



zukunft
SEIT 1909
denken

REGELWERK

WASSER • ABWASSER • ABFALL

■ ARBEITSBEHELFE

des Österreichischen Wasser- und Abfallwirtschaftsverbandes (ÖWAV)

ÖWAV-Arbeitsbehelf 52

Mikrobiologie und Wasser

Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen
diagnostisch-analytischen Möglichkeiten

Wien 2022

In Kommission bei:
Austrian Standards plus GmbH
1020 Wien, Heinestraße 38

ÖWAV-Regelwerk

Der ÖWAV erstellt in seinen Gremien für die Wasser-, Abwasser- und Abfallwirtschaft sowie für die damit verbundenen Bereiche des Umweltschutzes allgemeine und spezielle technische Regeln und veröffentlicht diese im Rahmen des ÖWAV-Regelwerks. Dieses gibt den Stand der Technik bestmöglich wieder und entspricht damit insbesondere den technischen Erkenntnissen unter Berücksichtigung der Funktionssicherheit sowie rechtlicher, sicherheitstechnischer, hygienischer, ökologischer und wirtschaftlicher Erfordernisse. Das Regelwerk beschäftigt sich dabei mit Planung, Bau, Betrieb, Wartung und Instandhaltung von Anlagen und Bauteilen sowie mit Maßnahmen des Umweltschutzes. Es dient zudem als fachliche Basis für die Aus- und Weiterbildung.

Hinweis für Benutzer:innen

Das ÖWAV-Regelwerk ist das Ergebnis ehrenamtlicher, technisch-wissenschaftlicher Gemeinschaftsarbeit und richtet sich an die Fachwelt wie Planer:innen, Betreiber:innen, Behörden, Ausrüster:innen, Universitäten, Untersuchungsanstalten sowie ausführende Firmen. Der Inhalt wurde sorgfältig erarbeitet, dennoch übernehmen Autor:innen, sonstige Urheber:innen, Mitwirkende und Herausgeber:innen keine Haftung für die Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität. Dieses Regelwerk ist eine wichtige, jedoch nicht die einzige Erkenntnisquelle für fachgerechte Lösungen und entbindet nicht vom im Einzelfall anzuwendenden Sorgfaltsmaßstab. Erforderlichenfalls sind weitere Erkenntnisquellen heranzuziehen. Durch die Anwendung des Regelwerks entzieht sich niemand der Verantwortung für eigenes Handeln oder für die richtige Anwendung im konkreten Fall.

ÖWAV-Regelblätter haben das Ziel, Verfahren, Einrichtungen und Betriebsweisen zu beschreiben, die dem Stand der Technik entsprechen. Sie sollen u. a. auch dafür geeignet sein, von den fachlich zuständigen Behörden und Fachdienststellen als technische Vorgaben für Planung, Bau, Betrieb, Wartung und Instandhaltung von Anlagen sowie für die Anforderungen an das Betriebspersonal dieser Anlagen und dessen Ausbildung eingesetzt zu werden.

ÖWAV-Arbeitsbehelfe haben das Ziel, Empfehlungen und Arbeitshilfen zur Lösung technischer, betrieblicher, ökologischer, wirtschaftlicher und rechtlicher Probleme zu geben. Sie können auch Ergänzungen von Regelblättern darstellen sowie in Regelblättern nicht behandelte Verfahren, Einrichtungen und Betriebsweisen beschreiben. Ebenso können Arbeitsbehelfe für die Veröffentlichung grundsätzlicher Aussagen zu bestimmten Themenbereichen herangezogen werden.

Hinweis:

Bei allen Personenbezeichnungen in diesem Arbeitsbehelf gilt die gewählte Form für alle Geschlechter.

Zitiervorschlag: Farnleitner A. H., Kirschner A. K. T., Frick C., Proksch P., Vogl W., Schauer U., Schrammel B. und Zibuschka F. (Editoren): ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostischen-analytischen Möglichkeiten (2022).

Impressum

Medieninhaber, Verleger und Hersteller: Österreichischer Wasser- und Abfallwirtschaftsverband, Wien

Es wird darauf hingewiesen, dass sämtliche Angaben dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung der Autor:innen, Mitwirkenden oder des Verlags ausgeschlossen ist.

Dieses Werk und seine Teile sind urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung, Verbreitung und Übersetzung werden ausdrücklich vorbehalten. Kein Teil dieses Werkes darf in irgendeiner Form (durch Fotokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne vorherige schriftliche Genehmigung des Verlags reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme gespeichert, verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Redaktion, Satz und Layout: Mag. Fritz Randl (ÖWAV)

© 2022 by Österreichischer Wasser- und Abfallwirtschaftsverband.

VORWORT

Der ÖWAV Arbeitsbehelf 52 „Mikrobiologie und Wasser – Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten“ soll, aufbauend auf den 2017 veröffentlichten ersten Teil, anhand ausgewählter Fallstudien (Case Studies) veranschaulichen, welche Vorteile die Einbeziehung ergänzender mikrobiologischer Untersuchungstechniken bei der Lösung anstehender Probleme bietet.

Bereits im ersten Teil des Arbeitsbehelfs, der eine Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der mikrobiologischen Analyse im Wasserfach aufzeigt, wurde besonders auf die große Anzahl jener Methoden hingewiesen, die über die standardisierten, gesetzlich vorgeschriebenen Verfahren hinausgehen und die Möglichkeiten der Lösung weitergehender Problemstellungen grundlegend erweitern.

Der vorliegende Arbeitsbehelf mit den darin enthaltenen Case Studies soll nun dazu beitragen, die Vielfalt der neuen methodischen Möglichkeiten an relevanten und möglichst eindrucksvollen Problem- und Fragestellungen beispielhaft zu illustrieren. Zu diesem Zweck wurde durch das Kernteam, