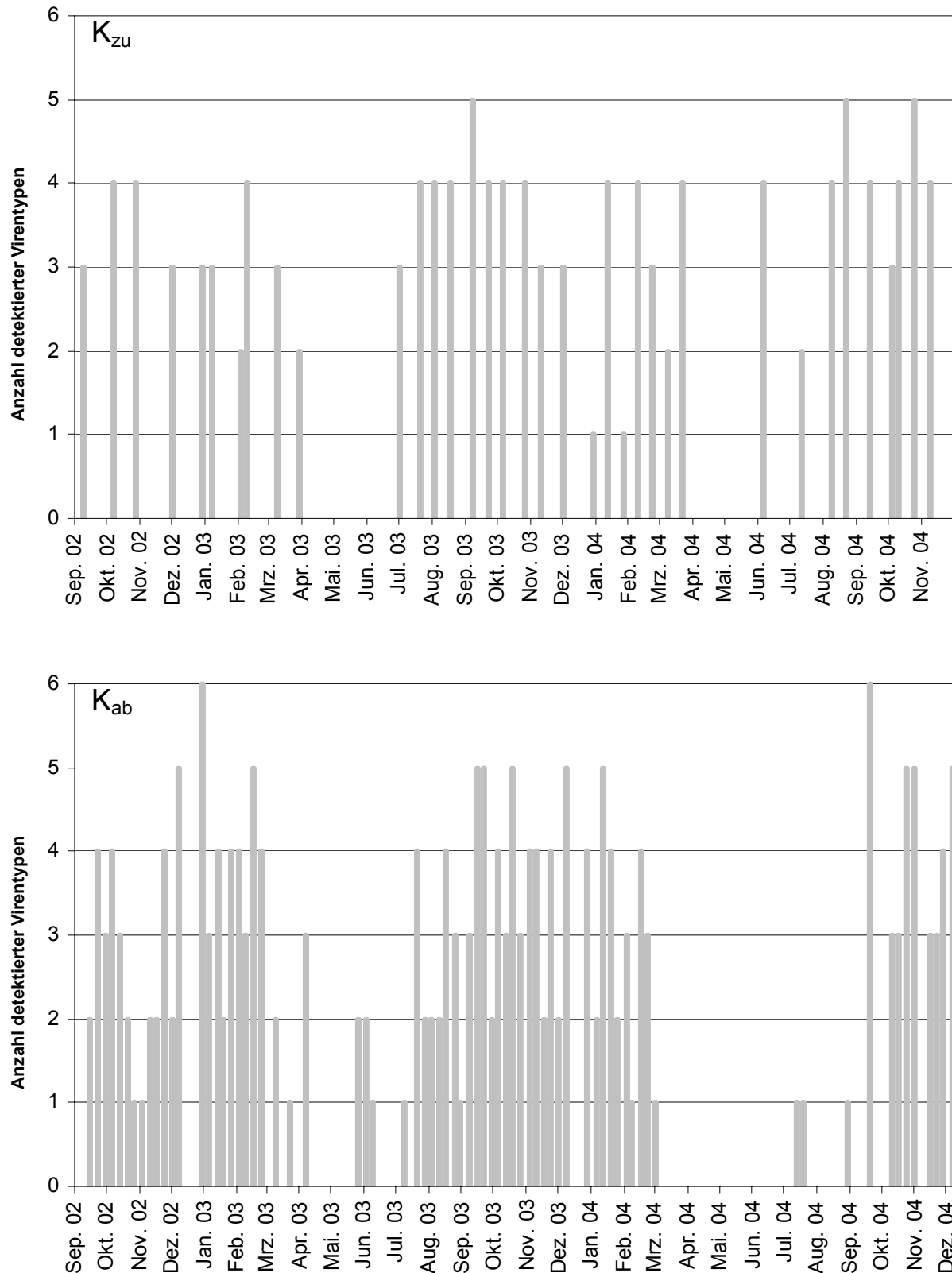


Abbildung 8: Saisonale Verteilung aller untersuchten Viren im Zu- und Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental als Summe (September 2002 bis Dezember 2004). Ein Punkt auf der y-Achse entspricht dem positiven Nachweis eines der untersuchten enteralen Viren mittels nested-RT-PCR bzw. nested-PCR.

Wie zu erwarten, zeigte das Vorkommen enteraler Viren starke Variationen zwischen den verschiedenen Probenahmetagen (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8). Es gab starke saisonale Unterschiede mit deutlichen Spitzen zwischen Spätsommer und Winter. Im Monat Mai ließen sich im gesamten Untersuchungszeitraum keine enteralen Viren nachweisen.

Zahlreiche PCR-positive Proben wurden sequenziert und mit Referenzsequenzen aus Gendatenbanken abgeglichen. Die Enteroviren im Zulauf konnten vorrangig als Human Coxsackievirus A16 / A19 / A22 / (12,5 %, 12,5 %, 31 % der sequenzierten Proben) und als Enterovirus-B (25 %) identifiziert werden. Im Ablauf traten vor allem Human Coxsackievirus A22 (39 %) und Human Echovirus 11 (29 %) auf.

An Noroviren konnten im Zulauf insbesondere Grimbsby-like (53 %), Norwalk-like (27 %), Southampton-like (13 %) und im Ablauf Grimbsby-like (59 %), Southampton-like (22 %), Norwalk-like (17 %) gefunden werden. Im zeitlichen Verlauf konnte ein Shift von der Virusvariante Grimbsby-like im Winter 2002 / 03 über Southampton- / Norwalk-like im Herbst und Winter 2003 / 04 zur im Winter 2004 vorherrschenden Variante Jamboree-like beobachtet werden.

Rotaviren und Adenoviren wurden durchweg als Human Rotavirus bzw. Human Adenovirus Serotyp 41 typisiert. Die Analyse der Astrovirus-Sequenzen ergab Serotyp 1 (Zulauf 55 %, Ablauf 82 %). Daneben konnten noch die Serotypen 2 / 4 / 6 / 8 zugeordnet werden. Eine Probe im Zulauf der Kläranlage wurde als „Feline Astrovirus“, also tierischen Ursprungs, identifiziert. 3 bzw. 14 Hepatitis A-Viren-positive Proben wurden im Zu- und Ablauf typisiert und konnten mehrheitlich als Genotyp IB (66 % bzw. 79 %) bzw. Genotyp IA (33 % bzw. 21 %) identifiziert werden. Eine Wasserprobe vom Zulauf am 6.9.04 wies Sequenzidentität mit Hepatitis A-Viren-Sequenzdaten auf, die im Kontext eines Hepatitis A-Viren-Ausbruchs unter deutschen Urlaubern aus Ägypten im Sommer 2004 stand.

Ein Teil der Proben, die in der vorangegangenen nested-RT-PCR ein positives Ergebnis für Noro-, Entero- oder Astroviren zeigten, wurden mittels real-time-PCR quantifiziert. Abbildung 9 stellt die Anzahl quantifizierter Proben im Zu- und Ablauf der Kläranlage und die mittlere Genomkonzentration dar. Die ermittelte Spanne für Noroviren lag zwischen 0 und $2,0 \cdot 10^7$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ sowie zwischen 0 und $1,9 \cdot 10^6$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ im Zu- bzw. Ablauf der Kläranlage. Die Konzentrationen an Enterovirengenomenen lagen zwischen 0 und $1,0 \cdot 10^6$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ bzw. zwischen 0 und $4,2 \cdot 10^6$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹, wohingegen für

Astroviren eine Spanne zwischen $2,7 \cdot 10^3$ und $1,4 \cdot 10^8$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ im Zulauf bzw. 0 und $2,7 \cdot 10^5$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ im Ablauf ermittelt werden konnte (Abbildung 9).

Im Allgemeinen waren die gefundenen Konzentration an den einzelnen Probenahmetagen sehr variabel, die Standardabweichungen (nicht dargestellt) sind i.d.R. 1,5 bis 2 mal, im Ablauf der Kläranlage für Enteroviren sogar 4,6 mal so hoch wie der gefundene arithmetische Mittelwert.

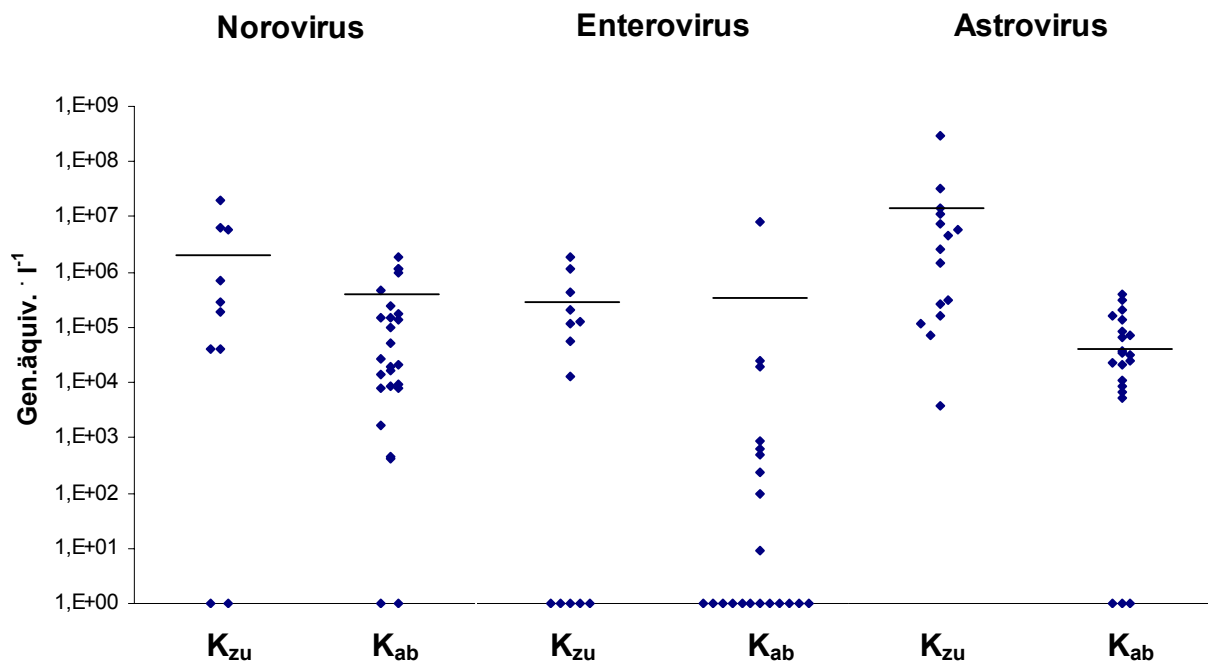


Abbildung 9: Genomkonzentration im Zu- und Ablauf der Kläranlage von vorher mit nested-RT-PCR positiv getesteter Noro-, Entero- und Astroviren. Die Abbildung stellt die Anzahl der mit real-time-PCR quantifizierten Proben und die durchschnittliche Genomkonzentration pro Liter Wasser (Linie) vor der Aufkonzentrierung dar. Die Punkte auf der Nulllinie zeigen die Anzahl der in der real-time-PCR negativen Proben.

Nicht alle mittels nested-RT-PCR positiv getesteten Proben konnten mit der real-time-PCR bestätigt werden. Vor allem die Enteroviren zeigten mit 38 % der untersuchten Proben im Zulauf bzw. 57 % im Ablauf der Kläranlage einen sehr hohen Anteil negativer Proben (Abbildung 9). Seit Februar 2004 konnte im Kläranlagen-Ablauf keine nested-RT-PCR-positive Probe mehr in der real-time-PCR für Enteroviren bestätigt bzw. quantifiziert werden.

Um die Infektiösität Enteroviren-PCR-positiver Proben zu prüfen, wurden 14 Proben vom Kläranlagen-Ablauf auf RD-Zellkulturen gebracht. Bei keiner der Proben trat ein cytopathischer Effekt auf.

2.2.2 Bereich zwischen Kläranlage und Werbeliner See

2.2.2.1 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen in der Neuen Luppe und im Flutungswasser

Abbildung 10 und Tabelle 8 zeigen die Konzentrationen der untersuchten Fäkalkeime an den Probenahmepunkten in der Neuen Luppe, sowie kurz vor dem Ende der Fernleitung zum Werbeliner See (Probenahmepunkt P).

Deutlich ist ein Rückgang aller untersuchten Mikroorganismen zwischen den Probenahmepunkten L1 und L2 zu erkennen. Er lag bei 77,2 % und 82,8 % für Somatische- und F+ RNA Coliphagen sowie 84,5 % und 89,1 % für Enterokokken bzw. *E.coli*. Der Rückgang der *Cl. perfringens*-Sporen ist deutlich schwächer (19,8 %).

An acht Tagen zwischen März und November 2004 wurden, zusätzlich zu den Routineuntersuchungen, Proben aus der Neuen Luppe unmittelbar vor (L1b) und nach (L1c) Mündung der Nahle in die Neue Luppe, sowie Proben aus der Nahle genommen (Tabelle 9). In allen Untersuchungen lagen die Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken und den Bakteriophagen am Probenahmepunkt „Nahle“ deutlich niedriger als am Probenahmepunkt L1b.

Zwischen den Probenahmepunkten L2 und P nahm die Konzentration an *E.coli* im Mittel von $1,0 \cdot 10^2$ MPN $\cdot$ ml⁻¹ auf $6,1 \cdot 10^1$ MPN $\cdot$ ml⁻¹ ab. Während die Konzentrationen an Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen nahezu unverändert blieben, nahm die Konzentration der Bakteriophagen zwischen L2 und P leicht zu (Tabelle 8).

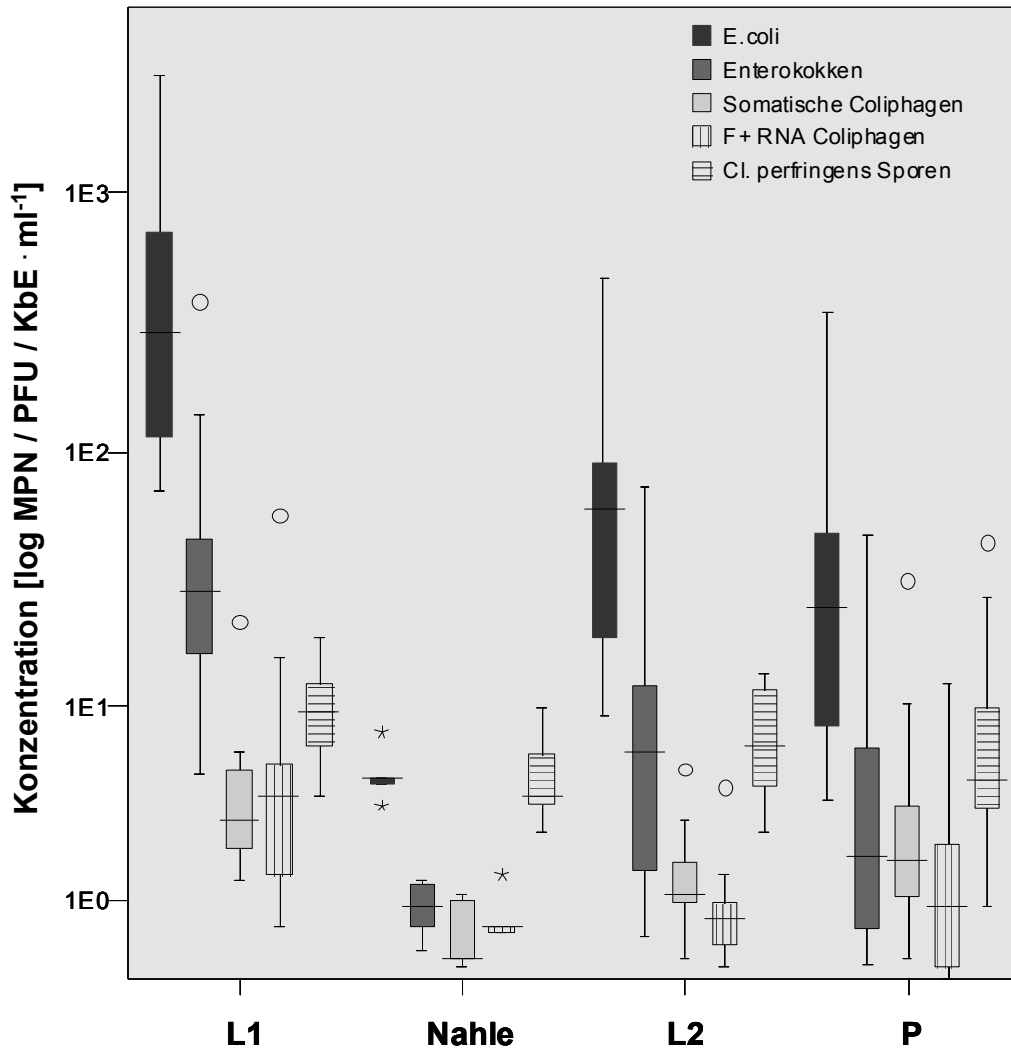


Abbildung 10: Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken, Somatische Coliphagen, F+ RNA Coliphagen und *Cl. perfringens*-Sporen an der Einleitungsstelle der Kläranlage in die Neue Luppe (L1), in der Nahle und am Entnahmepunkt für die Fernleitung zum Werbeliner See in der Neuen Luppe (L2), sowie am Ende der Fernleitung (P) (September 2002 bis Dezember 2004). Der Boxplot besteht aus Median, 25 bzw. 75 % Perzentile und dem kleinsten bzw. größten Wert (ohne Ausreißer) der Verteilung. Extremwerte sind mit einem Stern bzw. Kreis dargestellt.

Tabelle 8: Konzentration an *E.coli*, Enterokokken, *Cl.perfringens*-Sporen, Somatischen Coliphagen und F+ RNA Coliphagen an den Probenahmepunkten L1, L2 und P zwischen September 2002 und Dezember 2004. Konzentrationsangaben in MPN, KbE bzw. PFU · ml⁻¹.

	<i>E.coli</i>	Enterokokken	<i>Cl. perfringens</i> - Sporen	Somatische Coliphagen	F+RNA Coliphagen
L1					
n	37	37	14	40	40
% positiv	100	100	100	100	100
Max	$1,1 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^1$	$8,8 \cdot 10^1$	$9,2 \cdot 10^1$
Min	$4,3 \cdot 10^0$	$5,0 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^0$	$3,0 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$
Mw	$9,2 \cdot 10^2$	$9,9 \cdot 10^1$	$9,7 \cdot 10^0$	$8,5 \cdot 10^0$	$8,0 \cdot 10^0$
SD	$2,1 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^2$	$4,6 \cdot 10^0$	$1,5 \cdot 10^0$	$1,6 \cdot 10^1$
L2					
n	38	38	14	40	40
% positiv	100	100	100	95	98
Max	$7,6 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^1$
Min	$8,4 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^{-1}$	$2,6 \cdot 10^0$	$<1,0 \cdot 10^{-1*}$	$<1,0 \cdot 10^{-1*}$
Mw	$1,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^1$	$7,8 \cdot 10^0$	$1,9 \cdot 10^0$	$1,4 \cdot 10^0$
SD	$1,5 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^0$	$2,6 \cdot 10^0$	$2,1 \cdot 10^0$
P					
n	95	97	36	89	89
% positiv	100	100	100	100	94
Max	$3,6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$	$3,9 \cdot 10^1$
Min	$4,6 \cdot 10^{-1}$	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$9,0 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-1*}$
Mw	$6,1 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^1$	$8,4 \cdot 10^0$	$4,6 \cdot 10^0$	$2,4 \cdot 10^0$
SD	$8,4 \cdot 10^1$	$6,0 \cdot 10^1$	$8,5 \cdot 10^0$	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$4,7 \cdot 10^0$

* in die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes sind die negativen Proben mit der Nachweisgrenze (siehe „Min“-Wert) eingegangen.

Tabelle 9: Konzentration an fäkalen Bakterien und Bakteriophagen an den Probenahmestellen L1b, Nahle und L1c in MPN, KbE bzw. PFU · ml⁻¹. Dargestellt sind die Mittelwerte (Standardabweichung) aus acht Untersuchungen zwischen März und November 2004.

Proben-herkunft	<i>E.coli</i>	Enterokokken	Somatische Coliphagen	F+ RNA Coliphagen	<i>Cl. perfringens</i> -Sporen
L1b	89,5 (88,4)	7,1 (11,6)	3,7 (3,6)	2,6 (3,3)	5,5 (5,8)
Nahle	5,7 (1,6)	1,0 (0,6)	0,5 (0,4)	0,6 (0,4)	5,3 (2,6)
L1c	34,3 (13,8)	3,0 (2,2)	1,8 (1,8)	1,0 (0,5)	6,2 (6,0)

2.2.2.2 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen im Werbeliner See

Tabelle 10 und Abbildung 11 geben einen Überblick über die gemessenen Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken, *Cl. perfringens*-Sporen und Bakteriophagen an den verschiedenen Probenahmepunkten im Werbeliner See.

Die gefundenen arithmetischen Mittelwerte fäkaler Bakterien und Bakteriophagen lagen zwei bis drei (*Cl. perfringens*-Sporen ein bis zwei) Größenordnungen unter denen des Flutungswassers am Probenahmepunkt P. In Abhängigkeit von der Indikatorspezies und der Probenahmestelle lagen die ermittelten Konzentrationen häufig unter der Nachweisgrenze der Meßmethode. Der Anteil positiver Proben nahm dabei i.d.R. mit zunehmender Entfernung zur Einleitungsstelle ab. Den größten Anteil negativer Proben stellen Somatische- und F+ RNA Coliphagen (zwischen 59 % und 56 % der Proben an W1 und 80 % bzw. 95 % an W4) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentration an *E.coli*, Enterokokken, *Cl.perfringens*-Sporen, Somatischen Coliphagen und F+ RNA Coliphagen an den Probenahmepunkten W1, W2 und W4 zwischen September 2002 und Dezember 2004. Konzentrationsangaben in MPN, KbE bzw. PFU · ml⁻¹.

	<i>E.coli</i>	Enterokokken	<i>Cl. perfringens</i> - Sporen	Somatische Coliphagen	F+RNA Coliphagen
W1					
n	41	42	16	39	39
% positiv	83	64	100	41	44
Max	$5,8 \cdot 10^1$	$4,8 \cdot 10^0$	$4,2 \cdot 10^0$	$3,9 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^0$
Min	$<1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$<1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-1}$
Mw	$6,7 \cdot 10^{0*}$	$5,7 \cdot 10^{1*}$	$9,5 \cdot 10^{-1}$	$3,4 \cdot 10^{-1*}$	$2,2 \cdot 10^{-1*}$
SD	$1,2 \cdot 10^1$	$9,9 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^0$	$7,3 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^0$
W2					
n	29	30	19	31	31
% positiv	66	27	95	20	20
Max	$6,1 \cdot 10^0$	$9,0 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$5,0 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^0$
Min	$<1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-2}$	0	$<1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-1}$
Mw	$5,2 \cdot 10^{-1*}$	$1,2 \cdot 10^{-1*}$	$5,6 \cdot 10^{-2*}$	$1,3 \cdot 10^{-1*}$	$1,6 \cdot 10^{-1*}$
SD	$1,1 \cdot 10^0$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{-1}$
W4					
n	95	97	36	89	89
% positiv	77	53	100	20	5
Max	$3,3 \cdot 10^0$	$9,4 \cdot 10^{-1}$	$3,0 \cdot 10^{-1}$	$7,0 \cdot 10^{-1}$	$5,0 \cdot 10^{-1}$
Min	$<3,5 \cdot 10^{-2}$	$<3,5 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$<1,0 \cdot 10^{-1}$	$<1,0 \cdot 10^{-1}$
Mw	$3,8 \cdot 10^{-1*}$	$1,0 \cdot 10^{-1*}$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-1*}$	$1,1 \cdot 10^{-1*}$
SD	$6,7 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$8,0 \cdot 10^{-2}$

* in die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes sind die negativen Proben mit der Nachweisgrenze (siehe „Min“-Wert) eingegangen.

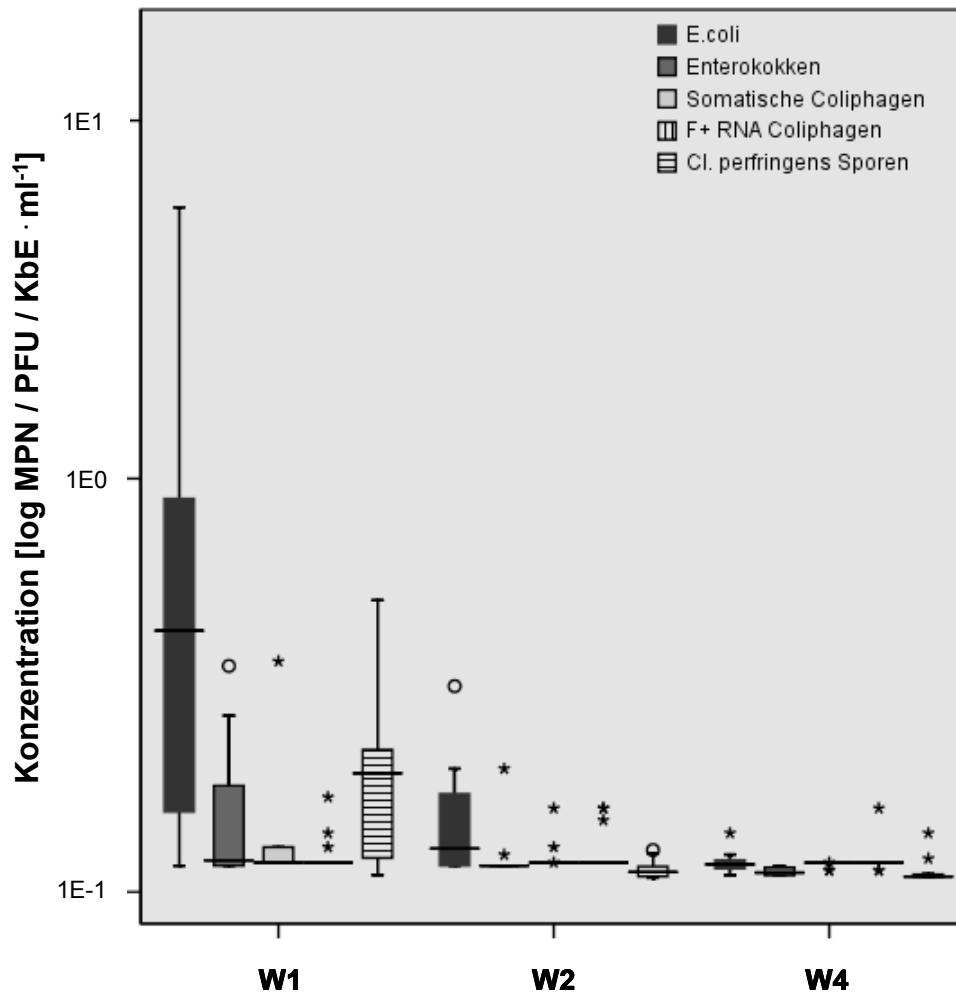


Abbildung 11: Konzentration an *E.coli*, Enterokokken, Somatische Coliphagen, F+ RNA Coliphagen und *Cl. perfringens*-Sporen an verschiedenen Probeentnahmepunkten im Werbeliner See zwischen September 2002 und Dezember 2004. Der Boxplot besteht aus Median, 25 bzw. 75 % Perzentile und dem kleinsten bzw. größten Wert (ohne Ausreißer) der Verteilung. Extremwerte sind mit einem Stern bzw. Kreis dargestellt.

Um die Sedimentation allochthoner Mikroorganismen im Werbeliner See näher zu untersuchen, wurden Sedimentationsfallen am Gewässergrund in ca. 20 m Tiefe exponiert. Die nach 14 Tagen ermittelten Konzentrationen in den Fallen an *E.coli*, Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Konzentrationen der untersuchten Mikroorganismen lagen zwischen 10^3 und 10^4 KbE · (g TG)⁻¹.

Tabelle 11: Konzentration der untersuchten Mikroorganismen in den Sedimentfallen (20 m Expositionstiefe) im Werbeliner See nach 14 Tagen.

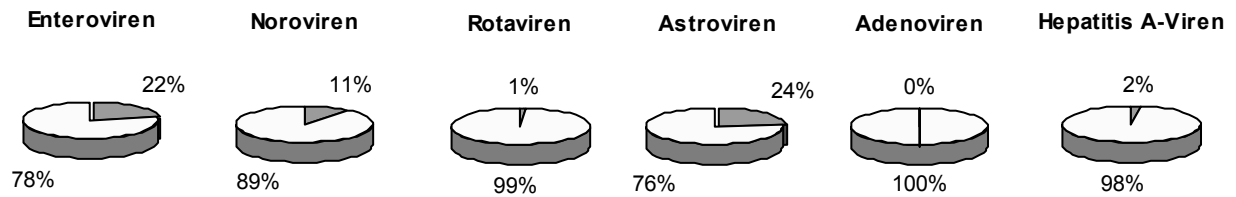
Mikroorganismus	Konzentration [$\text{KbE} \cdot (\text{g TG})^{-1}$]
<i>E.coli</i>	$3,8 \cdot 10^3$
Enterokokken	$9,6 \cdot 10^3$
<i>Cl. perfringens</i> -Sporen	$4,1 \cdot 10^4$

2.2.2.3 Enterale Viren im Flutungswasser und im Werbeliner See

Genome Enteraler Viren konnten am Probenahmepunkt P in 34 von 97 (= 35,1 %) und am Ostufer des Werbeliner Sees (W4) in 36 von 93 (= 38,7 %) untersuchten Proben gefunden werden. Der Nachweis bezieht sich, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, sowohl für P als auch für W4 auf 29,2 ml Probenvolumen. Abbildung 12 gibt einen Überblick über den Anteil PCR-positiver Proben an beiden Probenahmepunkten für die sechs untersuchten Virengruppen.

Abgesehen von den Adenoviren ließen sich alle untersuchten enteralen Viren sowohl im Flutungswasser als auch im Werbeliner See mittels RT-PCR im Untersuchungszeitraum nachweisen. Enteroviren, Noroviren und Astroviren konnten mit größerer Häufigkeit (22 %, 11 % bzw. 24 % der untersuchten Proben am Probenahmepunkt P und 16 %, 16 % bzw. 27 % am Probenahmepunkt W4) gefunden werden. Nur einzelne wenige Proben konnten positiv auf Rotaviren und Hepatitis A-Viren getestet werden.

P



W4

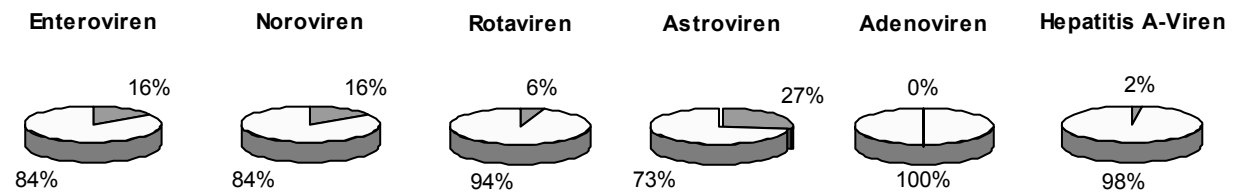


Abbildung 12: Anteil PCR-positiver (grau) und PCR-negativer Proben (weiß) im Flutungswasser (Probenahmepunkt P) und im Werbeliner See (Probenahmepunkt W4).

Abbildung 13 zeigt die mittels quantitativer PCR gefundenen Viruskonzentrationen an den Probenahmepunkten P und W4. Betrachtet man die Einzelwerte, zeigt sich z.T. eine relativ

hohe Viruslast an Noroviren (Max. $1,6 \cdot 10^5$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹) und Astroviren (Max. $3,7 \cdot 10^3$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹). Für Enteroviren wurden nur zwei Proben untersucht, wobei die höchste Konzentration $6,0 \cdot 10^0$ Gen.äquiv. $\cdot$ l⁻¹ betrug. Ein Teil der untersuchten Proben, die in der nested-RT-PCR ein positives Ergebnis erbrachten, konnten in der quantitativen PCR nicht bestätigt werden.

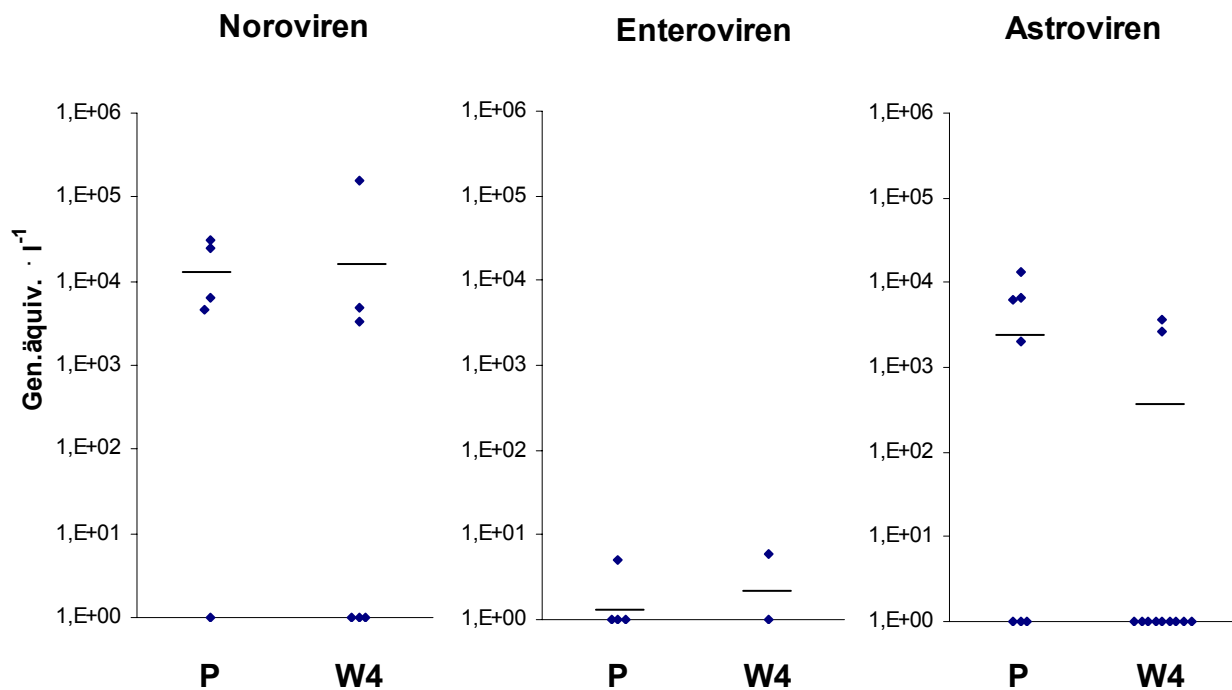


Abbildung 13: Genomkonzentration von Noro-, Entero- und Astroviren von vorher mit nested-RT-PCR positiv getesteten Proben an den Entnahmestellen P und W4. Die Abbildung stellt die Anzahl der quantifizierten Proben und die durchschnittliche Genomkonzentration pro Liter Wasser vor der Aufkonzentrierung dar. Die Punkte auf der Nulllinie zeigen die Anzahl der in der real-time-PCR negativen Proben.

Im Rahmen einer Diplomarbeit (BRUNßEN, 2005) wurden zwischen September 2002 und November 2004 je 90 Proben von den Entnahmepunkten P und W4 genommen und hinsichtlich infektiöser Enteroviren mittels zellkultureller Verfahren untersucht. Zudem wurden 20 zufällig ausgewählte Adenoviren-PCR-positive Proben von der Entnahmestelle P auf verschiedenen Zelllinien auf infektiöse Adenoviren hin untersucht.

In keiner der Proben ließen sich auf der 293-Zelllinie Adenoviren nachweisen. Eine Anzucht auf Hela-Zellen (humane cervix carcinoma-Zellen) und FL-Zellen (humane Amnion-Zellen) war ebenfalls erfolglos. Die molekularbiologisch detektierten Adenoviren konnten zu 98,6 % dem Subgenus F (Adenovirus-Typen 40 und 41) mit Schwerpunkt (bis auf wenige Ausnahmen) auf Adenovirus-Typ 41 zugeordnet werden.

Für den Probenahmepunkt P konnte in 20 Fällen ein positiver Enteroviren-Nachweis mit charakteristischen CpE gefunden werden (= 22,2 %). Als Erreger konnte in allen Fällen nach Sequenzierung Coxsackievirus-B typisiert werden. Für den Probenahmepunkt W4 konnte nur eine Probe (19.10.2004) zellkulturell positiv auf Enteroviren getestet werden (= 1,2 %). Der molekularbiologische Nachweis für diese Probe am Robert-Koch-Institut in Berlin fiel negativ aus.

2.2.3 Limnologische Untersuchungen im Werbeliner See

In zweiwöchentlichem Abstand wurde im Werbeliner See die Konzentration an Phosphor- und Stickstoffverbindungen gemessen. Zusätzlich sollten Sondenmessungen bezüglich Temperatur, Sauerstoff, pH und Leitfähigkeit Auskunft über Schichtung und Chemismus des Sees geben. Daneben wurde die Phyto- und Zooplanktonstruktur näher untersucht.

PÖTSCHKE (2003) und BOMBACH (2004) konnten im Rahmen von Diplomarbeiten im Werbeliner See durchweg schwach basische pH-Werte (zwischen 7,5 und 8,5) messen. Der Werbeliner See ist dimiktisch und wies eine sehr stabile Sommerschichtung auf. Die Sichttiefe lag am Probenahmepunkt W2 im Mittel bei 4,7 m und an W3 bei 5,1 m. Die maximale Sichttiefe wurde im Juni 2004 mit knapp 10 m bestimmt. Im Hypolimnion konnte gegen Ende der Sommerstagnation eine deutliche Sauerstoffzehrung beobachtet werden. Völlige Anoxie ist jedoch nie aufgetreten. Gesamtstickstoff wurde im See im Mittel mit $2,2 \text{ mg N} \cdot \text{l}^{-1}$ gemessen.

Die Messung der Phosphorkonzentration war zunächst sehr problembehaftet. Die Phosphorkonzentration wurde wahrscheinlich in der Mehrzahl der Untersuchungen deutlich überschätzt. Durch eine sehr sensible photometrische Meßmethode konnte die SRP- und TP-Konzentration schließlich an vier Probenahmetagen in der Zeit der Herbstvollzirkulation im Mittel auf $3,3 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (SRP) bzw. $24,8 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (TP) bestimmt werden. Die Chl-a-Konzentrationen lag bei allen Messungen unter $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Die gefundene Biomasse an Zoo- und Phytoplankton fiel i.d.R. ebenfalls niedrig aus (BOMBACH 2005).

In verschiedenen Abundanzen wurde das Phytoplankton insbesondere durch centrale (*Cyclotella comta*, *Melosira granulata*) und pennale (*Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*, *Nitzschia* sp, *Surirella* sp.) Kieselalgen sowie durch die Gattungen *Rhodomonas* und *Ochromonas* geprägt. Nach dem Klarwasserstadium im Mai dominierten *Dinobryon divergens* und *Ceratium hirundinella*. Die Zooplanktonstruktur wurde in wechselnden Abundanzen vor allem durch calanoide und cyclopoide Copepoden (z.B. *Eudiaptomus gracilis* und *Thermocyclops oithonoides*) und durch *Daphnia galeata* sowie *Bosmina longirostris* dominiert. Weiterhin fanden sich recht häufig verschiedene Arten von Rotatorien (*Keratella quadrata*, *Keratella cochlearis*, *Asplanchna* sp., *Polyarthra* sp.) und Larven der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha*. Die errechnete Zooplanktonbiomasse lag während der Sommerstagnation bei rund $40 \text{ mg TG} \cdot \text{m}^3$ (BOMBACH 2005).

Die ausgedehnten Flachwasserbereiche im Ost- und Westteil wurden durch submerse Makrophyten bestimmt. Dominierend waren vor allem die Kanadische Wasserpest (*Elodea canadensis*), die Armleuchteralge *Chara aspera* und eine fädige Grünalge, die als *Cladophora* sp. identifiziert werden konnte. Gelegentlich wurde auch das Kammförmige Laichkraut (*Potamogeton pectinatus*) gefunden.

2.2.4 Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser

In diesem Kapitel wurden Resistenzeigenschaften verschiedener konventioneller bakterieller Indikatoren, wie *E.coli*, Enterokokken und *Cl.perfringens*-Sporen mit denen von Bakteriophagen und enteralen Viren verglichen. Dazu wurde verdünntes Rohabwasser der Kläranlage Leipzig-Rosental in Dialyseschläuche gefüllt und unter den in Kapitel 2.1.2

beschriebenen Bedingungen exponiert. In bestimmten Zeitabständen wurden die Konzentrationen der verschiedenen mikrobiellen Parameter bestimmt.

In Abbildung 14 sind die Änderungen der Konzentration der untersuchten Mikroorganismen über die Zeit und unter den verschiedenen Expositionsbedingungen in den Dialyseschläuchen dargestellt. Die Steilheit der Regressionskurven und die t_{90} -Werte für die einzelnen Parameter sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Der t_{90} -Wert entspricht dem Zeitpunkt, an dem noch 10 % der t_0 -Konzentration gemessen werden konnte bzw. 90 % der t_0 Konzentration inaktiviert wurden oder nicht mehr nachweisbar waren.

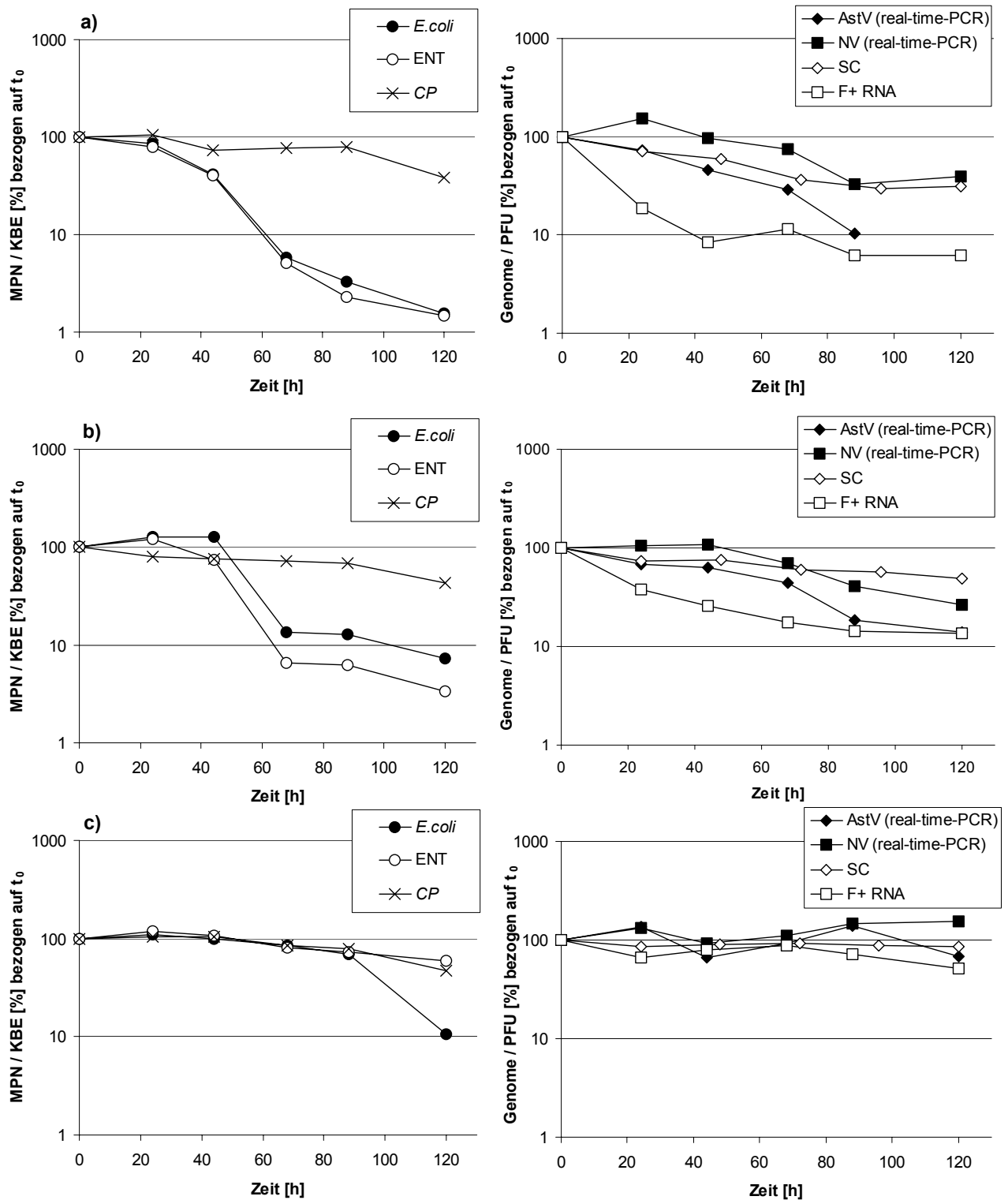


Abbildung 14: Überleben von *E.coli*, Enterokokken, Bakteriophagen und enteralen Viren (real-time-PCR) in den Inaktivierungsversuchen. Die Experimente wurden mit Licht (a), ohne Licht (b) (beide bei Zimmertemperatur) und ohne Licht und bei 6°C (c) durchgeführt. ENT = Enterokokken, SC = Somatische Coliphagen, F+ RNA = F+ RNA Coliphagen, CP = *Clostridium perfringens*-Sporen, AstV = Astroviren, NV = Noroviren

Tabelle 12: Anstiege der Regressionskurven (nicht dargestellt), R²- und t₉₀-Werte der Inaktivierungsversuche. ENT = Enterokokken, SC = Somatische Coliphagen, F+ RNA = F+ RNA Coliphagen, CP = *Clostridium perfringens*-Sporen

Parameter	+Licht			-Licht			-Licht, 6°C		
	Steilheit	R ²	t ₉₀ [d]	Steilheit	R ²	t ₉₀ [d]	Steilheit	R ²	t ₉₀ [d]
<i>E.coli</i>	e ^{-0,0396x}	0,94	2,4	e ^{-0,0271x}	0,80	3,5	e ^{-0,0164x}	0,64	5,8
ENT	e ^{-0,0411x}	0,93	2,3	e ^{-0,0344x}	0,86	2,8	e ^{-0,0053x}	0,80	18,0
CP	e ^{-0,0071x}	0,73	13,5	e ^{-0,0060x}	0,87	16,1	e ^{-0,0061x}	0,76	15,7
SC	e ^{-0,0107x}	0,90	11,0	e ^{-0,0057x}	0,94	16,8	e ^{-0,0008x}	0,36	122,0
F+RNA	e ^{-0,0202x}	0,70	4,8	e ^{-0,0160x}	0,84	6,0	e ^{-0,0038x}	0,51	25,5
Astroviren	e ^{-0,0263x}	0,93	3,9	e ^{-0,0173x}	0,94	5,5	e ^{-0,0022x}	0,08	44,6
Noroviren	e ^{-0,0113x}	0,71	8,5	e ^{-0,0122x}	0,85	7,8	e ^{+0,0033x}	0,47	- *

* der Anstieg der Regressionskurve ist positiv, es lässt sich daher keine t₉₀ berechnen

Abgesehen von Adenoviren konnten alle untersuchten enteralen Viren mittels RT-PCR detektiert werden (Tabelle 13). Für Noro-, Entero- und Astroviren galt dies nahezu durchgehend für alle Expositionsbedingungen, für Rotaviren und Hepatitis A-Viren teilweise mit Lücken. Der t₀ Probe (Anfangskonzentration) lagen für Astroviren je nach Expositionsansatz zwischen $1,1 \cdot 10^6$ und $2,5 \cdot 10^6$ Gen.äquiv. · l⁻¹ und für Noroviren zwischen $7,9 \cdot 10^6$ und $1,0 \cdot 10^7$ Gen.äquiv. · l⁻¹ zu Grunde (Einzeldaten nicht dargestellt). Die Konzentration der Enteroviren lag trotz positiven Befundes in der nested-RT-PCR unter der Nachweisgrenze der real-time-PCR. Enteroviren konnten daher nicht quantifiziert werden.

Tabelle 13: Gefundene Virentypen in den Inaktivierungsversuchen mittels RT-PCR.
 “-„ = kein PCR-Signal, „+“ = positives PCR Signal, „++“ = positives PCR-Signal und CpE auf BGM-Zelllinie (nur für Enteroviren), „(+“ = unsicheres PCR Signal

		Adeno-	Noro-	Entero-	Astro-	Hepatitis A-	Rotaviren
+ Licht, Raumtemperatur	0 h	-	+	+	+	+	+
	24 h	-	+	++	+	-	-
	48 h	(+)	+	++	+	+	+
	72 h	(+)	+	++	+	+	-
	96 h	-	+	+	+	-	-
	120 h	-	+	-	-	-	-
- Licht, Raumtemperatur	0 h	-	+	+	+	+	-
	24 h	-	+	++	+	+	+
	48 h	-	+	+	+	+	+
	72 h	-	+	+	+	+	-
	96 h	-	+	+	+	+	+
	120 h	-	+	+	+	+	-
- Licht, 6°C	0 h	-	+	+	+	+	+
	24 h	-	+	+	+	+	-
	48 h	-	+	+	+	-	+
	72 h	-	+	+	+	-	+
	96 h	-	+	++	+	+	+
	120 h	-	+	+	+	+	-

Allerdings konnten in Einzelproben für alle Expositionsbedingungen für Enteroviren cytopathische Effekte auf BGM-Zelllinie gezeigt werden (Tabelle 13). Obwohl in den Mikrotiterplatten bei den positiven Proben i.d.R. nur eine Kavität im unverdünnten bzw. im 1:4 verdünnten Ansatz charakteristische CpEs zeigte, kann über die MPN-Methode die Konzentration in diesen Proben auf 2,0 infektiöse Viruspartikel pro Liter (95 % Vertrauensintervall: 0,3 / 14,0) geschätzt werden. In der t₄-Probe der Versuchsanordnung ohne Licht und 6 °C, in der zwei positiven Kavitäten detektiert werden konnten, ergab sich eine MPN von 3,1 infektiöse Viruspartikel pro Liter (95 % Vertrauensintervall: 0,8 / 13,0). Die Enteroviren-Konzentration aller negativen Proben ohne CpE lag rechnerisch unter 2,0 infektiöse Viruspartikel pro Liter (Nachweisgrenze).

2.3 Diskussion

2.3.1 Reinigungsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental

2.3.1.1 Phosphor- und Stickstoffeliminierung

Die Kläranlage Leipzig-Rosental ist die größte Abwasserbehandlungsanlage des Regierungsbezirkes Leipzig. Sie befindet sich im Nordwesten der Stadt, an einem geographisch günstig gelegenen Tiefpunkt. Die Abwässer fließen in einer Mischkanalisation zum größten Teil im freien Gefälle dorthin. Pro Tag werden ca. 125.000 m³ Abwasser behandelt (Trockenwetterabfluss). Seit 1987 wird das Wasser biologisch gereinigt. 1992 wurde zusätzlich eine Phosphatfällung installiert. Die Phosphatfällung erfolgt simultan und diskontinuierlich mit Eisen-III-Chlorid-Sulfat. D.h., das Fällmittel wird über eine Dosierstation unmittelbar vor dem Belebungsbecken zugegeben, wobei die Zugabe nicht kontinuierlich erfolgt, sondern sich nach dem Belastungsgrad des Abwassers richtet.

Die Phosphatkonzentration im Abwasser konnte durch die Kläranlage im Mittel um rund 97 % auf 0,28 mg · l⁻¹ reduziert werden (Abbildung 3 und Tabelle 6). Die Kläranlage unterschritt damit im Ablauf deutlich die bundesrechtlichen Grenzwerte für kommunale Kläranlagen dieser Größenordnung bezüglich der Gesamtphosphorkonzentration von 1 mg · l⁻¹ (ANONYMUS, 2004a).

Saisonale Unterschiede in der Phosphateliminierung konnten nicht gefunden werden. So existiert kein Zusammenhang zwischen der Temperatur im Zu- bzw. Ablauf der Kläranlage und der Höhe der Phosphateliminierung ($p > 0,05$). Interessanterweise kann die Höhe sowohl der SRP- als auch der TP-Reduktion in eine Abhängigkeit zur SRP- und TP-Zulaufkonzentration gebracht werden. Der Grund liegt in der diskontinuierlichen Phosphatfällung. Eine hohe Phosphorfracht im Zulauf der Kläranlage wird durch eine Erhöhung der Fällmitteldosierung kompensiert. Die diskontinuierliche Fällmittelzugabe bietet ebenfalls eine Erklärung für die gefundene ganzjährig relativ stabile Phosphoreliminierung ohne Abhängigkeit von Temperatur oder Jahreszeit. Leider liegen keine konkreten Daten über die Fällmitteldosierung in der Kläranlage Leipzig-Rosental vor, um diese Thesen statistisch zu untermauern.

Der Ammoniumstickstoff wurde um ca. 76 % und der Gesamtstickstoff um 64 % reduziert (Abbildung 3 und Tabelle 6). Für Kläranlagen der Größenklasse 5 sind Ablaufwerte für Ammonium- und Gesamtstickstoff von 10 bzw. 13 mg l⁻¹ vorgeschrieben (ANONYMUS, 2004a). Die geltende Verordnung bezieht sich dabei auf eine Temperatur im Ablaufwasser >12 °C bzw. alternativ auf den Zeitraum 1. Mai bis 31. Oktober. Betrachtet man daher die Stickstoffkonzentration im Kläranlagenablauf saisonal differenziert, werden die Grenzwerte in der warmen Jahreszeit (>12 °C) größtenteils eingehalten. Nur in drei Fällen (= 15 %) wurde eine Grenzwertüberschreitung bezüglich Gesamtstickstoff gemessen. Die Erhöhung der Nitratstickstoffkonzentration um mehr als 390 % ist auf die biochemische Oxidation des Ammoniums zurückzuführen. Zudem wird ein Teil des Nitrat- bzw. Nitrit-Stickstoffs durch die Denitrifikation aus dem System als molekularer Stickstoff entfernt.

2.3.1.2 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen

Die Eliminationsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental lag hinsichtlich *E.coli*, Enterokokken, *Cl. perfringens*-Sporen und den untersuchten Bakteriophagen zwischen 67,8 % und >99,9 % (Abbildung 4). *Cl. perfringens*-Sporen besitzen besondere Bedeutung für die Einschätzung von Wasseraufbereitungs- bzw. Abwasserreinigungsanlagen hinsichtlich der Eliminationseffizienz gegenüber umweltresistenten Sporen (Indikator für das Verhalten von *Cryptosporidium parvum*-Oozysten). Im Vergleich der mittleren Reduktion lassen sich die Mikroorganismen in zwei Gruppen einteilen: *E.coli* und Enterokokken auf der einen Seite mit signifikant höheren Reduktionsraten gegenüber den Bakteriophagen und *Cl. perfringens*-Sporen mit einer deutlich schwächeren Reduktion (t-Test bei gepaarten Stichproben). Innerhalb dieser Gruppen lassen sich statistisch keine Unterschiede nachweisen (Abbildung 15).

Die ermittelte Eliminationsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental bezüglich *E.coli* und Somatischen Coliphagen deckt sich mit den Ergebnissen von FLEISCHER et al. (2000), die vier Kläranlagen in Süddeutschland, ebenfalls mit simultaner Phosphatfällung, untersucht haben. Jedoch konnte für die untersuchten Kläranlagen ein höheres Reduktionspotential hinsichtlich F⁺ RNA Coliphagen nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass neben der Verwendung von Flockungsmitteln auch die Qualität des Abwassers und die Kapazität der Kläranlage eine wichtige Rolle spielen.

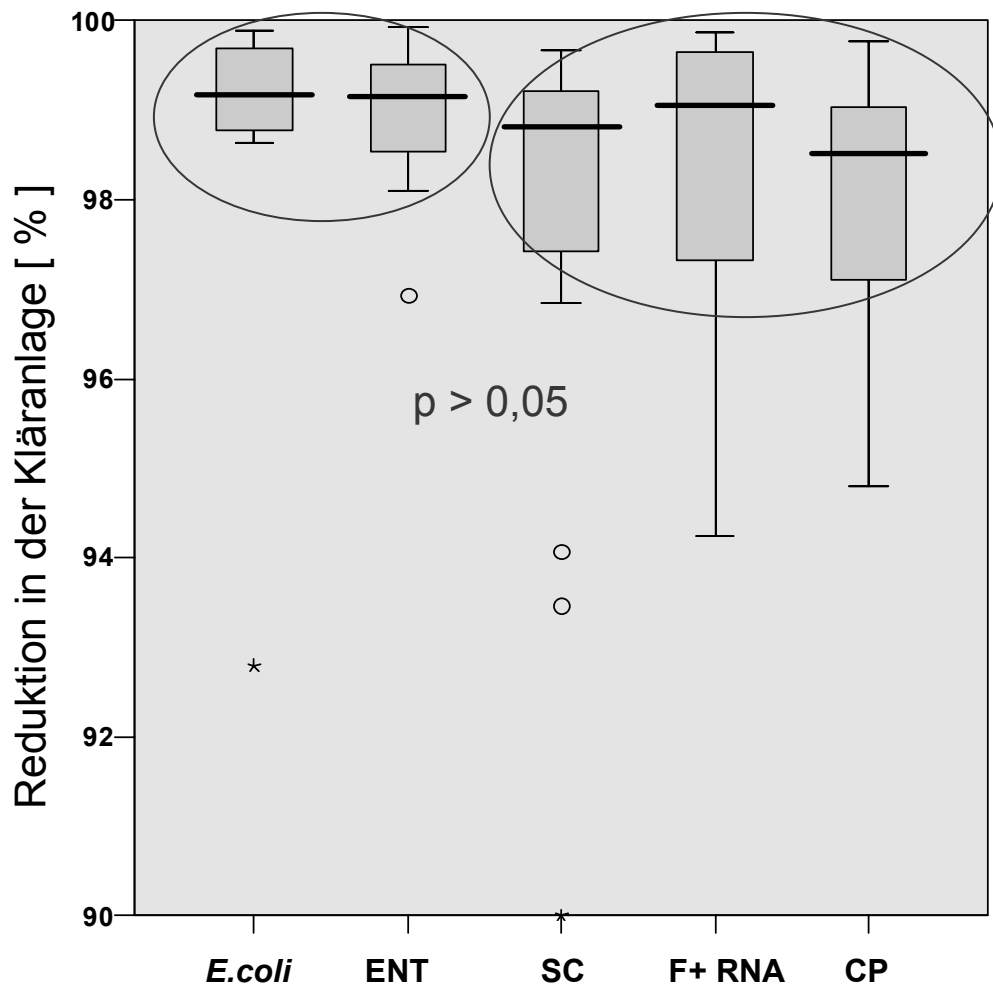


Abbildung 15: Reduktion fäkaler Bakterien und Bakteriophagen durch die Kläranlage Leipzig-Rosental. Die Ellipsen umfassen jene Mikroorganismen, deren Reduktionsraten sich im statistischen Vergleich nicht unterscheiden (t-Test bei gepaarten Stichproben). ENT = Enterokokken, SC = Somatische Coliphagen, F+ RNA = F+ RNA Coliphagen, CP = *Cl. perfringens*-Sporen. Der Boxplot besteht aus Median, 25 bzw. 75 % Perzentile und dem kleinsten bzw. größten Wert (ohne Ausreißer) der Verteilung. Extremwerte sind mit einem Stern bzw. Kreis dargestellt.

Für alle untersuchten Mikroorganismen konnte in der Kläranlage Leipzig-Rosental eine schwache, aber teilweise hochsignifikante (*E.coli* und *Cl. perfringens*-Sporen) Abhängigkeit der Reduktion von der Zulaufkonzentration festgestellt werden. Wie ist diese Beziehung erklärbar? Die Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken und Somatischen Coliphagen im Zulauf der Kläranlage korrelieren signifikant mit der SRP-Konzentration des Zulaufs. Wie in

Kapitel 2.3.1.1 bereits erwähnt, hängt die Reduktion an SRP gleichfalls signifikant von der SRP-Zulaufkonzentration ab. Die Fällmittelzugabe in der Kläranlage Leipzig-Rosental erfolgt diskontinuierlich und richtet sich nach der Phosphorkonzentration im Zu- bzw. Ablauf der Kläranlage. Erhöhte SRP-Konzentrationen im Zulauf führen zu einer höheren Fällmittelzugabe und könnten Ursache für eine effizientere Reduktion der Fäkalkeime sein.

Die Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken und Somatischen Coliphagen im Zulauf der Kläranlage korrelieren hochsignifikant miteinander. Während F+ RNA Coliphagen mit der Konzentration an Enterokokken hochsignifikant korrelieren findet sich kein Zusammenhang zwischen *Cl.perfringens*-Sporen und den übrigen Mikroorganismen. Im Ablauf der Kläranlage lassen sich nur die *E.coli*- und die Enterokokkenkonzentration und die Enterokokken- mit der *Cl.perfringens*-Sporenkonzentration in Zusammenhang bringen (alle hochsignifikant).

ARAUJO et al. (1997) fanden hingegen eine hochsignifikante Korrelation zwischen Somatischen-, F+ RNA Coliphagen und *Bacteroides fragilis*-infizierenden Phagen in Abwasser bzw. stark kontaminierten Oberflächenwasser in Spanien. LUCENA et al. (2003) konnten ebenfalls in acht Kläranlagen in Argentinien, Kolumbien, Frankreich und Spanien eine hochsignifikante Korrelation zwischen allen untersuchten Mikroorganismen (*E.coli*, Enterokokken, *Cl.perfringens*-Sporen, Somatischen-, F+ RNA Coliphagen und *Bacteroides fragilis*-infizierenden Phagen) finden.

Ein direkter Vergleich der ermittelten Bakteriophagenkonzentrationen mit anderen Arbeiten gestaltet sich wegen Unterschieden in Kulturbedingungen, Nährmedien und vor allem wegen der Vielzahl der eingesetzten Wirtsstämme jedoch als schwierig. Verschiedene Wirtsstämme können ein ganz unterschiedliches Spektrum an Bakteriophagen, insbesondere in der sehr inhomogenen Gruppe der Somatischen Coliphagen, erfassen. Dies wird in zahlreichen Arbeiten, u.a. in LECLERC et al. (2000), deutlich und könnte der Grund für den fehlenden Zusammenhang zwischen Somatischen- und F+ RNA Coliphagen in dieser Arbeit sein.

Generell sind die ermittelten Konzentrationen an Somatischen- und F+ RNA Coliphagen im Zu- und Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental im Vergleich zu anderen Untersuchungen niedriger (HAVELAAR et al., 1993, LUCENA et al., 2003, MUNIESA et al., 1999). Einflüsse der bakteriellen Hintergrundflora und mögliche Hemmstoffe im Abwasser könnten weitere Erklärungen bieten. Außerdem sind Aggregate von Bakteriophagen untereinander bzw. mit

Feststoffen, die auf dem Zellrasen der Wirtskultur dann nur als *ein* Plaque identifiziert werden können, als Ursache denkbar. HAVELAAR UND HOGEBOOM (1983) und DURÁN et al. (2002) beschreiben einen deutlichen Einfluss des Nährmediums auf die Zahl detektierter Plaques. Eine unterschiedliche Zusammensetzung des Nährbodens könnte die Zellwandzusammensetzung des Wirtstammes modifizieren (SZMELCMAN UND HOFNUNG 1975, SCHWARTZ 1980) und damit konsequenter Weise die Verfügbarkeit an Phagenrezeptoren auf der Zellwand, was zweifelsohne Einfluss auf die Zahl gefundener Bakteriophagen hat. DURAN et al. (2002) fanden gravierende Unterschiede in der Zahl und der Zusammensetzung detektierter Bakteriophagen zwischen Trypton-Agar und dem in dieser Arbeit verwendeten Modified Scholten's Agar. Die gefundenen Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken und *Cl.perfringens*-Sporen entsprechen den Angaben in der Literatur.

Im Zulauf der Kläranlage korreliert die Konzentration an *E.coli* hochsignifikant positiv mit der Temperatur und negativ mit dem Sauerstoffgehalt. Gleiches gilt für Somatische Coliphagen, wobei der Zusammenhang hier eher schwach und bezüglich der Temperatur auch nur das 5 % Signifikanzniveau erreicht. D.h., mit steigender Temperatur bzw. bei geringer werdender Sauerstoffkonzentration sind im Zulauf höhere *E.coli*- und Somatische Coliphagenwerte zu erwarten. Für die übrigen untersuchten Mikroorganismen bestand dieser Zusammenhang nicht. Da die Löslichkeit von Sauerstoff direkt von der Temperatur abhängt und Temperatur als auch Sauerstoff wiederum einen Einfluss auf andere Faktoren haben (siehe unten), lassen sich diese Größen nicht ohne weiteres voneinander trennen. Hohe Sauerstoffkonzentrationen könnten möglicherweise einen schädigenden Effekt auf die meist anaerob lebenden fäkalen Mikroorganismen bzw. auf die anaerob lebenden Wirte haben.

DAVIES-COLLEY et al. (1999) berichten über einen direkten Zusammenhang zwischen Sauerstoffkonzentration auf die Inaktivierung von *E.coli*, Enterokokken und F+ RNA Phagen. Allerdings galt dies nur bei gleichzeitigem Einfluss durch Sonnenlicht. Sauerstoff allein hatte keine Auswirkungen. Da auf dem Weg des Abwassers über die Kanalisation zur Kläranlage Leipzig-Rosental Lichteinfluss nahezu vollständig ausgeschlossen werden kann, müssen andere Faktoren in Betracht gezogen werden.

MENON et al. (2003) führten in Untersuchungen in der Seine (Frankreich) und in der Nordsee Grazing durch Protozooplankton als dominierenden Mortalitätsfaktor für *E.coli* und andere fäkale Mikroorganismen an. 90 % der gefundenen Gesamtmortalitätsraten war auf die Aktivität des Protozooplanktons zurückzuführen. Zwar ist der Zulauf der Kläranlage als

Habitat nicht unmittelbar mit den beschriebenen Untersuchungsgebieten vergleichbar, dennoch könnte die Grazingaktivität des Protozooplanktons eine entsprechende Erklärung liefern, zumal diese Aktivität in direktem Zusammenhang mit der Sauerstoffkonzentration steht. Dies erklärt jedoch nicht den fehlenden Zusammenhang zwischen Temperatur bzw. Sauerstoff und den anderen fäkalen Mikroorganismen. Nahrungselektivität des Protozooplanktons zugunsten (bzw. zum Schaden!) von *E.coli* wäre denkbar. MENON et al. (1996) konnten zeigen, dass Flagellaten in der Seine einen höheren Fraßdruck auf *E.coli* als auf andere autochthone Mikroorganismen ausübten. Sie begründeten ihre Ergebnisse mit der im Vergleich zu den anderen autochthonen Mikroorganismen relativ großen Zellgröße von *E.coli* und der Annahme, dass größere Zellen für Protozoen eine bevorzugte Beute darstellen.

In Zusammenhang mit der Temperatur könnte die Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S) eine ganz interessante Rolle spielen. Im Kanalnetz der Stadt Leipzig machen sich, vor allem bei höheren Temperaturen, Fäulnisprozesse durch die Bildung von Geruchsstoffen bemerkbar (Frau Dr. Carmienke, Regierungspräsidium Leipzig, persönliche Mitteilung). Möglicherweise tolerieren die an anaerobe Verhältnisse adaptierten Fäkalbakterien das dabei entstehende H_2S besser, als Teile des Protozooplankton. Die positive Korrelation zwischen *E.coli* und Somatischen Coliphagen mit der Temperatur im Kläranlagen-Zulauf könnte daher aus einem schwächeren Fraßdruck durch das Protozooplankton bei höheren Temperaturen resultieren.

Abgesehen von *Cl. perfringens*-Sporen ließen sich für alle Mikroorganismen geringfügige saisonale Unterschiede in der Reduktion feststellen. So korreliert die Temperatur signifikant mit der Reduktion an *E.coli* und Somatischen Coliphagen und hochsignifikant mit der Reduktion an Enterokokken und F+ RNA Coliphagen. Der Einfluss des Protozooplanktons könnte innerhalb der Kläranlage bei höheren Temperaturen stärker ausfallen, da H_2S -Bildung durch den Eintrag von Sauerstoff in die Belebungsbecken nicht zu erwarten ist. Die schädigende Wirkung von sichtbarem Licht und UV-Licht auf verschiedene Mikroorganismen, allein und in Zusammenhang mit Sauerstoff (siehe oben), ist ebenfalls indirekt über die Tageslänge und die Intensität der Sonnenstrahlung mit der Temperatur gekoppelt. Dieser Einfluss könnte vor allem in den teilweise schon sehr klaren und sauerstoffreichen Nachklärbecken zum Tragen kommen.

2.3.1.3 Enterale Viren im Zu- und Ablauf der Kläranlage

In nahezu allen untersuchten Proben des Kläranlagen-Zulaufs ließen sich Genome enteraler Viren nachweisen (92,6 %). Der Großteil der Proben vom Kläranlagen-Ablauf lieferte ebenfalls positive Ergebnisse (72,7 %). Nach FARRAH (2000) enthalten kommunale Abwässer aus Einzugsgebieten von mehr als 100 Einwohnern immer humanpathogene Viren, da stets ca. 4 % der Bevölkerung enterale Viren ausscheiden. Für das Einzugsgebiet der Kläranlage Leipzig-Rosental entsprechen 4 % der Bevölkerung in etwa 20.000 Einwohnern. Die Zahl der ausgeschiedenen Viruspartikel kann 10^6 bis 10^{12} (!) Viruspartikel $\cdot$ g⁻¹ Stuhl betragen und zu einer starken Virusfracht in unbehandeltem Abwasser führen (FLEWETT, 1983, GERBA et al., 1975). Der hohe Anteil PCR-positiver Proben aus dem Zulauf der Kläranlage ist vor diesem Hintergrund also nicht verwunderlich. Unter den enteralen Viren konnten Entero-, Astro-, Adeno- und Noroviren sowohl im Zulauf- als auch im Ablauf der Kläranlage am häufigsten gefunden werden. Der Nachweis von Rota- und Hepatitis A-Viren gelang dagegen seltener. Adenoviren positive Proben nahmen zwischen Kläranlagen-Zulauf und –Ablauf deutlich ab (Abbildung 5).

Für das Jahr 2002 konnten in Sachsen 47,6 % aller meldepflichtigen Durchfallerkrankungen auf Noroviren und 8,9 % auf Rotaviren zurückgeführt werden. Im Jahr 2003 lagen die Anteile bei 23,7 % bzw. 9,0 % (Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen (LUA-Sachsen), Jahresberichte 2002 / 2003, <http://www.lua.sachsen.de>). Obwohl die Anteile PCR-positiver Adeno- und Astrovirusproben im Zulauf der Kläranlage Leipzig-Rosental relativ hoch waren (Abbildung 5), spielten sie jedoch in Sachsen mit < 5 % aller nachgewiesenen Durchfallerkrankungen nur eine untergeordnete Rolle. Nach WALTER (2000) verursachen Adenoviren vielfältige Krankheitsbilder von Durchfallerkrankungen bis hin zu Adenokonjunktivitis (Bindehautentzündung) und atypischer Lungenentzündung. Die Virusausscheidung erfolgt je nach Krankheitsbild u.a. direkt mit den Sekreten der erkrankten Augen und dem Stuhl. Der Nachweis im Rohabwasser kann deshalb nicht immer in Zusammenhang mit epidemiologisch belegten Durchfallerkrankungen gebracht werden. Im Gegensatz dazu sind Astroviren fast ausschließlich Erreger von Durchfallerkrankungen. Der hohe Anteil PCR-positiver Proben im Zulauf der Kläranlage Leipzig-Rosental im Vergleich zu den geringen Befunden durch die LUA-Sachsen könnte in der von WALTER (2000) beschriebenen sehr hohen Umweltresistenz der Astroviren liegen. Dadurch wird das Überleben der Viren vom Ort der Ausscheidung bis zur Kläranlage wahrscheinlich und könnte sich in einer hohen Nachweisquote widerspiegeln.

Zudem wird der Anteil detektierbarer Viren durch die vorangegangenen Konzentrierungsschritte beeinflusst. Nach D'SOUZA et al. (2000) sind die erzielten Wiederfindungsraten bei nahezu jeder Konzentrierungsmethode immer Virus-spezifisch. Als Faustregel gilt nach D'SOUZA, dass die Wiederfindungsrate für Hepatitis A-Viren gewöhnlich recht niedrig ist, wohingegen die Effizienz der Aufkonzentrierung für Enteroviren (Poliovirus als Modell) und in Abstufung auch für Caliciviridae (z.B. Noroviren) i.d.R. deutlich höher ausfällt. Unterschiede im Anteil PCR-positiver Proben zwischen den einzelnen untersuchten Viren könnten deshalb ihre Ursache u.a. in ungleichem Adsorptions- / Elutionsverhalten an den Al_2SO_4 -Flocken der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrierungsmethode haben.

Eigene Untersuchungen, mit künstlich mit Polio 1-Virus versetzten Wasserproben vom Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental und vom Werbeliner See, ergaben teilweise widersprüchliche Ergebnisse mit Wiederfindungsraten (real-time-PCR) zwischen 0 % und 100 % (Daten nicht dargestellt). Eine Evaluierung der Konzentrierungsmethode für alle untersuchten Viren wäre sicher sinnvoll gewesen und hätte für die Interpretation der PCR-Resultate einen wichtigen Beitrag geleistet.

Auffällig ist eine Erhöhung PCR-positiver Rotaviren im Kläranlagen-Ablauf auf 24 % (Abbildung 5). Diese Tatsache könnte zum Einen durch die Verwendung unterschiedlicher Volumina Originalwassers für die PCR-Nachweise von Kläranlagen-Zu- und -Ablauf (133fach höheres Volumen im Kläranlagen-Ablauf, siehe Kapitel 2.1.4) erklärt werden. Zudem könnten etwaige Substanzen, welche die Reverse-Transkriptase bzw. die PCR inhibieren, im Zulauf der Kläranlage in höherer Konzentration vorliegen. Ausführlicher soll auf den Einfluss PCR-inhibierender Substanzen beim Vergleich der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Probenahmestellen P und W4 eingegangen werden (siehe Kapitel 2.3.2.3).

Das breite Spektrum gefundener Enterovirus-Serotypen in der Kläranlage im Untersuchungszeitraum (siehe Kapitel 2.2.1.3) kann durch die epidemiologischen Daten der LUA-Sachsen bestätigt werden. Für das Infektionsgeschehen mit Noroviren im Jahr 2002 wurde nach Angaben des Robert-Koch-Institutes in Berlin das Zirkulieren einer Norovirus-Variante des Genotyps GGII.4 verantwortlich gemacht (bezeichnet als „Grimbsby-like Virus“) (ANONYMUS, 2004b), die sich 2002 auch vermehrt im Untersuchungsgebiet nachweisen lies. Für das Jahr 2004 bestätigt das Robert-Koch-Institut die Zirkulation einer für Europa neuen Virusvariante des Genotyps GGII.4 mit dem Namen „Jamboree-like Virus“

(ANONYMUS, 2004b). Diese Genotypvariante herrschte 2004 ebenfalls in den von uns detektierten Norovirus-positiven Proben vor.

Es konnten starke saisonale Unterschiede in der Präsenz enteraler Viren im Zu- und Ablauf der Kläranlage, mit deutlichen Spitzen im Spätherbst und Winter, gefunden werden (Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8). Dieses Phänomen ist auch von anderen Autoren beschrieben worden (FLEISCHER et al., 2000), wobei die Ursachen bisher nicht eindeutig geklärt werden konnten. Sie könnten gleichzeitig, sowohl von verschiedenen epidemiologischen Faktoren und der Verbreitung in der Bevölkerung als auch durch eine möglicherweise schlechtere Reinigungsleistung der Kläranlage im Winter, herrühren. Letzteres hat natürlich für die Spätsommermonate, in denen ein deutlicher Anstieg der positiven Proben insbesondere für Enteroviren, Noroviren und Astroviren zu verzeichnen war, keine Gültigkeit. Die Durchschnittstemperaturen im Kläranlagen-Ablauf lagen für Juli, August, September mit 19,7 °C, 20,4 °C bzw. 18,5 °C über denen aller anderen Monate im Untersuchungszeitraum. Zudem existiert kein statistischer Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil PCR-positiver Proben eines Virus (bzw. aller Viren als Summe) in einem Monat mit der Durchschnittstemperatur oder der Sauerstoffkonzentration des Zulauf- bzw. Ablaufwassers der Kläranlage desselben Monats. Die saisonale Häufung darmpathogener Viren im Untersuchungsgebiet in den Herbst- und Wintermonaten kann ebenfalls durch den Vergleich mit epidemiologischen Daten der LUA-Sachsen und des Robert-Koch-Institutes in Berlin bestätigt werden.

Ausgewählte Proben an Noro-, Entero- und Astroviren, die in der nested-RT-PCR ein positives Ergebnis zeigten, wurden zudem mittels real-time-PCR quantifiziert (Abbildung 9). Die Konzentration an viralen Genomen lag dabei im Mittel im Zulauf der Kläranlage um ein bis zwei Größenordnungen, in Extremfällen sogar um bis zu drei Größenordnungen über der gefundenen Konzentration an Bakteriophagen. Im Ablauf der Kläranlage waren es im Mittel ein bis zwei Größenordnungen (Tabelle 7 und Abbildung 4). Auf diesen Umstand soll später noch einmal näher eingegangen werden (Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Ein Zusammenhang zwischen Konzentration und Jahreszeit oder Temperatur ist nicht zu erkennen. Auch konnten nicht alle in der nested-PCR positiv getesteten Proben in der quantitativen PCR bestätigt werden. Insbesondere die Enteroviren zeigten einen sehr hohen Anteil negativer Proben in der real-time-PCR. Eine Erklärung liefert die Tatsache, dass in

unseren Untersuchungen für die real-time-PCR im Vergleich zur nested-PCR nur die Hälfte (2,5 µl statt 5 µl Template) extrahierter RNA verwendet wurde. Liegt die RNA in sehr niedriger Konzentration vor, kann dies für ein positives bzw. negatives PCR-Signal entscheidend sein. Weiterhin ist die nested-PCR der real-time-PCR hinsichtlich Sensitivität deutlich überlegen (PUSCH et al., 2005). Das wiederum verdeutlicht, dass wahrscheinlich ein Großteil der nested-PCR-positiven Enteroviren-Proben auf der Präsenz weniger Genome beruhte. Für Noro- und Astroviren lag der Anteil der Proben in diesem Bereich deutlich niedriger (zwischen 0 und 20 %).

Um die Infektiösität Enteroviren-PCR-positiver Proben zu prüfen, wurden 14 Proben vom Kläranlagen-Ablauf auf RD-Zellkulturen gebracht. Keine der Proben erzielte einen cytopathischen Effekt. Leider wurden in diesen Untersuchungen nur Proben eingesetzt, die in der real-time-PCR nicht mehr als 470 Gen.äquiv. · l⁻¹ enthielten. Die drei in der real-time-PCR am höchsten quantifizierten Proben ($1,3 \cdot 10^4$, $1,6 \cdot 10^4$ bzw. $4,2 \cdot 10^6$ Gen.äquiv. · l⁻¹), die möglicherweise ein anderes Ergebnis geliefert hätten, wurden nicht auf Zellkultur untersucht. In jedem Fall jedoch ist erwartungsgemäß eine Diskrepanz zwischen PCR-Nachweis und Nachweis auf Zellkultur erkennbar. LEWIS et al. (2000) wiesen Inaktivierungs- und Eliminationsmechanismen während der Konzentrationsschritte nach, die den Nachweis infektiöser Viren auf Zellkultur herabsetzte. Die tatsächliche Infektiösität der im Ablauf der Kläranlage detektierten Enteroviren könnte demnach durchaus höher liegen.

2.3.2 Bereich zwischen Kläranlage und Werbeliner See

2.3.2.1 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen in der Neuen Luppe und im Flutungswasser

Die Weiße Elster teilt sich in Leipzig hinter dem Elsterbecken in drei Arme: die „Rest“-Weiße Elster, die Neue Luppe und die Nahle. Unweit dieser Stelle leitet die Kläranlage Leipzig-Rosental ihr geklärtes Abwasser in die Neue Luppe ein (Probenahmepunkt L1, siehe Kapitel 2.1.1.2). Ca. 2 km flussabwärts mündet die Nahle wieder in die Neue Luppe. Weitere 4 km flussabwärts befindet sich in der Neuen Luppe bei Lützschena der Entnahmepunkt der Fernleitung zum Werbeliner See (Probenahmepunkt L2). Das Flutungswasser des Werbeliner Sees setzt sich also aus einem Anteil Nahlewasser (welches weitestgehend dem der Weißen Elster entspricht) und dem durch die Einleitung der Kläranlage qualitativ veränderten Luppewasser zusammen. Der Anteil des geklärten Abwassers nach Zusammenfluss von Nahle

und Neue Luppe betrug je nach Wasserstand ca. 5 % bis > 50 % (Frau Dr. Carmienieke, Regierungspräsidium Leipzig, persönliche Mitteilung).

Zwischen den Probenahmepunkten L1 und L2 ist eine klare Abnahme nahezu aller untersuchten bakteriellen Indikatoren und Bakteriophagen zu erkennen (Tabelle 8 und Abbildung 10). Die Abnahme für *E.coli*, Enterokokken und die Bakteriophagen ist hochsignifikant. Der Rückgang der *Cl. perfringens*-Sporen ist deutlich schwächer und auch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Ein Großteil dieses Rückgangs scheint jedoch weniger auf eine Eliminierung im Sinne eines Absterbens bzw. einer Inaktivierung zurückzuführen zu sein, sondern vielmehr auf die Vermischung mit dem in hygienischer Hinsicht saubereren Nahlewasser (Abbildung 10). An acht Tagen zwischen März und November 2004 wurden zusätzlich zu den Routineproben Wasserproben unmittelbar vor (L1b) und nach (L1c) Zusammenfluss von Neuer Luppe und Nahle genommen (Tabelle 9, Abbildung 2). Vergleicht man die L1b-Proben mit den Proben aus der Nahle zeigt sich, dass abgesehen von *Cl. perfringens*-Sporen die Konzentration aller Mikroorganismen in der Nahle unmittelbar vor dem Zusammenfluss mit der Neuen Luppe signifikant niedriger war. Wir haben es also tatsächlich mit einer Verdünnung zu tun. Hinsichtlich *Cl. perfringens*-Sporen ähnelten sich Nahle und Neue Luppe ($p > 0,05$), was auch den schwächeren, nicht signifikanten Rückgang zwischen L1 und L2 erklärt. Um dennoch eine Aussage über eine nicht durch Verdünnungseffekte hervorgerufene Reduktion machen zu können, ist ein Vergleich der Probenahmepunkte L1 und L1b bzw. L1c und L2 miteinander sinnvoll. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen dem Teilstück vor der Nahle, also zwischen L1 und L1b, für *E.coli* und Enterokokken. Eine Reduktion von Somatischen- und F+ RNA Coliphagen sowie *Cl. perfringens*-Sporen kann aus statistischer Sicht nicht bestätigt werden. Gleiches gilt für alle untersuchten fäkalen Bakterien und Bakteriophagen im Abschnitt zwischen L1c und L2. Eine höhere Probenahmeanzahl an diesen kritischen Punkten wäre für die Findung weiterer Signifikanzen möglicherweise befriedigender gewesen, hätte aber einen deutlichen Mehraufwand an Zeit und Material bedeutet.

Alles in allem bleibt die Aussage, dass abgesehen von der Verdünnung durch das Nahlewasser die Keimreduktion zwischen L1 und L2 als eher niedrig zu bewerten ist. Die Neue Luppe ist hinsichtlich ihrer Struktur stark anthropogen beeinträchtigt. Der Flussverlauf ist stark begradigt und die Fließgeschwindigkeit entsprechend hoch. Die 6 km Fließstrecke

zwischen L1 und L2 entsprechen im Mittel nicht mehr als 2 h Fließzeit, was daher nur eine sehr geringe Inaktivierung erwarten lässt. Auch verlieren Sedimentationsprozesse bei höheren Fließgeschwindigkeiten stark an Bedeutung. Der Gewässergrund besteht zudem zu großen Teilen aus aneinandergefügten, passgenauen Steinen, die wenig Turbulenz bzw. Austausch mit dem Interstitial ermöglichen. Eine Verfrachtung in andere Kompartimente des Flusses, wie z.B. das Interstitial, wird demnach nur eine geringe Rolle spielen. Das Wasser der Neuen Luppe bzw. der Nahle ist mehr oder weniger stark getrübt. Die Fließstrecke ist zudem teilweise durch dichte Bestände von *Potamogeton pectinatus* geprägt. Einem möglicherweise schädigendem Einfluss durch die Sonneneinstrahlung sind dadurch ebenfalls Grenzen gesetzt. Die schwache Elimination fäkaler Mikroorganismen in der Neuen Luppe deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur in anderen Untersuchungsgebieten. DURAN et al. (2002) fanden im Oberlauf des Flusses Ter in Spanien innerhalb einer Fließstrecke zwischen 50 m und 2 km nach Einleitung geklärten Abwassers einer Kläranlage mit biologischer Reinigungsstufe ebenfalls keine nennenswerte Reduktion von bakteriellen Indikatoren und Bakteriophagen.

Weiterhin sind, einmal vom Zufluss der Nahle abgesehen, weitere Einträge fäkaler Kontaminanten zwischen den Punkten L1 und L2 nicht ganz auszuschließen. So mündet nach dem Zusammenfluss von Neuer Luppe und Nahle der Bach „Bauerngraben“ in die Neue Luppe. Zwar wurde die Kläranlage Leipzig-Leutzsch, die bis November 2001 geklärtes Abwasser über den Bauerngraben in die Neue Luppe eingeleitet hat, außer Betrieb genommen, jedoch kann es bei Niederschlagsereignissen immer wieder zu Mischwasserabschlägen in den Bauerngraben kommen. Über dessen Beitrag an fäkaler Verunreinigung kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden.

Ferner wird der durch Deiche eingefasste Auenbereich teilweise landwirtschaftlich durch Schafhaltung genutzt. Nach starken Niederschlagsereignissen wird dieser Bereich teilweise vollständig überflutet. Fäkale Mikroorganismen, die ihren Ursprung im Überflutungswasser haben und im Auenbereich sedimentieren bzw. aus Fäkalien der zahlenmäßig teilweise starken Schafherden (schätzungsweise > 100 Tiere) stammen, könnten je nach Resistenzeigenschaften im Boden oder auf der Vegetation überdauern und bei erneuten Niederschlägen wieder in den Fluss eingespült werden. Insbesondere sind hier die sehr umweltresistenten *Cl. perfringens*-Sporen zu nennen. Ein Nachweis im Gewässer wäre demnach nicht unbedingt mit einer kürzlich eingetretenen fäkalen Belastung in Zusammenhang zu bringen.

Die Strecke zwischen L2 und P besteht im Wesentlichen aus der Fernleitung von der Neuen Luppe zum Werbeliner See. Die Fließzeit des Wassers in der Fernleitung liegt in etwa zwischen 8 und 10 h (Frau Dr. Carmienke, Regierungspräsidium Leipzig, persönliche Mitteilung) und damit etwas höher als im Abschnitt zwischen den Probenahmepunkten L1 und L2. Die mittlere Konzentration für *E.coli* nahm in diesem Abschnitt zwar deutlich ab, im statistischen Vergleich der Mittelwerte wird das 5 % Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlt (t-Test bei gepaarten Stichproben). Ebenfalls keine Veränderung der mittleren Konzentration konnte, hier jedoch sehr deutlich, für Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen beobachtet werden. Erstaunlicher Weise nahm die Konzentration der Bakteriophagen zwischen L2 und P leicht zu (siehe Tabelle 8). Allerdings ist diese Zunahme statistisch nicht signifikant. Da der Abschnitt zwischen L2 und P durch die Fernleitung im Wesentlichen als geschlossen zu betrachten ist, fallen neue Einträge als Einflussgröße für eine Veränderung der Konzentration an fäkalen Indikatoren und Bakteriophagen aus. Sollte dem Anstieg der Bakteriophagen zwischen L2 und P jedoch ein tatsächlicher Effekt zugrunde liegen, wären folgende Ursachen denkbar:

1. Die Phagen könnten sich repliziert haben. Eine nennenswerte Replikation an Bakteriophagen ist zum einen an eine gewisse Konzentration an Phagen und Wirtszellen geknüpft, die nach WIGGINS UND ALEXANDER (1985) mindestens $10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ Wirtszellen überschreiten sollte. Zwar wurde die Konzentration an Coliformen, die als Wirte für die Coliphagen in Frage kommen, routinemäßig nicht untersucht, in Vorversuchen aus dem Sommer 2002 wurde jedoch in vier Untersuchungen die Konzentration an Gesamtcoliformen für L2 im Mittel mit $2,6 \cdot 10^2$ (Max. = $4,6 \cdot 10^2$) und für P mit $2,5 \cdot 10^2$ (Max = $4,4 \cdot 10^2$) bestimmt. Das läge zwei Größenordnungen unterhalb dieses Schwellenwertes. Da die Konzentration an *E.coli* seit Sommer 2002 für L2 und P keine große Veränderung hinsichtlich eines Anstieges bzw. deutlicher Schwankungen gezeigt hat, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Gesamtcoliformen im Untersuchungszeitraum i.d.R. deutlich unter 10^4 Zellen $\cdot \text{ml}^{-1}$ lagen und eine erwähnenswerte Phagenreplikation somit ausgeschlossen werden kann. Zudem ist im Falle der F+ RNA Coliphagen die Replikation vom Vorhandensein der F-Pili der Wirtszellen abhängig. NOVOTNY UND LAVIN (1971) berichten, dass F-Pili bei Temperaturen unter 30 °C durch die Wirtszellen nicht synthetisiert werden. Da die maximalen Temperaturen an den Probenahmestellen L2 und P bei 21,2 °C bzw. 20,6 °C gemessen wurden, sollte eine Vermehrung der F+ RNA Coliphagen daher

theoretisch nicht möglich sein. Andererseits sind F+ RNA Coliphagen nicht immer im menschlichen Stuhl anzutreffen (HAVELAAR et al., 1987). Ihre hohe Abundanz im Rohabwasser von Kläranlagen könnte daher trotzdem von einer extra-enteralen Vermehrung herrühren, obwohl die Temperaturen in Zu- und Ablauf von Kläranlagen in Mitteleuropa im Allgemeinen ebenfalls deutlich unter 30 °C liegen. HERNÁNDEZ-DELGADO UND TORANZOS (1995) führen hingegen an, dass sich weder F+ RNA Coliphagen noch Somatische Coliphagen in Fließgewässern vermehren. Die Mechanismen, die zu einer Vermehrung der F+ RNA Coliphagen führen, scheinen also noch nicht ganz verstanden und bedürfen hinsichtlich hygienischer Fragestellungen und der Frage nach einer Eignung von F+ RNA Coliphagen als Indikatoren für eine virale Belastung von Gewässern weiterer Forschung.

2. Bakteriophagen könnten durch lysogene Wirtsbakterien freigesetzt worden sein. DHILLON UND DHILLON (1972) und DHILLON et al. (1976) bemerken allerdings dazu, dass Bakteriophagen, die durch lysogene Bakterien freigesetzt worden sind, nur einen sehr geringen Anteil im Verhältnis zur Gesamtplaquezahl Somatischer Coliphagen in natürlichen Habitaten ausmachen.

Zusammenfassend konnte im Abschnitt zwischen L2 und P für alle untersuchten bakteriellen Indikatoren und Bakteriophagen keine signifikante Abnahme gefunden werden. Die Unterschiede der mittleren Konzentrationen an *E.coli* verfehlen das 5 % Signifikanzniveau knapp. Die Fließzeit in der Fernleitung von weniger als 10 h scheint zu kurz, um nennenswerten Einfluss auf die Konzentration der fäkalen Mikroorganismen zu haben. Ein eindeutiger Effekt, der einen Anstieg der Bakteriophagen in diesem Bereich bewirken könnte, konnte nicht zugeordnet werden. Da der Anstieg zudem nicht signifikant ist, scheint es aus inhaltlichen Überlegungen deshalb sinnvoller den Somatischen- als auch F+ RNA Coliphagen im Vergleich zu *E.coli* und Enterokokken einfach eine höhere Resistenz gegenüber den verschiedenen natürlichen Inaktivierungsfaktoren zuzuschreiben. Diese Schlussfolgerung wäre zudem übereinstimmend mit den Resultaten in der Kläranlage (siehe Kapitel 2.3.1.2) und im Abschnitt zwischen L1 und L1b (siehe oben).

2.3.2.2 Fäkale Bakterien und Bakteriophagen im Werbeliner See

Die im Untersuchungszeitraum ermittelten Konzentrationen an fäkalen Bakterien und Bakteriophagen lagen an den verschiedenen Probenahmepunkten im Werbeliner See i.d.R.

zwei bis drei (*Cl. perfringens*-Sporen ein bis zwei) Größenordnungen unter denen des Flutungswassers am Probenahmepunkt P (Abbildung 11, Tabelle 10). In Abhängigkeit von der Indikatorspezies und dem Probenahmeort lagen die ermittelten Konzentrationen häufig unterhalb der Nachweisgrenze der Meßmethode. Der Anteil positiver Proben nahm dabei i.d.R. mit zunehmender Entfernung zur Einleitungsstelle ab.

Auf Grund des hohen Anteils negativer Proben ist ein statistischer Vergleich zwischen den einzelnen Probenahmepunkten im See und dem Flutungswasser nicht möglich. Die tatsächliche Konzentration eines negativ gemessenen Parameters liegt irgendwo zwischen Null und der jeweiligen Nachweisgrenze. Bezieht man in die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes die negativen Proben mit der Nachweisgrenze als Messwert ein, ergibt sich für die Probenahmestellen W2 bis W4 nach Probenanzahl gewichtet eine mittlere Konzentration für *E.coli* von $5,1 \cdot 10^{-1} \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$, Enterokokken von $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$, *Cl. perfringens*-Sporen von $4,7 \cdot 10^{-2} \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$, Somatische Coliphagen von $1,2 \cdot 10^{-1} \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$ und für F+ RNA Coliphagen von $1,2 \cdot 10^{-1} \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$. Diese Mittelwerte geben durch die Inbezugnahme der Nachweisgrenze als Messwert für die negativen Proben gewissermaßen eine „theoretische mittlere Höchstgrenze“ der fäkalen Kontamination mit Bakterien und Bakteriophagen im Werbeliner See an. Die tatsächlichen Mittelwerte liegen je nach Höhe der Nachweisgrenze und dem Anteil der negativen Proben folglich niedriger. Keine Probe an W2, W3 und W4 verfehlte den durch die EU-Badegewässerrichtlinie (Richtlinie 76 / 160 / EWG) vorgegebenen Grenzwert für *E.coli* ($< 20 \cdot \text{ml}^{-1}$) und den Leitwert für Enterokokken ($< 1 \cdot \text{ml}^{-1}$, die Richtlinie 76 / 160 / EWG sieht für Enterokokken keinen Grenzwert vor). Im Mittel lagen die Werte sogar zwei bis drei Größenordnungen darunter. Selbst direkt an der Einleitungsstelle (W1) verfehlten nur vier Proben (= 9,8 %) dieses Kriterium für *E.coli* und eine Probe (= 2,4 %) für Enterokokken.

Seit einigen Jahren wird unter Berücksichtigung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse eine Novellierung der EU-Badegewässerrichtlinie erarbeitet. Im aktuellen Entwurf wird den Enterokokken (laut Entwurf „Intestinale Enterokokken“) ein Grenzwert zugeordnet und generell eine Unterscheidung zwischen Küsten- und Binnengewässern vorgenommen.

Tabelle 14 zeigt die Grenzwerte für *E.coli* und Enterokokken dieses Entwurfs für Binnengewässer. Die W1-Proben nahe der Einleitungsstelle wären für das Untersuchungsjahr 2003 „nicht konform“ (23 % der Proben $> 9 \text{ E.coli} \cdot \text{ml}^{-1}$) bzw. hätten für 2004 „Akzeptable Qualität“. Alle anderen Probenahmestellen im See hätten dem gegenüber „Ausgezeichnete

Wasserqualität“. Ein Grenzwert für Bakteriophagen ist auch in der Novellierung der Badegewässerrichtlinie nicht vorgesehen. Im Hinblick auf Oberflächengewässer existieren ebenfalls keine Grenzwerte für *Cl. perfringens*-Sporen. Nach der EU-Richtlinie 98 / 83 / EG über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch bzw. nach der deutschen Trinkwasserverordnung dürfen Clostridien in 100 ml bzw. 20 ml nicht enthalten sein.

Tabelle 14: Grenzwerte für *E.coli* und Enterokokken [MPN oder KbE · ml⁻¹] im Neuentwurf der EU-Badegewässerrichtlinie für Binnengewässer nach Dizer et al. (2005)

Parameter	Ausgezeichnete Qualität	Gute Qualität	Befriedigende/ Akzeptable Qualität
Enterokokken	2 [*]	4 [*]	3,6 ^{**}
<i>E. coli</i>	5 [*]	10 [*]	9 ^{**}

* Auf der Grundlage einer 95-Perzentil-Bewertung ** Auf der Grundlage einer 90-Perzentil-Bewertung

Die beobachtete gute hygienische Wasserqualität des Werbeliner Sees bezüglich fäkalen Bakterien und Bakteriophagen, deckt sich mit den Ergebnissen eines Gutachtens aus dem Jahr 2002 (ANONYMUS, 2002). Dem Gutachten liegen zwei Probenahmetage vom 20.09.2001 bzw. 15.11.2001 zu Grunde. Dabei wurden sowohl *E.coli*, Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen als auch Somatische- und F+ RNA Coliphagen in der gleichen Größenordnung gemessen wie in dieser Arbeit.

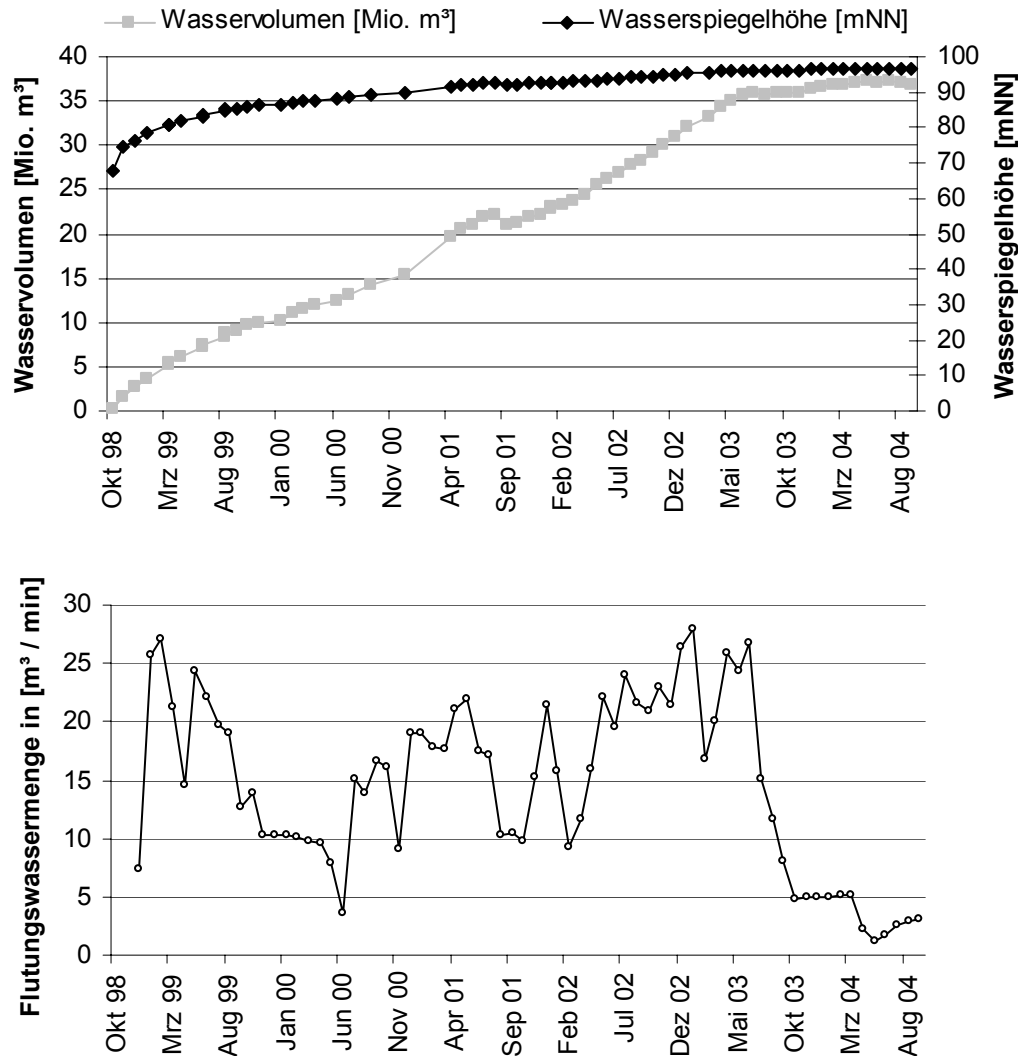


Abbildung 16: Wasservolumen, Wasserspiegelhöhe und Flutungswassermenge des Werbeliner Sees zwischen Oktober 1998 und September 2004 (Quelle: Lausitzer und Mitteldeutsche Bergbau-Verwaltungsgesellschaft, LMBV)

Als wichtige Ursachen für die niedrige Belastung des Werbeliner Sees mit fäkalen Bakterien und Bakteriophagen können die ohnehin niedrige Konzentration im Flutungswasser (Tabelle 8) und die hohe Verdünnung im Werbeliner See angenommen werden.

Die mittlere Flutungswassermenge des Werbeliner Sees mit Wasser aus der Neuen Luppe lag zwischen Oktober 1998 und September 2004 bei knapp $15 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Der minimale Zufluss lag bei $1,3 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ und der maximale Zufluss bei knapp $28 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ (Abbildung 16). Seit Sommer 2003 wurde der Zufluss wegen Sanierungsarbeiten an der Böschung des Werbeliner Sees stark gedrosselt und lag im Schnitt unter $5 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Das Wasservolumen und die

Seefläche veränderte sich seit diesem Zeitpunkt kaum bzw. waren teilweise sogar rückläufig (Abbildung 16).

Vergleicht man das Wasservolumen des Sees mit der Flutungswassermenge, die pro Tag dem See zufließt, erhält man im Untersuchungszeitraum von September 2002 bis Dezember 2004 eine theoretische Verdünnung des zufließenden Luppewassers zwischen 1 : 1.000 und 1 : 20.000.

Einschränkend müssen in diesem Zusammenhang jedoch einige wichtige Randbedingungen mit in Betracht gezogen werden, die diese Zahlen relativieren:

1. Die Seemorphometrie ist sehr heterogen strukturiert. Vor allem der flache Westteil des Sees ist vom übrigen Teil des Sees durch zahlreiche langgestreckte Inseln isoliert. Das eingeleitete Wasser könnte möglicherweise erst nach einer längeren Verweilzeit diesem Bereich erreichen, wobei sich der Großteil der Kontamination zunächst auf den Ostteil, mit den Probeentnahmestellen W1 bis W4, konzentrieren würde.
2. Der Werbeliner See ist dimiktisch. Zweimal im Jahr baut sich eine thermische Schichtung auf, die den Wasserkörper in ein Hypo- und ein Epilimnion teilt (Abbildung 17). Da sich das Flutungswasser aus der Neuen Luppe auf Grund seiner Temperatur sowohl im Sommer als auch im Winter i.d.R. in den oberen Wasserkörper, dem Epilimnion, einschichtet, bezieht sich der Verdünnungseffekt in diesem Zeitraum folglich mengenmäßig nur auf diesen Anteil des Sees. Die Mächtigkeit des Epilimnions ist im Verlauf eines Jahres jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb eine Berechnung des Verdünnungsfaktors für den Anteil des Zulaufwassers im Epilimnion mit vielen Unsicherheiten behaftet wäre.
3. Je nach Resistenz der eingetragenen fäkalen Bakterien, Bakteriophagen und Viren gegenüber den Bedingungen im See erfolgt die Vermischung des Flutungswassers mit hygienisch vorbelastetem Seewasser.

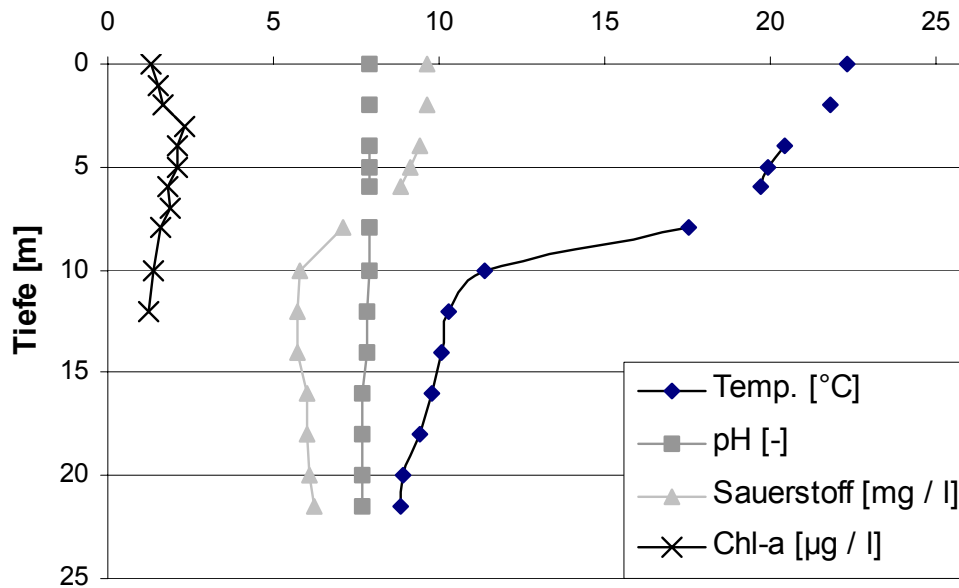


Abbildung 17: Tiefenprofil für Temperatur, pH-Wert sowie Sauerstoff- und Chl-a-Konzentration im Werbeliner See an der Probenahmestelle W2 vom 16.07.2003. Der Wasserkörper wird durch eine Thermocline bei ca. 8 m Wassertiefe in eine wärmere obere (Epilimnion) und eine kältere untere (Hypolimnion) Wasserschicht geteilt, die sich nur schwach miteinander vermischen.

Die tatsächlich realisierte Verdünnung des Flutungswassers im Werbeliner See wird demnach deutlich niedriger ausfallen als die angeführte theoretische Verdünnung.

Für die Eliminierung allochthoner Bakterien, Bakteriophagen und Viren im See kommen eine Reihe verschiedener Faktoren in Frage, die relativ unspezifisch als „Selbstreinigung“ zusammengefasst werden können. Dazu zählen Grazing durch Protozooplankton und Makrozooplankton (Daphnien, Copepoden, siehe Kapitel 2.2.3), Inaktivierung durch sichtbares Licht bzw. UV-Licht, Mangel an Nährstoffen, Verfrachtung an Partikel adsorbierter Bakterien, Bakteriophagen und Viren ins Sediment u.a.. Dabei ist es wichtig zwischen „Verschwinden“ und Eliminierung zu unterscheiden. Nach ROSZAK et al. (1984) und GRIMES et al. (1986) verlieren fäkale Bakterien nach Eintrag in die Umwelt relativ schnell ihre Kultivierbarkeit, sind jedoch zellulär intakt und können auch noch für einige Tage eine gewisse Stoffwechselaktivität aufrecht erhalten. Diese Zellen werden als „active but non-culturable“ bezeichnet.

Welche überragende Bedeutung Grazing durch das Protozooplankton auf die Mortalität autochthoner und verschiedener fäkaler Mikroorganismen haben kann, belegen MENON et al. (2003) sehr eindrucksvoll in Untersuchungen in der Seine und in küstennahen Bereichen der Nordsee. So konnten sie ca. 90 % der Gesamtmortalität direkt auf das Grazing durch Protozooplankton, hauptsächlich heterotrophe Nanoflagellaten, zurückführen.

In Proben, die in verschiedenen Tiefenhorizonten des Werbeliner Sees genommen worden, konnte eine ähnlich niedrige Fäkalkeimkonzentration wie an der Wasseroberfläche gefunden werden (Daten nicht dargestellt). Jedoch konnte für *E.coli* i.d.R. in 18 bis 25 m Tiefe, d.h. in unmittelbarer Nähe zum Gewässersediment am Probenahmepunkt W2, höhere Konzentrationen ermittelt werden. Dies könnte auf Sedimentation nach Adsorption an organische bzw. anorganische Partikel und auf anschließende Resuspension zurückzuführen sein. MARTIN (2003) konnte in einer Diplomarbeit in mehreren Untersuchungen im März 2003 im Sediment des Werbeliner Sees relativ hohe *E.coli*-Konzentrationen im Bereich von $1,6 \text{ bis } 3,5 \cdot 10^2 \text{ KbE} \cdot (\text{g TG})^{-1}$ finden (Sedimentproben in Nähe von W1 und W2). Für *Cl. perfringens*-Sporen lag die Konzentration gar zwischen $7,1 \text{ und } 7,9 \cdot 10^3 \text{ KbE} \cdot (\text{g TG})^{-1}$. ASHBOLT et al. (1993) konnten Keimdichten allochthoner Mikroorganismen im Sediment nachweisen, die 100 bis 1.000fach höher lagen als im darüber liegenden Wasser. Durch Adsorption an sedimentierende Partikel sind diese nicht nur mit Nährstoffen versorgt, sondern auch vor verschiedenen schädigenden Umwelteinflüssen, wie z.B. UV-Licht und Predation, besser geschützt und somit länger lebensfähig. DAVIES et al. (1995) fanden, dass *Cl. perfringens*-Sporen in Gewässersedimenten für eine unbestimmte Zeit überleben können.

Um die Sedimentation allochthoner Mikroorganismen im Werbeliner See näher zu untersuchen, wurden Sedimentationsfallen am Gewässergrund exponiert. Dabei ließen sich nach 14 Tagen bis zu 10.000fach höhere Konzentrationen an *E.coli*, Enterokokken und *Cl.perfringens*-Sporen als im Freiwasser finden (Tabelle 11). Die gefundenen Konzentrationen stellen gewissermaßen die Nettosedimentation innerhalb von 14 Tagen dar, in die sedimentierte, aber im Expositionszeitraum abgestorbene bzw. inaktivierte oder gefressene Zellen nicht mit eingegangen sind. Die tatsächliche (Brutto-) Sedimentationsrate wurde von MARTIN (2003) unter Einbeziehung der Ergebnisse von im Vorfeld durchgeführten Absterbeversuchen auf $8,0 \cdot 10^4 \text{ KbE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ für *E.coli*, $3,3 \cdot 10^5 \text{ KbE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ für Enterokokken und $7,8 \cdot 10^5 \text{ KbE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ für *Cl. perfringens*-Sporen unter einer Wassersäule von 20 m geschätzt.

In Anbetracht der niedrigen Fäkalkeimkonzentration im Wasserkörper scheinen Sedimentationsprozesse eine nicht zu unterschätzende Verlustgröße für die untersuchten allochthonen Mikroorganismen im Werbeliner See zu sein. Leider beschränkten sich diese Untersuchungen auf die genannten bakteriellen Indikatoren. Ein Vergleich mit Somatischen- bzw. F+ RNA Coliphagen wäre sicher sehr interessant gewesen.

NOBLE et al. (2004) und DAVIES-COLLEY et al. (1999) konnten eine photooxidative Inaktivierung für *E.coli*, Enterokokken und F+ RNA Coliphagen nachweisen. DIZER et al. (2005) fanden ebenfalls eine schädigende Wirkung des Sonnenlichtes auf *E.coli*, Enterokokken und vor allem auf Somatische- und F+ RNA Coliphagen. In den Routineuntersuchungen wurde für W2 eine mittlere Sichttiefe von 4,7 m (Max. 9,5 m) und für W3 von 5,1 m (Max. 8,8 m) bestimmt. Es ist daher anzunehmen, dass das Licht vor allem im Sommer als Einflussgröße für die Inaktivierung der Fäkalkeime im Werbeliner See ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Diese Hypothese wird neben den Angaben in der Literatur außerdem durch die in dieser Arbeit durchgeführten Laborversuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser untermauert (Kapitel 2.2.4 und Kapitel 2.3.4).

Zusammenfassend zeigte sich eine unerwartet niedrige Kontamination des Werbeliner Sees mit fäkalen Bakterien und Bakteriophagen. Die Konzentration an *E.coli* und Enterokokken lag deutlich unterhalb geltender und mit Sicherheit auch unterhalb des möglicherweise kommenden neuen Standards der EU- Badegewässerrichtlinie. Bakteriophagen ließen sich im See nur sehr sporadisch und in niedriger Konzentration nachweisen. Die Mehrzahl der Proben lag unterhalb der Nachweisgrenze.

2.3.2.3 Enterale Viren im Flutungswasser und im Werbeliner See

Abgesehen von den Adenoviren ließen sich im Untersuchungszeitraum alle untersuchten enteralen Viren sowohl im Flutungswasser (Probenahmepunkt P) als auch im Werbeliner See (Probenahmepunkt W4) mittels nested-RT-PCR nachweisen (Abbildung 12). Die Mehrheit der positiven Proben stammten aus den Spätsommer- und Herbstmonaten und spiegeln damit die Situation im Zu- und Ablauf der Kläranlage wider (siehe Kapitel 2.2.1.3). Da beiden Probenahmepunkten das gleiche Volumen zu Grunde liegt, sind P und W4 unter diesem Aspekt gut miteinander vergleichbar.

Erstaunlicher Weise konnten für einige Viren im See mehr Proben positiv getestet werden als im Flutungswasser. Dies galt für Noro-, Rota- und Astroviren. BRUNBEN (2005) konnte für die von ihm untersuchten P-Proben und W4-Proben eine deutliche Hemmung der PCR zeigen. Dabei stammte die von ihm verwendete RNA bzw. DNA aus den gleichen Probenkonzentraten, die auch im Robert-Koch-Institut in Berlin eingesetzt wurden. Bei Verwendung der unverdünnten RNA / DNA-Extrakte mit Eubakterien-spezifischen Primern konnten in mehr als 90 % der Fälle für die P-Proben *kein* PCR-Produkt gefunden werden, wohingegen bei einer 1:10 Verdünnung die PCR ein positives Resultat erbrachte. Drastisch zeigte sich dieser Sachverhalt im molekularbiologischen PCR-Nachweis von Adenoviren. Keine einzige P-Probe konnte im unverdünnten DNA-Isolat positiv auf Adenoviren getestet werden. In der 1:10 Verdünnung waren es 77,8 % (!). Für die W4-Proben konnten 5,4 % in den unverdünnten Extrakten und 19,2 % in der 1:10 Verdünnung positiv auf Adenoviren getestet werden.

Die Existenz PCR inhibierender Substanzen (z.B. Salze, Huminstoffe, Bentonit) wurde von zahlreichen Autoren beschrieben (u.a. LEWIS et al., 2000, SANO et al., 2003). Bestandteile im Wasser, welche die Effektivität der Virusdetektion mittels PCR oder auf Zellkultur beeinflussen, dürften in nur schwer vorhersagbarer Häufigkeit und Konzentration auftreten. Ihr Vorhandensein könnte in Beziehung zu jahreszeitlichen oder anderen Zyklen stehen. Die Konsequenzen können falsch-*negative* Ergebnisse und damit eine Fehleinschätzung der Belastung mit bakteriellen oder viralen Genomen sein.

Neben dem Eintrag unzähliger chemischer Verbindungen durch die Kläranlage Leipzig-Rosental in die Neue Luppe, ist die komplexe chemische Struktur der Weißen Elster, als Quelle für inhibierender Stoffe zu diskutieren. Die Weiße Elster gilt als einer der meistgenutzten Flüsse Deutschlands (Herr Prof. Uhlmann, Sächsische Akademie der Wissenschaften, persönliche Mitteilung). Sie fließt durch mehrere Bundesländer und Städte wie Zeitz und Gera und nimmt zudem andere stark genutzte Flüsse, wie z.B. die Pleiße, in sich auf. Sie stellt gewissermaßen ein Sammelbecken geogener und anthropogener Einflüsse dar. Der Chemismus des Wassers ist deshalb sehr komplex und die Anwesenheit zahlreicher potentieller Inhibitoren wahrscheinlich.

Weiterhin konnte BRUNBEN (2005) in Abhängigkeit von der untersuchten Virusgruppe teilweise starke Unterschiede hinsichtlich PCR-positiver Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher gruppenspezifischer Primersysteme nachweisen. Eine Kombination

verschiedener Primersysteme zeigte sich dabei oft als sehr sinnvoll hinsichtlich der Ausbeute an positiven Ergebnissen.

Aufgrund der von BRUNBEN (2005) gezeigten Anfälligkeit der PCR gegenüber verschiedenen Inhibitoren und der Abhängigkeit der verwendeten Primersequenzen müssen die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse sehr vorsichtig interpretiert werden. Der tatsächliche Anteil genomisch-viral belasteter Proben könnte in allen Virengruppen deutlich höher liegen. Mögliche Unterschiede in der Qualität und der Konzentration PCR-inhibierender Substanzen erschweren außerdem einen direkten Vergleich verschiedener Probenahmeorte. (z.B. Probenahmestellen P und W4)

Quantitative Untersuchungen einiger nested-RT-PCR-positiver Proben mittels real-time-PCR enthüllten vor allem für Noro- und Astroviren teilweise beachtliche Viruskonzentrationen (Abbildung 13). Die Anzahl der untersuchten Proben war relativ gering und begründet sich teilweise mit der im Vergleich zur Kläranlage geringeren Anzahl an Proben, die in der nested-RT-PCR positiv getestet wurden. In Analogie zu den Proben vom Zu- und Ablauf der Kläranlage erbrachte wiederum ein Teil der in der nested-RT-PCR positiv getesteten Proben in der quantitativen PCR kein Signal. Die Ursachen wurden in Kapitel 2.3.1.3 diskutiert. Da die mittlere Konzentration an Noroviren und Enteroviren in den W4-Proben höher lag als bei den P-Proben, könnten auch hier Inhibitoren eine wichtige Rolle spielen.

Sowohl die qualitativen als auch die quantitativen Untersuchungen mittels PCR lassen grundsätzlich keinen Rückschluss über die Infektiosität der detektierten Viren zu. Eine erfolgreiche Anzucht eines Virus auf einer spezifischen Zellkultur ist hingegen ein eindeutiger Beleg für dessen Infektiosität.

Keine der untersuchten Proben vom Probenahmepunkt P zeigte auf 293-Zellen einen CpE. Infektiöse Adenoviren ließen am Probenahmepunkt P also nicht nachweisen. Die von BRUNBEN (2005) molekularbiologisch detektierten Adenoviren gehörten fast ausschließlich dem Subgenus F an. Da der Subgenus F prinzipiell als schwer anzüchtbar gilt, ist nicht zweifelsfrei auszuschließen, dass ein gewisser Anteil der PCR-positiven Proben, trotz negativem Ergebnisses auf der 293-Zelllinie, infektiös sein könnte.

Hingegen konnten in 22,2 % der untersuchten Proben vom Probenahmepunkt P infektiöse Enteroviren gefunden werden. Das entspricht in etwa dem Anteil molekularbiologisch

positiver Proben, die vom Robert-Koch-Institut in Berlin nachgewiesen werden konnten. Für W4 konnte nur eine Probe (vom 19.10.2004) zellkulturell positiv auf Enteroviren getestet werden (=1,2 %). Der molekularbiologische Nachweis am Robert-Koch-Institut in Berlin für diese Probe fiel dagegen negativ aus. Da am Robert-Koch-Institut generell nur unverdünnte Nukleinsäureextrakte als Template für die nested-PCR verwendet worden sind, könnten wiederum PCR-Inhibitoren dafür verantwortlich sein.

Unabhängig davon konnte BRUNBEN (2005) sowohl in der unverdünnten zellkulturell-positiven W4-Probe vom 19.10.2004 als auch in der 1:10 Verdünnung in der RT-PCR ein positives Signal erhalten. Dieser Umstand könnte mit der gesondert durchgeführten Nukleinsäureextraktion in seiner Arbeit und durch die Verwendung eines anderen Primersystems (siehe oben) erklärt werden.

LEWIS et al. (2000) fanden in der Abwesenheit potentieller Inhibitoren eine 10- bis 100fach höhere Sensitivität der RT-PCR für Poliovirus-2 im Vergleich zum Nachweis auf Zellkultur. Dagegen konnten bei Anwesenheit inhibierender Substanzen auf Zellkultur teilweise mehr Viren gefunden werden als im RT-PCR-Ansatz. HOT et al. (2003) konnten in 60 von 68 (= 88 %) molekularbiologisch untersuchten Flusswasserproben Enteroviren nachweisen. Hingegen gelang in nur zwei Proben (= 2,9 %) ein positiver Nachweis von Enteroviren auf Zellkultur.

In diese Überlegung ist jedoch mit einzubeziehen, dass dem Nachweis mittels RT-PCR bzw. Zellkultur deutlich unterschiedliche Volumina Originalwassers zugrunde lagen. Die Ergebnisse der RT-PCR von den Probenahmestellen P und W4 beziehen sich auf 29,2 ml. Für den Enteroviren-Nachweis wurden hingegen für die Probenahmestelle P immerhin 2000 ml und für die Probenahmestelle W4 2500 ml verwendet (siehe Kapitel 2.1.4 und 2.1.6).

Hinsichtlich der viralen Belastung des Werbeliner Sees kann das positive Bild, das durch die niedrige Konzentration bakterieller Indikatoren entstanden ist, aus dem hier Gesagten nur bedingt bestätigt werden. Zwar konnte nur eine Probe positiv auf infektiöse Enteroviren getestet werden, jedoch wäre der Anteil positiver Proben durch eine Erhöhung der für den zellkulturellen Nachweis verwendeten Probenmenge von 2,5 l (bezogen auf das Originalvolumen) auf das in der aktuellen Fassung der EU-Badegewässerrichtlinie vorgeschriebene Volumen von 10 l möglicherweise deutlich höher. Im Hinblick auf die mittels real-time-PCR quantifizierte Viruslast im See konnten Enteroviren-Genome im

Vergleich zu anderen enteralen Viren außerdem nur in sehr geringer Konzentration detektiert werden (Abbildung 13). Die Konzentration an Noro- bzw. Astroviren-Genomen lag um Größenordnungen höher. Es ist daher zu vermuten, dass im Werbeliner See neben Enteroviren andere enterale Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko darstellen könnten. Insbesondere vor dem Hintergrund der sehr niedrigen minimalen Infektionsdosis der verschiedenen pathogenen Viren sollte diesen Befunden besondere Aufmerksamkeit zukommen.

2.3.2.4 Vergleich zwischen der Präsenz infektiöser Enteroviren mit der Bakteriophagenkonzentration

Der Vergleich zwischen der Präsenz infektiöser Enteroviren mit der Konzentration Somatischer- und F+ RNA Coliphagen sollte der Bewertung der Eignung von Bakteriophagen als Indikatoren für eine Kontamination mit enteralen Viren in einem Gewässer dienen.

Für den Probenahmepunkt W4 konnte nur eine Probe (19.10.2004) positiv auf infektiöse Enteroviren getestet werden. Die Konzentrationen an Somatischen und F+ RNA Coliphagen waren an diesem Tag an W4 mit $<0,1 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ sehr gering. Der positive Enteroviren-Nachweis an diesem Probenahmetag spiegelte sich demnach nicht in einer erhöhten Bakteriophagenkonzentration wider. Auch andere Autoren fanden enterale Viren in Wasserproben ohne nachweisbare Bakteriophagenkonzentrationen (MONTGOMERY, 1982, DEETZ et al., 1984, MORINGO et al., 1992).

Am Probenahmepunkt P konnten in 100 % bzw. 94 % von 89 untersuchten Proben Somatische bzw. F+RNA Coliphagen nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die mittlere Bakteriophagenkonzentration an den 17 Probenahmetagen, an denen infektiöse Enteroviren gefunden wurden und gleichzeitig die Konzentration an Bakteriophagen bestimmt wurde, lag für Somatische Coliphagen bei $4,4 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ und für F+RNA Coliphagen bei $2,6 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Lediglich in drei dieser Proben (= 17,6 %) wurde eine erhöhte Konzentration an Bakteriophagen festgestellt (21.10.03, 17.11.03, 27.04.04, siehe Anhang Tabelle A1).

Die entsprechenden Bakteriophagenkonzentrationen an den Tagen mit negativem Enteroviren-Nachweis lagen im Mittel für Somatische Coliphagen bei $4,6 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ sowie $2,3 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ für F+RNA Coliphagen. Allerdings konnten auch hier erhöhte Bakteriophagenkonzentrationen ausgemacht werden (28.07.03, 29.09.03, 13.01.04, siehe Anhang Tabelle A1). Statistisch gesehen gibt es keine Unterschiede in der Konzentration an

Bakteriophagen zwischen den Proben mit positivem bzw. negativem Enteroviren-Nachweis auf Zellkultur, was den Indikationswert von Somatischen- als auch von F+ RNA Coliphagen, zumindest für Enteroviren, in Frage stellt.

Die Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Badegewässerkommission des Umweltbundesamtes (1998) empfiehlt als Vorschlag zur Bewertung der Belastung mit enteralen Viren, eine Konzentration an Coliphagen größer $0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ als bedenklich einzustufen. An drei (Somatische Coliphagen) bzw. vier (F+ RNA Coliphagen) von 17 Tagen mit positivem Enteroviren-Nachweis lag die Konzentration jedoch unterhalb dieser Empfehlung. Das entspräche einem Anteil von 17,6 % bzw. 23,5 % falsch-*negativer* Indikation für den Probenahmepunkt P. Andererseits würden sowohl Somatische- als auch F+ RNA Coliphagen bei dieser Empfehlung einen relativ hohen Anteil falsch-*positiver* Ergebnisse liefern (72,3 % bzw. 69,4 %). Sie würden eine Kontamination mit Enteroviren indizieren, obwohl eigentlich keine vorhanden ist. Der Anteil falsch-*positiver* Befunde für W4 läge bei 4,6 % bzw. 3,4 %. Eine Herabsetzung der Empfehlung auf beispielsweise $>0,1 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ (d.h. eine Verschärfung der Anforderungen), um den Anteil falsch-*negativer* Befunde auf ein akzeptables Maß zu reduzieren, würde unweigerlich einen höheren Anteil falsch-*positiver* Ergebnisse zur Folge haben. Vier Punkte sind dazu anzumerken:

1. Die Empfehlung von $>0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ soll dem in der Badegewässerrichtlinie geforderten negativen Enterovirus-Nachweis in 10 l Wasser entsprechen. Dabei geht man davon aus, dass das Verhältnis von Coliphagen zu Enteroviren in mechanisch-biologisch gereinigtem Abwasser 5.000 : 1 entspricht. Einem Enterovirus in 10 l würden demnach 5.000 Coliphagen ($= 0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$) gegenüberstehen. Unsere Untersuchungsergebnisse hinsichtlich Enteroviren beziehen sich jedoch nur auf 2 l Wasser (siehe Kapitel 2.1.6). Es ist anzunehmen, dass bei einem eingesetzten Volumen von 10 l entsprechend mehr Enterovirus-positive Proben gefunden worden wären. Der Anteil falsch-*positiver* Proben würde dadurch deutlich sinken.
2. Über eine Kontamination mit anderen infektiösen Viren kann anhand der Ergebnisse keine Aussagen getroffen werden. Erweitert man jedoch den Indikationsgedanken für Bakteriophagen auf alle enteralen Viren und nimmt weiterhin an, dass die untersuchten Proben teilweise infektiöse enterale Viren enthalten, die keine Enteroviren sind, würde der Anteil falsch-*positiver* Proben ebenfalls sinken.

3. Zudem kann der hohe Anteil falsch-*positiver* Indikationen aus inhaltlichen Überlegungen plausibel erklärt werden. Bakteriophagen werden kontinuierlich von mehr oder weniger allen Teilen der Bevölkerung ausgeschieden und gelangen über die Kläranlage in das Gewässersystem. Dieser Sachverhalt trifft auch für alle anderen bakteriellen Indikatoren, wie *E.coli* und Enterokokken, zu. Enteroviren oder andere enterale Viren werden hingegen i.d.R. nur von einem gewissen Anteil in der Bevölkerung und über einen begrenzten Zeitraum ausgeschieden.

Die in den Punkten 1 und 2 getroffenen Annahmen könnten jedoch ebenfalls den Anteil falsch-*negativer* Befunde, also der Proben, deren Konzentration niedriger als $0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ist, obwohl Enteroviren bzw. enterale Viren vorhanden sind, erhöhen. Dies könnte zu schwer kalkulierbaren Risiken hinsichtlich der Sicherheit der Badenden führen. Es scheint daher dringend angeraten, die Empfehlung von $0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ nach unten zu korrigieren. Gleichzeitig kann ohne die Einbeziehung anderer enteraler Viren in die Grenzwertfindung nicht plausibel geschlussfolgert werden, wie stark diese Korrektur ausfallen sollte.

2.3.3 Limnologische Untersuchungen am Werbeliner See

Da neben dem Eintrag an fäkalen Mikroorganismen die Wasserqualität des Werbeliner Sees möglicherweise nachhaltig durch den Eintrag an Nährstoffen (vor allem Phosphor und Stickstoff) beeinflusst wird, rückten seit Beginn der Untersuchungen ebenfalls verschiedene limnologische Parameter ins Blickfeld. Ziel war es unter anderem, den See hinsichtlich des Trophiestatuses zu klassifizieren.

Für die Vorhersage der zukünftigen Wasserbeschaffenheit existieren zwei Prognosen vor Beginn der Flutung des Werbeliner Sees aus den Jahren 1996 (ANONYMUS, 1996) sowie 1998 (ANONYMUS, 1998b). In beiden Arbeiten wurden meso- bis eutrophe Verhältnisse vorhergesagt, die sich vor allem auf die P-Konzentration in der Weißen Elster bzw. der Neuen Luppe in Höhe der Entnahmestelle der Fernleitung stützen. Dabei wurden folgende Charakteristika für den Zeitraum am Ende der Fremdflutung (2005 / 2006) prognostiziert:

- SRP zwischen 0 und $0,05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
- TP zwischen 0,04 und $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

- NO_3^- -N um $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
- mögliche Sauerstoffzehrung im Hypolimnion

In einem weiteren Gutachten (ANONYMUS, 2002), in das reale Messwerte aus dem Jahr 2001 eingingen, konnten diese Prognosen teilweise bestätigt werden. Einige Parameter, vor allem die SRP-Konzentration, zeigten im Vergleich zu den prognostizierten Verhältnissen deutlich bessere Werte. Die hier in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse aus den Jahren 2002 bis 2004 untermauern die Richtigkeit dieses Gutachtens:

Die hohe Sichttiefe von bis zu 10 m ging mit einer sehr niedrigen Phosphor- und Chl-a-Konzentration einher. Die in ANONYMUS (2002) gefundenen Chl-a-Konzentrationen von max. $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, in Ausnahmefällen bis $36 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (März 2001) wurden nicht erreicht. Allerdings wurde die Chl-a-Konzentration im Untersuchungszeitraum nicht kontinuierlich, sondern nur temporär bestimmt. Teilweise fehlen Messwerte an Tagen an denen vergleichsweise hohe Phytoplanktonkonzentrationen gefunden wurden (BOMBACH, 2005). Ein engmaschigeres Messnetz hätte möglicherweise höhere Chl-a-Konzentrationen im Untersuchungszeitraum aufdecken können.

Im See wurden im Mittel $2,2 \text{ mg N} \cdot \text{l}^{-1}$ (TN) gemessen. Davon stellte Nitrat erwartungsgemäß den höchsten Anteil (Mittelwerte: Nitrat = $2,0 \text{ mg N} \cdot \text{l}^{-1}$, Ammonium = $0,1 \text{ mg N} \cdot \text{l}^{-1}$). Stickstoff stellt in diesem Sinne keinesfalls eine Begrenzung für die Eutrophierung dar. BOMBACH (2005) schätzte den Sauerstoffverbrauch durch die Ammoniumoxidation auf 13 bis 22 % der Gesamtsauerstoffkonzentration. Die nitrifikationsbedingte Sauerstoffzehrung im Hypolimnion spielte dementsprechend eine untergeordnete Rolle.

Dass sich allerdings die niedrige Phosphorkonzentrationen limitierend auf das Phytoplanktonwachstum auswirkt, konnte anhand von Algenwachstumsversuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) nachgewiesen werden. Dafür spricht ebenfalls das ermittelte Verhältnis Gesamtstickstoff : Gesamtphosphor von rund 45. Bei einem Verhältnis > 15 kann i.d.R. von einer Phosphorlimitation ausgegangen werden (VOLLENWEIDER UND KEREKES, 1982).

Die beschriebene Sukzession des Phytoplanktons im Werbeliner See ähnelt der mesotropher Gewässer (BOMBACH, 2005). Das mittlere Phytoplanktonbiovolumen von $3,7 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ im

Epilimnion während der Sommerstagnation 2004 deutet ebenfalls auf mesotrophe Verhältnisse hin. Die errechnete Zooplanktonbiomasse während der Sommerstagnation 2004 von $40 \text{ mg TG} \cdot \text{m}^3$ deutet hingegen auf oligotrophe Verhältnisse (BOMBACH 2005).

Der Werbeliner See zeigte im Untersuchungszeitraum durchweg schwach basische pH-Werte (zwischen 7,5 und 8,5). Eine Versauerungstendenz ist mittelfristig nicht zu erkennen. Ursache ist zum einen das gute Puffervermögen des Seewassers, dass in einer relativ hohen Konzentrationen an gelöstem anorganischen Kohlenstoff (DIC) begründet ist und seinen Ursprung größtenteils im neutralen und gut gepufferten Wasser der Weißen Elster bzw. der Neuen Luppe hat. Zum anderen wird der Kippenbereich des ehemaligen Tagebaurestlochs Delitzsch-SW, bezogen auf die Gesamtflutungswassermenge, nur schwach vom Grundwasser bzw. oberirdischen Zuflüssen durchströmt. In der Regel stellt das in den Tagebaukippen vorhandene Pyrit das größte Versauerungspotential dar. Das Inventar der Kippe Delitzsch-SW an löslichen Pyritoxidationsprodukten wird jedoch als gering eingeschätzt. Der Zufluss von Grundwasser in den Tageausee beträgt nach HAFERKORN et al. (1999) für den Zeitraum der Flutung nur rund 0,4 % und aus oberirdischen sowie Kippenwasserzuflüssen ca. 5,9 % der Fremdfutungswassermenge aus der Neuen Luppe.

Zusammenfassend ergibt sich zur Zeit für den Werbeliner See ein oligo- bis mesotropher Charakter. Vor allem durch die großen Flachwasserbereiche besitzt der See eine gewisse Eutrophierungstendenz, die sich in der Realität bisher nicht widerspiegelt. Bedenkt man den Ursprung des Flutungswassers ist dies um so erstaunlicher. Obwohl ein direkter Zusammenhang zwischen hygienischem Status und Eutrophierung nicht zwingend ist, decken sich diese Befunde mit der geringen Belastung an fäkalen Mikroorganismen im See.

2.3.4 Versuche zur Ermittlung der Stabilität bzw. Inaktivierung von Viren und fäkalen Mikroorganismen im Abwasser

Eine zentrale Frage hinsichtlich der Eignung von Indikatoren ist die Resistenz gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen, mit denen Krankheitserreger und Indikatoren im Gewässer konfrontiert sind. Die Resistenz des Indikators sollte im Idealfall der des Krankheitserregers bzw. der Summe der Krankheitserreger entsprechen. Ist die Resistenz des Indikators geringer, so wird sich mit wachsender Entfernung von der Kontaminationsstelle das Verhältnis

Krankheitserreger / Indikator immer mehr vergrößern. Eine sichere Indikation wird damit erschwert oder ist in Einzelfällen unmöglich.

Ist die Resistenz des Indikators jedoch deutlich höher als die des Krankheitserregers, wird sich mit wachsender Entfernung von der Kontaminationsstelle die Anzahl falsch-positiver Befunde erhöhen. D.h., es wird ein Gefährdungspotential indiziert, obwohl keine Krankheitserreger bzw. Krankheitserreger in tolerierbarer Konzentration vorhanden sind. Wo im ersten Fall das Bedrohungspotential, das von Krankheitserregern wie pathogenen Bakterien oder Viren ausgeht, unterschätzt wird, entstehen im zweiten Fall, vor allem durch unnötiges Schließen von Badestellen, wirtschaftliche Schäden.

Abbildung 14 und Tabelle 12 machen deutlich, dass sich die einzelnen Parameter hinsichtlich ihrer Inaktivierung teilweise unterscheiden, sowohl innerhalb als auch zwischen den Expositionsbedingungen. Die Resultate aus der +Licht-Versuchsanordnung bei Raumtemperatur erlauben folgende Einordnung der Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Resistenz (vom niedrigsten zum höchsten): Enterokokken < *E.coli* < Astroviren < F+RNA Coliphagen < Noroviren < Somatische Coliphagen < *Cl. perfringens* -Sporen. Enterokokken und *E.coli* wurden dabei signifikant schneller inaktiviert als alle anderen Parameter (Abbildung 18a).

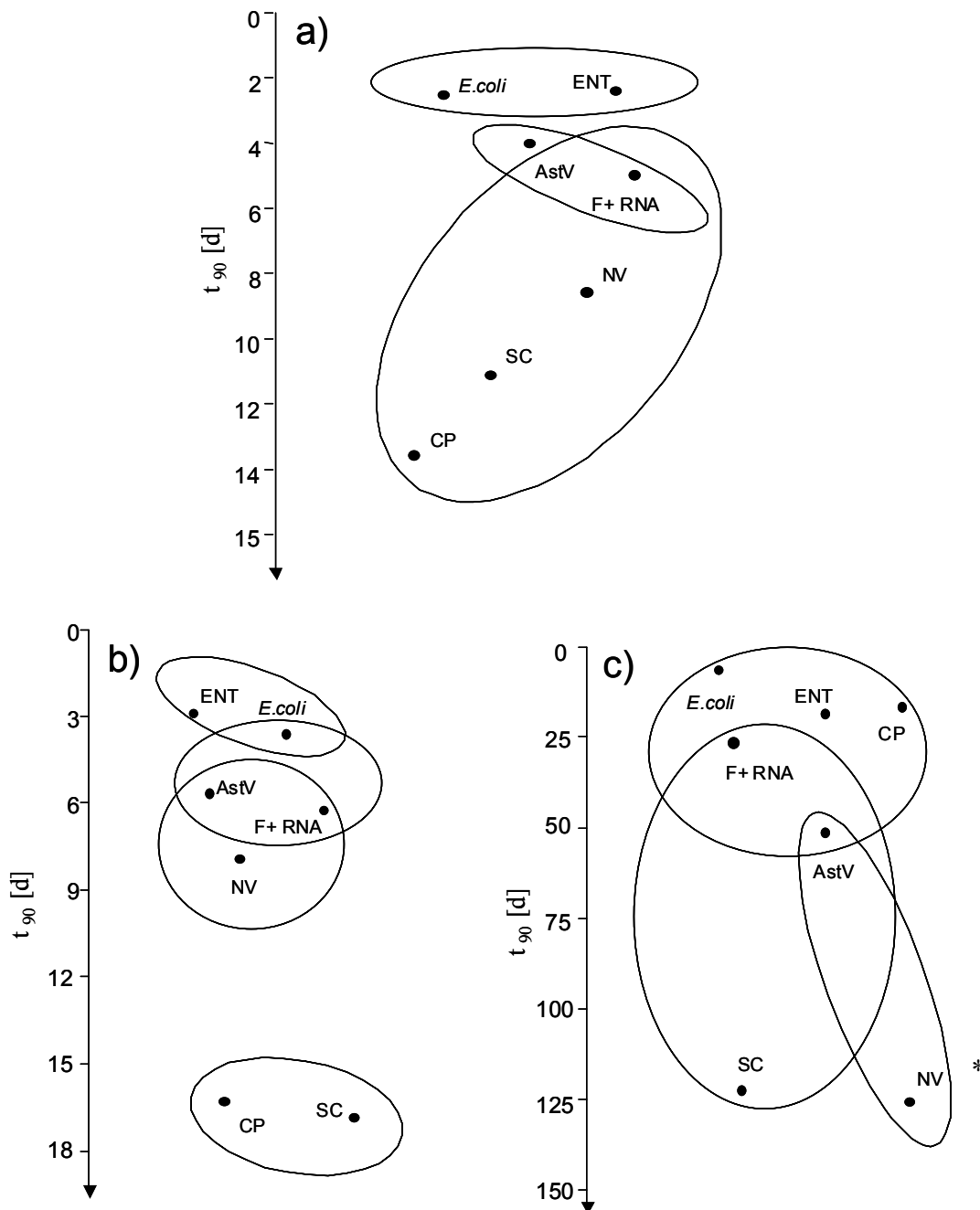


Abbildung 18: Gruppierung der Indikatorbakterien, Bakteriophagen und enteralen Viren (real-time-PCR) in den Inaktivierungsversuchen nach statistischem Vergleich der Regressionskoeffizienten, (a) mit Licht, (b) ohne Licht (beide bei Zimmertemperatur) und (c) ohne Licht und bei 6 °C. Die Anordnung der Punkte entlang der y-Achse entspricht der ermittelten t_{90} . Die horizontale Anordnung der Punkte ist entsprechend einer günstigen Darstellbarkeit frei gewählt. Eine Ellipse umfasst Mikroorganismen, die sich nach dem 5 % Signifikanzniveau nicht unterscheiden. ENT = Enterokokken, SC = Somatische Coliphagen, F+ RNA = F+ RNA Coliphagen, CP = *Clostridium perfringens*-Sporen, AstV = Astroviren, NV = Noroviren. * Der Anstieg der Regressionskurve für Noroviren ist positiv, es ließ sich daher keine t_{90} berechnen; die Zusammenfassung von Astroviren und Noroviren als Gruppe besteht statistisch (Vergleich von Regressionskoeffizienten) dennoch.

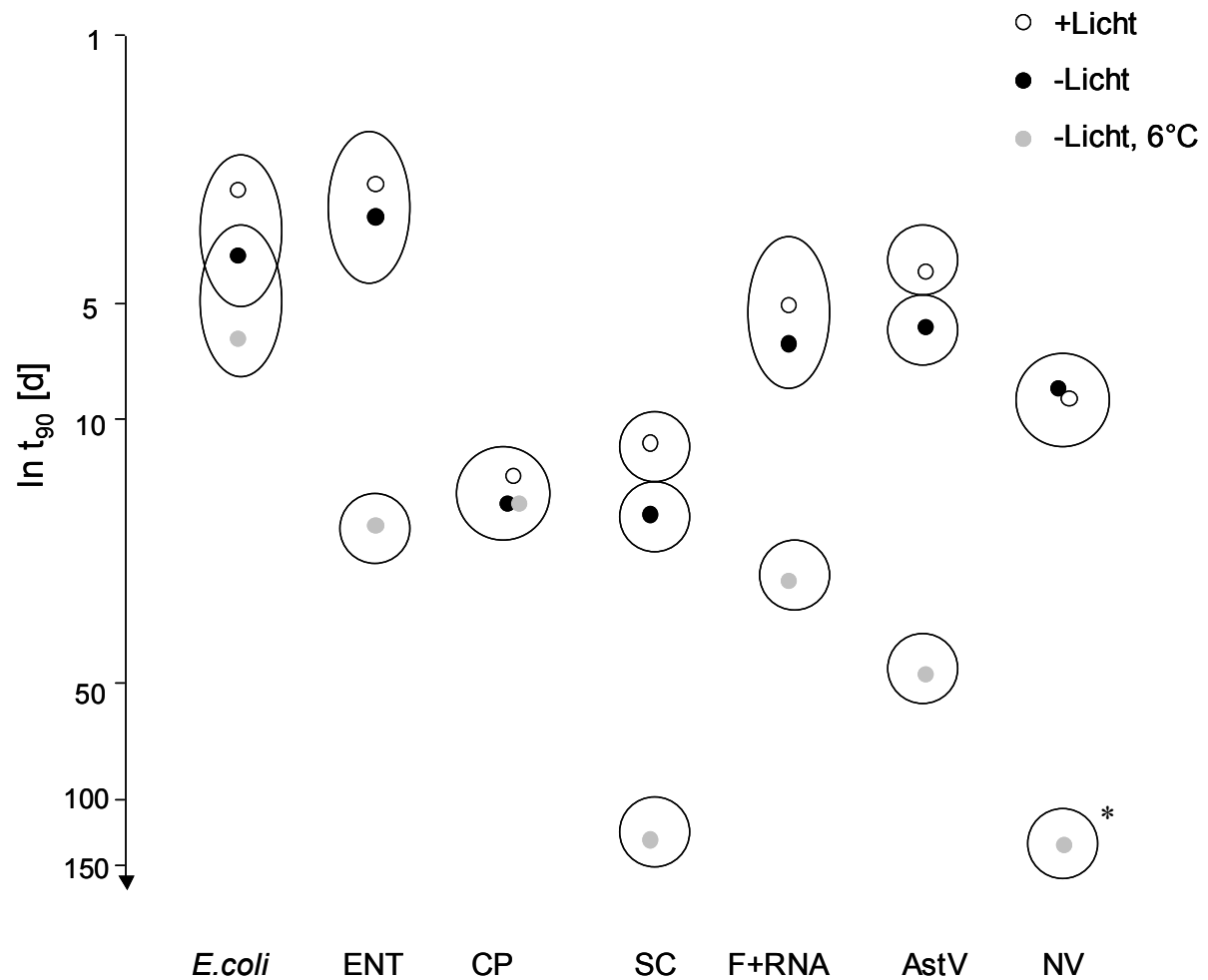


Abbildung 19: Vergleich der Regressionskoeffizienten der untersuchten Indikatoren, Bakteriophagen und enteraler Viren (real-time-PCR) zwischen den verschiedenen Expositionsbedingungen. Eine Ellipse umfasst ein oder mehrere Expositionsbedingungen, die sich nach dem 5 % Signifikanzniveau nicht unterscheiden. ENT = Enterokokken, SC = Somatische Coliphagen, F+ RNA = F+ RNA Coliphagen, CP = *Clostridium perfringens*-Sporen, AstV = Astroviren, NV = Noroviren. * Der Anstieg der Regressionskurve für Noroviren ist positiv, es ließ sich daher keine t_{90} berechnen; der Unterschied zwischen –Licht-Versuchsanordnung bei 6 °C und den anderen Expositionsbedingungen besteht für Noroviren statistisch (Vergleich von Regressionskoeffizienten) dennoch.

In der -Licht-Versuchsanordnung bei Raumtemperatur besaßen wiederum die Enterokokken die geringste Resistenz, gefolgt von *E.coli* < Astroviren < F+RNA Coliphagen < Noroviren < *Cl. perfringens*-Sporen < Somatische Coliphagen. Somatische Coliphagen, *Cl. perfringens*-Sporen, Noroviren und Astroviren waren signifikant resistenter als *E.coli* und Enterokokken, wohingegen die Regressionskoeffizienten von F+ RNA Coliphagen und *E.coli* sich statistisch nicht unterscheiden (Abbildung 18b).

Abgesehen von *Cl.perfringens*-Sporen wurden bei der –Licht-Versuchsanordnung bei 6 °C alle Parameter langsamer inaktiviert. Für Noroviren ließ sich im Grunde keine Inaktivierung feststellen (der Begriff „Inaktivierung“ dürfte für die molekularbiologisch nachgewiesenen Noroviren und Astroviren eigentlich nicht verwendet werden, bezieht sich hier im Kontext mit den anderen Mikroorganismen jedoch auf den Rückgang nachgewiesener Viruspartikel, bezogen auf die t_0 -Probe). Der Anstieg der Regressionskurve war positiv (siehe Tabelle 12). Daher ließ sich für Noroviren unter dieser Expositionsbedingung kein t_{90} -Wert berechnen. Auch der Zusammenhang zwischen Konzentration von Astroviren und der Zeit ist eigentlich nicht vorhanden ($R^2 = 0,08!$). Die gefundenen Genomkonzentrationen beider Virusgruppen blieben folglich über die Versuchsdauer relativ stabil. Die Resultate aus der -Licht-Versuchsanordnung bei 6 °C lassen hinsichtlich der Resistenz folgende Einordnung der Mikroorganismen zu: *E.coli* < *Cl.perfringens*-Sporen < Enterokokken < F+RNA Coliphagen < Astroviren < Somatische Coliphagen < Noroviren. Dabei wurden Somatische Coliphagen und Noroviren signifikant langsamer inaktiviert als *E.coli*, Enterokokken und *Cl. perfringens*-Sporen (Abbildung 18c).

Der Einfluss von Licht und Temperatur auf die Inaktivierung der einzelnen Mikroorganismen ist in Abbildung 19 dargestellt. Obwohl ein Trend hinsichtlich höherer Inaktivierungsraten bei Exposition unter Licht bei fast allen Mikroorganismen erkennbar war, konnte ein signifikanter Zusammenhang nur bei Somatischen Coliphagen und Astroviren gefunden werden. Am größten ist der Unterschied der errechneten t_{90} zwischen +Licht und –Licht-Versuchsanordnung bei Somatischen Coliphagen (Faktor 1,9). Zudem existierte, abgesehen von *Cl. perfringens*-Sporen und *E.coli*, bei allen untersuchten Parametern ein signifikanter Einfluss der Temperatur auf die Reduktion. Die Temperaturdifferenz von ca. 10 °C äußerte sich in deutlich höheren t_{90} -Werten in der –Licht-Versuchsanordnung bei 6 °C im Vergleich zur –Licht-Versuchsanordnung bei Raumtemperatur.

Im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ergaben sich zahlreiche Übereinstimmungen. Die Ergebnisse legen bedeutsame Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Mikroorganismen gegenüber einer Inaktivierung durch verschiedene Faktoren nahe. *E.coli* und Enterokokken sind, verglichen mit Bakteriophagen und Viren, deutlich sensibler gegenüber einer Inaktivierung (DURÁN et al., 2002, SINTON et al., 2002). *Cl. perfringens*-Sporen, Somatische Coliphagen und Genome von Noroviren waren unter allen drei Expositionsbedingungen signifikant resistenter als *E.coli* und Enterokokken. Die hohe Stabilität von Noroviren wird auch von PUSCH et al. (2005) beschrieben. In Norovirus-positiven Stuhlproben die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, veränderte sich die Konzentration gefundener Noroviren über einen Zeitraum von 64 Tagen nicht signifikant. Ob diese hohe Widerstandsfähigkeit der Noroviren mit einer Stabilität der Infektiosität einhergeht, kann auf Grund fehlender zellkultureller Nachweisverfahren nicht beantwortet werden.

Der Versuch, die Inaktivierung infektiöser Enteroviren der Konzentration molekularbiologisch detektierter Enteroviren gegenüberzustellen, misslang, da sowohl die quantitative real-time-PCR für Enteroviren keine Ergebnisse brachte (mögliche Ursachen wurden Kapitel 2.3.1.3 diskutiert) als auch die gefundenen Konzentrationen infektiöser Enteroviren im MPN-Ansatz auf BGM-Zellen an der Nachweisgrenze lagen.

Die Resistenz der *Cl. perfringens*-Sporen war, abgesehen von der –Licht-Versuchsanordnung bei 6 °C, von allen bakteriellen Indikatoren erwartungsgemäß am höchsten. Gerade ihr langes Überleben und ihre hohe Resistenz in Böden und Sedimenten (FEACHEM et al., 1983, JAGALS, 2000) sind für ihre Eignung als Indikatoren in Oberflächenwasser jedoch hinderlich, da die Konzentration durch Ausspülung nach Niederschlagsereignissen stark beeinflusst wird und damit möglicherweise falsch-*positive* Befunde generiert werden (LUCENA et al., 2003).

Vergleicht man die Resistenz der bakteriellen Indikatoren und der Bakteriophagen, die in diesem Versuch ermittelt wurden, mit der Resistenz, die aus der unterschiedlichen Reduktion innerhalb der Kläranlage Leipzig-Rosental resultiert (Abbildung 15), ergibt sich ein ähnliches Bild. Obwohl sich die Faktoren, welche die Inaktivierung beeinflussen, zwischen Kläranlage und dieser Versuchsanordnung unterscheiden, wurden *E.coli* und Enterokokken durch die Kläranlage signifikant stärker eliminiert als Bakteriophagen und *Cl.perfringens*-Sporen.

Zwar gelten Enterokokken im Allgemeinen als resistenter im Vergleich zu *E.coli*, jedoch unterscheiden sich die ermittelten t_{90} -Werte in allen drei Expositionsbedingungen für diese beiden Indikatormikroorganismen nicht signifikant.

Die in diesen Versuchen gefundenen Ergebnisse decken sich z.T. mit den Resultaten anderer Autoren (siehe z.B. DURÁN et al., 2002). ARAUJO et al. (1997) fanden hingegen eine deutlich höhere Resistenz von F+ RNA Coliphagen gegenüber Somatischen Coliphagen. Auch der Einfluss des Lichtes und der Temperatur auf die verschiedenen fäkalen Mikroorganismen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. DIZER et al. (2005) fanden in Versuchen in zwei parallelen Fließgewässersimulationsanlagen, bei denen sich eine Anlage als Schutz vor Sonneneinstrahlung abdecken ließ, eine höhere Inaktivierung von *E.coli*, Enterokokken und Bakteriophagen in mit Rohabwasser einer Kläranlage kontaminiertem Wasser in der lichtexponierten Anlage, wobei die Inaktivierung bei Somatischen und F+ RNA Coliphagen deutlich höher ausfiel. Dagegen konnten SINTON et al. (2002), die mit großem Aufwand und unter Berücksichtigung zahlreicher Faktoren den Einfluss von Sonnenlicht auf fäkale Indikatorbakterien und Bakteriophagen untersucht haben, für *E.coli* und Enterokokken eine höhere Sensibilität gegenüber natürlicher Sonneneinstrahlung nachweisen als für F+ RNA Coliphagen und Somatischen Coliphagen. DURÁN et al. (2002) fanden in einem ähnlichen experimentellen Ansatz mit Dialyseschläuchen wie in dieser Arbeit im spanischen Fluss Ter in „Winter-“ und „Sommerexperimenten“ einen im Vergleich zu anderen fäkalen Bakterien und Bakteriophagen unerwartet starken Rückgang der Resistenz von F+ RNA Coliphagen in den Sommerexperimenten. Obwohl alle anderen untersuchten Mikroorganismen im Sommer ebenfalls stärker eliminiert wurden, fiel der Rückgang der ermittelten t_{90} -Werte deutlich niedriger aus.

Die hier vorgestellten Resultate können nur bedingt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten verglichen werden. Die verschiedenen Wellenlängen und die Intensität natürlicher Sonneneinstrahlung sind keinesfalls identisch mit dem hier vorgestellten „+Licht-Expositionsansatz“. Die ökologischen Zusammenhänge in den Dialyseschläuchen unterscheiden sich bezüglich Struktur und Komplexität des Nahrungsnetzes weitreichend von denen in Fließgewässern oder Abwasserteichen. Unterschiede in „Winter-“ und „Sommerexperimenten“ können auf Grund zahlreicher Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Sonneneinstrahlung und verschiedener biotischer Faktoren zustande kommen. Der Beitrag der einzelnen Faktoren zum Inaktivierungsprozess konnte anhand des gewählten experimentellen Ansatzes nicht herausgestellt werden.

2.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Aus hygienischer Sicht wird die Beschaffenheit von Oberflächengewässern vor allem durch pathogene Mikroorganismen beeinflusst. Die Quellen sind kommunales und landwirtschaftliches Abwasser sowie im Badebetrieb die durch infizierte Badende selbst verursachten Einträge. Die Krankheitserreger sind neben Bakterien und Parasiten insbesondere humanpathogene enterale Viren. Es gibt Hinweise, dass das zur Überwachung von Bade- und Trinkwasser etablierte Indikatorsystem, welches vorrangig auf bakteriellen Indikatoren wie *E.coli* und Intestinalen Enterokokken basiert, hinsichtlich der Überwachung einer Kontamination mit fäkalen Viren nur unzureichend funktioniert. Der Grund ist die generell angenommene höhere Resistenz von Viren im Vergleich zu bakteriellen Indikatororganismen, die eine zuverlässige Indikation der viralen Belastung eines Gewässers in Einzelfällen nicht möglich macht. Es besteht auf der einen Seite die Möglichkeit, einzelne bekannte virale Krankheitserreger direkt in das Gewässermonitoring zu integrieren. Allerdings ist man gegenwärtig nicht in der Lage, das gesamte Spektrum humanpathogener Viren zellkulturell (und damit ihre Infektiosität) nachzuweisen. Jedoch existieren für nahezu alle bekannten enteralen Viren molekularbiologische Nachweisverfahren. Alternativ bietet es sich an, dass vorhandene Indikatorsystem um geeignete Indikatoren für eine virale Kontamination zu erweitern. In diesem Sinne sind Bakteriophagen seit längerer Zeit im Gespräch.

Das dieser Arbeit zu Grunde liegende Untersuchungsgebiet, das System aus Tagebausee Delitzsch-SW, sowie dessen Flutungswasser aus der Neuen Luppe, das anteilig mit geklärtem Abwasser aus der Kläranlage Leipzig-Rosental kontaminiert ist, stellte sich mit Abstrichen als gute Wahl für die in der Zielstellung aufgelisteten Fragestellungen heraus. In diesem Sinne konnten Aussagen über die bakterielle und virale Reinigungsleistung der Kläranlage Leipzig-Rosental, über den Verbleib pathogener Mikroorganismen während der Fließstrecke in der Neuen Luppe und in der Fernleitung, sowie über die hygienische Situation im Werbeliner See getroffen werden. Die Untersuchungen zur Stabilität von bakteriellen Indikatoren, Bakteriophagen und einigen enteralen Viren in kontaminiertem Seewasser, die im Labormaßstab durchgeführt wurden, dienten dem Vergleich von Resistenzeigenschaften und lieferten aussagekräftige Ergebnisse in der Gegenüberstellung etablierter bakterieller Indikatoren mit Bakteriophagen und Viren.

Die Kläranlage Leipzig-Rosental eliminierte sehr effizient fäkale Bakterien und Bakteriophagen (ca. zwei Größenordnungen), wobei die Reduktion von *E.coli* und Enterokokken signifikant höher war als die von *Cl.perfringens*-Sporen und Bakteriophagen. Die Reinigungsleistung wird durch den Einsatz von chemischen Fällmitteln (Eisen-(III)-Chlorid / -Sulfat-Salze) begünstigt. Alle untersuchten Viren konnten in Zu- und Ablauf der Kläranlage molekularbiologisch nachgewiesen werden. Das betrifft insbesondere Entero-, Noro-, Astro- und Adenoviren. Ein direkter Vergleich der Präsenz enteraler Viren zwischen Zu- und Ablauf der Kläranlage konnte nicht vorgenommen werden, da dem PCR-Nachweis unterschiedliche Volumina Originalwassers zu Grunde lagen. Jedoch konnten an beiden Probenahmestellen starke saisonale Unterschiede aufgedeckt werden, mit Spitzen im Spätsommer, Herbst und Winter und mit deutlich niedrigeren Anteilen molekularbiologisch positiver Proben im Frühjahr und zeitigen Sommer. Diese Abhängigkeit von der Jahreszeit war ebenfalls an den anderen auf enterale Viren untersuchten Probenahmestellen am Ende der Fernleitung (P) und am Ostufer des Werbeliner Sees (W4) zu beobachten.

Auf molekularer Ebene wurden Noro-, Astro- und Enteroviren, für die quantitative Untersuchungen im Zu- und Ablauf der Kläranlage gemacht worden, um ein bis zwei Größenordnungen reduziert. Auf Grund der sehr hohen Streuung der Ergebnisse fehlt zwar die statistisch signifikante Absicherung, im Zusammenhang mit der Reduktion von Bakteriophagen ist die genannte Höhe der Reduktion jedoch plausibel.

Die Elimination von fäkalen Mikroorganismen während der Fließstrecke in der Neuen Luppe sowie in der Fernleitung zum Werbeliner See war sehr gering. Einen nennenswerten Einfluss auf die Wasserqualität der Neuen Luppe hatte die mikrobiell gering belastete Nahle, die in die Neue Luppe mündet und wesentlich zur Verbesserung der Qualität des Flutungswassers beitrug. Im Flutungswasser konnten abgesehen von Adenoviren auf molekularer Ebene alle untersuchten Virentypen mittels nested-RT-PCR nachgewiesen werden. Dabei konnte jedoch eine Hemmung der PCR durch nicht näher untersuchte Inhibitoren eindeutig belegt werden. Auch das in der PCR verwendete Primersystem hatte maßgeblichen Einfluss auf den Anteil positiver Resultate. Infektiöse Enteroviren wurden in 22,2 % der Proben am Ende der Fernleitung gefunden.

Die theoretische Verdünnung des Flutungswassers im Werbeliner See lag im Untersuchungszeitraum zwischen 1:1.000 und 1:10.000. Dies spiegelt sich in den gefundenen Konzentrationen an bakteriellen Indikatoren und Bakteriophagen wider. Von der

Einleitungsstelle im See abgesehen, ergaben sich für die Probenahmestellen W2, W3 und W4 nach Probenahmehäufigkeit gewichtet im Mittel für *E.coli* $51 \text{ MPN} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$, für Enterokokken $10 \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ und für *Cl. perfringens*-Sporen $4,7 \text{ MPN} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$. Die Vorgaben der EU-Badegewässerrichtlinie (76/160/EWG) von $2000 \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ (*E.coli*, Grenzwert) bzw. $100 \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ (Enterokokken, Leitwert) wurden damit, auch bezogen auf die einzelnen Probenahmetage, deutlich unterschritten. Bakteriophagen konnten im See nur in sehr wenigen Proben gefunden werden. Auch die positiven Ergebnisse lagen nahe der Nachweisgrenze von $0,1 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Im Kontrast dazu konnte DNA bzw. RNA aller untersuchten Viren im See gefunden werden. Der Einfluss PCR-hemmender Substanzen konnten auch hier nachgewiesen werden. Die genomische Viruslast der mittels real-time-PCR detektierten Entero-, Noro- und Astroviren lag zwischen 0 und $10^5 \text{ Gen.äquiv.} \cdot \text{l}^{-1}$. Dieser zunächst alarmierende Befund ist jedoch mit großer Vorsicht zu interpretieren, da kein direkter Zusammenhang zwischen dem molekularbiologischen Nachweis einer Virusnukleinsäure und deren Infektiosität besteht. Dies ist auch in der Literatur gut belegt. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die detektierten viralen Nukleinsäuren zumindest noch von ihrem Viruscapsid umgeben und geschützt worden sind. Ohne dieses Viruscapsid wird die viralen Nukleinsäuren sehr schnell von freien RNasen und DNasen abgebaut.. Zwar ist eine capsidumhüllte Virusnukleinsäure noch kein infektiöses Viruspartikel, jedoch kann von einem gewissen Infektionspotential ausgegangen werden. Der Nachweis infektiöser Enteroviren auf BGM-Zellen im Werbeliner See ergab ein einzelnes positives Ergebnis im Untersuchungszeitraum (= 1,2 %). Allerdings lag die Konzentration detektierter Enteroviren-Genome in der real-time-PCR im Mittel drei bis vier Größenordnungen unter der Konzentration von Noro- und Astroviren. Es kann deshalb spekuliert werden, dass für diese Viren ebenfalls ein hoher Anteil infektiöser Proben zu erwarten gewesen wäre.

Die limnologischen Untersuchungen am Werbeliner See ergaben einen mesotrophen Gesamtcharakter mit niedriger Phosphor- und Chl-a-Konzentration, der, in Anbetracht der Herkunft des Flutungswassers, nicht zu erwarten war. Der See wies ganzjährig stabile pH-Werte im schwach alkalischen Bereich zwischen 7,5 und 8,5 auf. Die Sichttiefe lag im Mittel bei ca. 5 m (Max. 10 m). Insgesamt konnte ein sehr großes Artenspektrum von Phyto- und Zooplanktern gefunden werden. Die dominierenden Phytoplankter waren je nach Jahreszeit centrale und pennate Kieselalgen, *Rhodomonas*, *Ochromonas*, *Dinobryon divergens* und *Ceratium hirundinella*. Die Zooplanktonstruktur wurde von calanoiden und cyclopoiden

Copepoden, Cladoceren, verschiedenen Rotatoren und teilweise von Larven der Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha* dominiert.

In Untersuchungen zur Stabilität bzw. Inaktivierung fäkaler Bakterien, Bakteriophagen und Viren in Abwasser konnte unter verschiedenen Expositionsbedingungen teilweise eine höhere Resistenz von Bakteriophagen, Viren und *Cl. perfringens*-Sporen im Vergleich zu den klassischen bakteriellen Indikatoren für die Beschaffenheit von Trink- u. Badewasser, *E.coli* und Enterokokken, gezeigt werden. *E.coli* und Enterokokken wurden unter allen Versuchsbedingungen signifikant schneller inaktiviert als Somatische Coliphagen und Noroviren. Gleiches galt im Vergleich zu *Cl. perfringens*-Sporen, Astroviren und F+ RNA Coliphagen, obwohl unter statistischen Gesichtspunkten für einige Versuchsbedingungen keine Signifikanz aufgedeckt werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden aus der Kläranlage Leipzig-Rosental, in der die Reduktion von *E.coli* und Enterokokken signifikant höher war als von *Cl. perfringens*-Sporen und Somatischen- und F+ RNA Coliphagen.

Im Sinne der Aufgabenstellung sollen im folgenden verschiedene Punkte zusammengefasst werden, die auf Grund der hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse für oder gegen die Verwendung von Bakteriophagen als Indikatoren für die virale Belastung von Gewässern sprechen:

Dafür spricht zum Einen die generell höhere Resistenz insbesondere von Somatischen Coliphagen gegenüber Inaktivierung im wässrigen Milieu im Vergleich zu *E.coli* und Enterokokken. Dies könnte langfristig mehr Sicherheit für die Indikation einer viralen Kontamination geben als durch die klassischen bakteriellen Indikatoren. Somatische- und F+ RNA Coliphagen waren zudem immer im Zu- und Ablauf der Kläranlage nachweisbar, d.h., die untersuchten Bakteriophagen sind mit der Hauptquelle enteraler Viren assoziiert. Dieser Befund ist zwar alles andere als unerwartet, er ist jedoch ein wichtiges Kriterium für eine generelle Eignung der Bakteriophagen als Indikatororganismen. Weiterhin spiegelte sich der geringe Nachweis von infektiösen Enteroviren im Werbeliner See (eine positive Probe = 1,2 %) in der sehr niedrigen Konzentration an Bakteriophagen wider. 81 % bzw. 92 % der Seeproben (außer W1) lagen unterhalb der Nachweisgrenze von $0,1 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ für Somatische- bzw. F+ RNA Coliphagen. Allerdings ging der positive Befund infektiöser Enteroviren nicht mit einer erhöhten Bakteriophagenkonzentration einher (Somatische- als auch F+ RNA Coliphagen $< 0,1 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Dagegen spricht die sehr hohe Viruslast sowohl im Zu- als auch im Ablauf der Kläranlage Leipzig-Rosental, die möglicherweise die Konzentration an Bakteriophagen übersteigt. Ein wichtiger Anspruch an einen geeigneten Indikator ist der, dass der Indikator in gleicher oder höherer Konzentration auftritt als der Krankheitserreger, den er anzeigt. Die Konzentration an Bakteriophagen im Ablauf der Kläranlage war jedoch teilweise zwei bis drei Größenordnungen niedriger als die Konzentration an Genomen von Entero-, Noro- und Astroviren. Erweitert man den Indikationsgedanken für Bakteriophagen von Enteroviren auf alle enteralen Viren und betrachtet die Konzentrationen von Entero-, Noro- und Astroviren und möglicher anderer Viren in der Summe, erhöht sich diese Diskrepanz noch um Größenordnungen. Möglicherweise trifft das Indikatorkonzept angesichts extrem hoher Viruskonzentrationen im Stuhl infizierter Personen und damit auch im Zulauf der Kläranlagen hier auf seine Grenzen. Allerdings muss wiederum darauf verwiesen werden, dass der Nachweis enteraler Viren auf molekularer Ebene nicht einem Nachweis infektiöser Partikel gleichkommt.

Weiterhin divergieren die ermittelten Konzentrationen an Bakteriophagen in der Kläranlage mit Angaben in der Literatur für Kläranlagen gleicher Größenordnung und gleichem Verfahren, d.h. mit Belebungsbecken und chemischer Phosphatfällung. Sowohl Somatische- als auch F+ RNA Coliphagen wurden in dieser Arbeit um ein bis zwei Größenordnungen niedriger quantifiziert, als im Vergleich zu Literaturangaben. Die Ursache konnte bisher nicht geklärt werden. Der Nachweis von Bakteriophagen erfolgte streng nach den Vorgaben der DIN EN ISO 10705-1 bzw. DIN EN ISO 10705-2.

Der Vergleich der Bakteriophagenkonzentration mit dem Nachweis infektiöser Enteroviren am Ende der Fernleitung lässt ebenfalls berechtigte Zweifel an der Eignung von Bakteriophagen als Indikator für eine Belastung des Wassers mit Enteroviren zu. So konnten im Flutungswasser des Werbeliner Sees keine signifikanten Unterschiede in der Bakteriophagenkonzentration zwischen den Proben mit positivem bzw. negativem Enteroviren-Nachweis auf Zellkultur gefunden werden. Bei einem angenommenen Grenzwert für Bakteriophagen von $0,5 \text{ PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ergab sich im Flutungswasser zudem ein Anteil von 17,6 % bzw. 23,5 % falsch-*negativer* Indikation hinsichtlich der Präsenz von infektiösen Enteroviren durch Somatische- und F+ RNA Coliphagen. Der Anteil falsch-*positiver* Ergebnisse war sogar noch höher und lag bei 72,3 % bzw. 69,4 %. Eine Veränderung dieses Grenzwertes nach oben sowie nach unten würde nur den Anteil falsch-*positiver* zugunsten falsch-*negativer* Ergebnisse bzw. andersherum verschieben. Eine exklusive Indikation von

Bakteriophagen bezüglich einer Kontamination mit Enteroviren scheint anhand dieser Befunde nicht möglich.

Dies ist durchaus plausibel, wenn man bedenkt, dass Bakteriophagen durch einen gewissen Anteil der Bevölkerung mehr oder weniger immer ausgeschieden werden, wohingegen das für Viren i.d.R. nur durch infizierte Personen und für eine kurze Zeitspanne geschieht. Eine Verwendung von Bakteriophagen als Indikatoren für einen weiter gefassten Bereich enteraler Viren könnte diese Diskrepanz durch das epidemiologisch häufigere Auftreten fäkaler Viren als Summe abschwächen.

Als Fazit können Bakteriophagen daher nicht als ideale Indikatoren für eine virale Kontamination in Gewässern betrachtet werden. Dies wird z.B. auch durch den Nachweis enteraler Viren in aufbereitetem Trinkwasser unterstrichen, in dem selbst in 500 ml Probenwasser keine Bakteriophagen gefunden werden konnten (GRABOW et al., 2000b). Eine sichere Indikation scheint daher nicht möglich. Die „ideale“ Indikation bieten bisher nur die Pathogenen selbst.

Grundsätzlich sollte niemals von einem „Null-Prozent Risiko“ ausgegangen werden. Ein negativer Indikatorbefund von *E.coli* und Enterokokken in einer Wasserprobe gibt keine absolute Sicherheit und sollte deshalb, insbesondere in Zusammenhang mit enteralen Viren, kritisch bewertet werden. Auch unter Einbeziehung von Bakteriophagen in das Spektrum geeigneter Indikatoren wird es zukünftig immer ein Restrisiko geben. Bakteriophagen könnten jedoch, insbesondere auf Grund ihrer höheren Resistenz im Vergleich zu den etablierten Indikatormikroorganismen, eine wichtige Schlüsselfunktion für eine zuverlässigere Indikation der hygienischen Wasserqualität spielen.

Weitere Forschung ist notwendig, vor allem hinsichtlich des Nachweises infektiöser bisher nicht oder schwer kultivierbarer enteraler Viren, wie z.B. Noro-, Rota- oder Hepatitis A-Viren. Eine erfolgreiche und zuverlässige Kultivierung eines größeren Spektrums infektiöser enteraler Viren könnte, auch im Kontext mit dem Indikatorwert von Bakteriophagen, eine Art Initialzündung in der Erforschung hygienisch relevanter Fragestellungen sein.

Langfristig könnten ebenfalls molekulare, quantitative Nachweisverfahren eine gewichtige Rolle spielen. Der Nachweis viraler Nukleinsäuren ist als Indikation für eine Kontamination äußerst wertvoll. Obwohl zunächst nicht unbedingt auf die Infektiosität geschlossen werden

kann, lässt die Tatsache, dass die (mindestens!) capsidumhüllte Nukleinsäure von der Quelle der Kontamination bis zum Ort der Detektion mehr oder weniger intakt vorgedrungen ist, auf eine gewisses Gefährdungspotential schließen. Fragen, die sich daran anknüpfen, vor allem bezüglich der Praktikabilität und der Durchführbarkeit solcher Untersuchungen im Rahmen eines konsequenten Gewässermonitorings, die Rolle von inhibierenden Substanzen, die sich von Gewässerprobe zu Gewässerprobe unterscheiden wird und die Frage nach plausibel begründbaren Grenzwerten für fäkal-virale Nukleinsäuren müssen in Zukunft beantwortet werden.

3 Literaturverzeichnis

- Anonymus (1996): „Limnologisches Gutachten für die Tagebaue Delitzsch-SW und Breitenfeld“, UFZ, Sektion Gewässerforschung Magdeburg, September.1996
- Anonymus (1998a): Hygieneanforderungen an künstliche Bioteiche, die als Badegewässer benutzt werden, Archiv des Badewesens 51: 430-433
- Anonymus (1998b): Ergebnisbericht „Prognose der Grundwasserbeschaffenheit auf dem Fließweg zwischen den TB-Restloch Delitzsch-SW und dem TB-Restloch Breitenfeld“, Boden- und Grundwasserlabor GmbH Dresden, März 1998
- Anonymus (2002): „Mikrobiologische Wasseruntersuchungen in den Restseen Delitzsch und Zwochau“, Boden- und Grundwasserlabor GmbH Dresden, April 2002
- Anonymus (2004a): Verordnung über die Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer, Stand 17. Juni 2004
- Anonymus (2004b): Epidemiologisches Bulletin – Aktuelle Daten zu Infektionskrankheiten und Public Health vom 10. Dezember 2004 / Nr. 50, Hrsg.: Robert-Koch-Institut, Berlin
- Araujo, R.M, Puig, A., Lasobras, J., Lucena, F., Jofre, J. (1997): Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution, Journal of Applied Microbiology 82: 83:80
- Ashbolt, N.J., Grohmann, G.S., Kueh, C. (1993): Significance of specific bacterial pathogens in the assessment of polluted receiving waters of Sidney. Water Sci. Technol. 27: 449-452
- Bhattacharya, S.S., Kulka, M., Lampel, K.A., Cebula, Th.A., Goswami, B.B. (2004): Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious Hepatitis A-Virus, J. of Virological Methods 116:181-187
- Block, J.C. (1983): Viruses in environmetal waters. In Berg, G. (Hrsg.) “Viral Pollution of the Environment” S.117-146. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Bombach, P. (2004): Limnologische Untersuchung des sich in Flutung befindlichen Werbeliner Tagebaurestsees unter Berücksichtigung einer zukünftigen Badegewässernutzung. Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
- Borneff, J. (1982): Hygiene. 4.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Bosch, A. (1998): Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internatl. Microbiol. 1: 191-196
- Brunßen, C. (2005): Nachweis von Gastroenteritisviren in Wasserkonzentraten durch Kombination molekularbiologischer und zellkultureller Verfahren. Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
- Davies, C.M., Long, J.A.H., Donald, M., Ashbolt, N.J. (1995): Survival of Fecal Microorganisms in Marine and Freshwater Sediments. Applied Environmental Microbiology 61: 1888-1896
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W. (1999): Inactivation of faecal indicator microorganisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight, Wat. Res. 33: 1220-1230
- Deetz, T.R., Smith, E.R., Goyal, S.M., Gerba, C.P., Vallet, J.V., Tsai, H.L., Dupont, H.L., Heswick, B.H. (1984): Occurrence of rota and enteroviruses in drinking and environmental waters in a developing nation. Water Research 18: 572-577
- Deleon, R., Shich, C., Baric, R.S., Sobsey, M.D. (1990): Detection of enteroviruses and Hepatitis A-Virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction, aus: Proceedings of the 1990 Water Quality Technology Conference. San Diego, CA, Am. Water Works Assoc. 833-853

- Dhillon, T.S., Dhillon, E.K.S., Chan, H.C., Li, W.K., Tsang, A.H.C. (1976): Studies on bacteriophage distribution: virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 68-74
- Dhillon, T.S., Dhillon, E.K.S. (1972) : Studies on bacteriophage distribution. II. Isolation and host range based classification of phages active on three species of Enterobacteriaceae. *Japanese Journal of Microbiology* 16: 297-306
- Dizer, H., Wolf, S., Fischer, M., López-Pila, J.M., Röske, I., Schmidt, R. Szewzyk, R., Wiedenmann, A. (2005): Die Novelle der EU-Badegewässerrichtlinie – Aspekte der Risikobewertung bei der Grenzwertsetzung, *Bundesgesundheitsblatt* 48: 607-614
- D'Souza, D.H., Jean, J., Jaykus, L.A. (2000) : Methods for the Detection of Viral and Parasitic Protozoan Pathogens in Foods. In (DL Marshall, ed) *Handbook of Food Technology and Engineering*, Volume 4: 188.1-188.23
- Dubrou, S., Kopecka, H., Lopez-Pila, J.M., Marechal, J., Prevot, J. (1991): Detection of Hepatitis A-Virus and other enteroviruses in wastewater and surface water samples by gene probe assay, *Water Science Technology* 24: 267-272
- Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J. (2002): Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh water, *J. Appl. Microbiol.* 92:338-347
- Farrah, S.R. (2000): Abwasser. In: Walter, R. (Hrsg.): *Umweltvirologie – Viren in Wasser und Boden*, S. 119-146, Springer-Verlag/Wien
- Feachem, R.G., Bradkey, F.J., Garelick, H., Mara, D.D. (1983): *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. New York: John Wiley
- Fleischer, J., Schlafmann, K., Otchwemah, R., Botzenhart, K. (2000): Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F-specific coliphages, somatic coliphages and E.coli in four sewage treatment plants of southern Germany, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 49.3: 127- 138
- Flewett, T.H. (1983): Rotavirus in the home and hospital nursery, *British Medical Journal* 287: 568-569

- Fout, G.S., Martinson, B.C., Moyer, M.W., Dahling, D.R. (2003): A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater, *Appl. Environ Microbiol.* 69:3158-3164
- Gerba, C.P., Wallis, C., Melnick, J.L. (1975): Viruses in water: the problem, some solutions. *Environm. Sci. Technol.* 9: 1122-1126
- Giordano, M.O., Ferreyra, L.J., Isa, M.B., Martinez, L.C., Yudowsky, S.I., Nates, S.V. (2001): The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 43: 193-197
- Grabow, W.O.K. (1986): Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water, *Water Sci. Technol.* 18: 159-165
- Grabow, W.O.K. (1995): Humanpathogene Viren und ihr Verhalten bei der Wassergewinnung und Aufbereitung. In: *Wiener Mitteilungen. Wasser, Abwasser, Gewässer.* Bd. 128/I. S. 1-8.
- Grabow, W.O.K. (2000a): Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water, *Water SA* 27: 251-268
- Grabow, W.O.K., Taylor, M.B., Clay, C.G., de Villiers, J.C. (2000b): Molecular detection of viruses in drinking water: Implications for safety and disinfection. *Proc. 2nd Conf. of the Int. Life Sciences Inst.: The Safety of Water Disinfection: Balancing Chem. and Microb. Risks.* Radisson Deauville Resort, Miami Beach, Florida, USA, 15-17 November
- Grimes, D.J., Colwell, R.R. (1986): Viability and virulence of *E.coli* suspended by membrane chamber in semitropic ocean water, *FEMS Microbiol. Lett.*, 34:161-165
- Haferkorn, B. (1999): Schaffung von Tagebauseen im mitteldeutschen Bergbaurevier, LMBV (Lausitzer und Mitteldeutsche Bergbau- Verwaltungsgesellschaft mbH)
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.H. (1983): Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antoine van Leeuwenhoek* 49: 387-397

- Havelaar, A.H. (1987): Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiologic Science* 4: 362-364
- Havelaar, A.H. (1993): Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News* 59:614-619
- Hernández-Delgado, E.A. Toranzos, G.A. (1995): In situ replication studies of somatic and male-specific coliphages in a tropical pristine river. *Water Sci. Technol.* 31: 247-250
- Hoff, J.C., Akin, F.W. (1983): Removal of viruses from raw waters by treatment processes. In Berg, G. (Hrsg.) "Viral Pollution of the Environment" S.117-146. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., Andréoletti, L. (2003): Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water, *Water Res.* 37: 4703-4710
- Howard, K.W.F. (2001): Polluted ground-water-deadly lessons from Walkerton, Ont., Canada, aus: Seiler K.P., Wohnlich S. (Editoren): New approaches to characterising flow. Rotterdam:Balkema, 2001. S. 521-525, ISBN 902651 848 X
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991), in Havelaar, A.H. (ed.) Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25:529-545
- Jagals, P. (2000): Impacts of Urban Surface Run-off on the Moder River Catchments: A Microbial Perspective. Dissertation am Technikon Free State, Bloefontein, Südafrika
- Jiang, S.C., Chu, W. (2004): PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers, *J. Appl. Microbiol.* 97:17-28
- Jofre, J., Olle, E., Ribas, F., Vidal, A., Lucena, F. (1995): Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3227-3231

- Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P., Carter, M.J. (2004): Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage, *Letters in Appl. Microbiol.* 39:127-136
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M. (2000): Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters – a Review, *J. Appl. Microbiol.* 88: 5-21.
- Leguyader, F., Apaire-Marchais, V., Brillet, J., Billaudel, S. (1993) : Use of genomic probes to detect Hepatitis A-Virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and sediment by reverse transction-semi-nested PCR, *Appied and Environmetal Microbiology* 63: 3665-3671
- Lewis, G.D, Molloy, S.L., Greening, G.E., Dawson, J. (2000): Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture, *J. Appl. Microbiol.* 88:633-640
- Lopez-Sabater, E.I., Deng, M.Y., Cliver, D.O. (1997): Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) fpr detection of Hepatitis A-Virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*), *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 101-104
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Shwartzbood, L., Skrabber, S., Jofre, J. (2003): Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America, *J. Appl. Microbiol.* 94: 808-815
- Lucena, F., Duran, A.E., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Gantzer, C., Skrabber, S., Jofre, J. (2004): Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments, *J. Appl. Microbiol.* 97: 1069-1076
- Maniloff, J., Ackermann, H.-W. (1998): Taxonomy of bacterial viruses: Establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales, *Arch. Virol.* 143: 2051-2063
- Margolin, A.B., Hewlett, M.J., Gerba, C.P. (1991): The application of polivirus cDNA probe for the detection of enteroviruses in water, *Water Science Technology* 24, 227-280

- Martin, I. (2003): Untersuchungen zur vertikalen Verteilung der Bakterien in einem Tagebaurestgewässer (Werbeliner See). Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
- Melnick, J.L. (1990): Umweltvirologie – ein wichtiges Thema modernen Umweltschutzes. Entwicklungstendenzen und Perspektiven, Wiener Mitteilungen, Wasser, Abwasser, Gewässer 83: 7-16
- Menon, P., Becquevort, S., Billen, G., Servais, P. (1996): Kinetics of flagellats grazing in the presence of two types of bacterial prey, Microbiol. Ecology, 31:89-101
- Menon, P., Billen, G., Servais, P. (2003): Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems, Water Research 37: 4151-4158
- Metcalf, T.G., Melnick, J.L., Estes, M.K. (1995): Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology: a trip of over 50 years, Annu Rev Microbiol 1995; 49: 461-87
- Modrow, S., Falke, D., Tuyen, U. (2003): Molekulare Virologie. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag
- Montgomery, J.M. (1982): Evaluation of Treatment Effectiveness for Reducing Trihalomethanes in Drinking Water. Final Report EPA-68-01-6292, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio
- Moringo, M.A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C., Munoz, M.A., Cornax, R., Borrego, J.J. (1992): Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in Southern England. Water Research 26: 267-271
- Muniesa, M., Lucena, F., Jofre, J. (1999): Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistenz in the environment, J. Appl. Microbiol. 87: 402-409
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Hrsg.) (1995): Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Springer Verlag, Wien

- Noble, R.T., Lee, I.M., Schiff, K.C. (2004): Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater, *J. Appl. Microbiol.* 96: 464-472
- Novotny, C.P., Lavin, K. (1971): Some effects of temperature on the growth of F pili. *Journal of Bacteriology* 107, 671-682
- Oh, D.Y., Graedicke, G., Schreier, E. (2003): Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity, *Journal of Medical Virology* 71 : 82-93
- Pötschke, G. (2003): Der Einfluss des Planktonwachstums auf den Bakterienbestand im Tagebaurestsee Werbeliner See. Diplomarbeit an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
- Puig, M., Jofre, J., Gironés, R. (2000): Detection of phages infecting *Bacteroides fragilis* HSP40 using a specific DNA probe, *Journal of Virological Methods* 88: 163-173
- Pusch, D., Oh,D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bopsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E. (2005): Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters, *Archives of Virology* 150: 929-947
- Rasch, D., Herrendörfer, G., Bock, J., Busch, K. (1978): *Verfahrensbibliothek Versuchsplanung und –auswertung*, Band 2, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, S. 857-861
- Richards, G.P. (1999): Limitations of molecular biological techniques for assesing the virological safety of foods, *J. Food. Prot.* 62:691-697
- Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R. (1984): Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems, *Canadian Journal of Microbiology*, 30:334-338
- Sano, D., Fukushi, K., Yoshida, Y., Omura, T. (2003): Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by combination of the enzymatic virus elution method and TR-PCR, *Water Research*, 37: 3490-3498

- Schwab, K.J., Deleon, R., Sobsey, M.D. (1993): Development of PCR methods for enteric virus detection in water, *Water Science Technology* 27: 211-218
- Schwarz, M. (1980): Interaction of phages with their receptor proteins. Aus: *Bacterial Viruses, Receptors and Recognition*, series B, Vol. 6. Virus reports, part 1. ed Randa, L. Philipson, L. London: : Chapman and Hall
- Shieh, Y.S., Baric, R.S., Sobsey, M.D. (1991): Detection of Hepatitis A-Virus and other enteroviruses in water by ssRNA probes, *Journal of Virology Methods* 31: 119-136
- Simpson, R., Aliyu, S., Iturriza-Gomara, M., Desselberger, U., Gray, J. (2003) : Infantile viral gastroenteritis : on way to closing the diagnostic gap, *Journal of Medical Virology* 70 : 258-262
- Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A., Davies-Colley, J. (2002): Sunlight inactivation of faecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters, *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1122-1131
- Szmclman, S., Hofnung, M. (1975): Maltose transport in *Escherichia coli* K-12. Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *Journal of Bacteriology* 124, 112-118)
- Teltsch, B., Katzenelson, E. (1977): Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater, *Appl. Environ Microbiol.* 35: 290-296
- Tsai, Y.L., Sobsey, M.D., Sangermano, L.R., Palmer, C.J. (1993): Simple method of concentrating enteroviruses and Hepatitis A-Virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3488-3491
- Vollenweider, R.A., Kerekes, J. 1982. Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris, S.156
- Walter, R., and S. Rüdiger (1981). A two stage method for concentrating viruses from solutions with low virus titers. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 25: 1914-1919.

- Walter, R. (Hrsg.) (2000): Umweltvirologie – Viren in Wasser und Boden, Springer-Verlag/Wien
- West, P.A. (1991): Human pathogenic viruses and parasites: emerging pathogens in the water cycle, *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 80, 107S-114S
- WHO (1979): Human viruses in water, wastewater and soil, Technical Report Series 639, Geneva
- Wiggins, B.A., Alexander, M. (1985): Minimum bacterial density for bacteriophage replication: Implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 19-23
- Wyn-Jones, A.P., Sellwood, J. (2001): Enteric viruses in the aquatic environment – A Review, *J. Appl. Microbiol.* 91:945-962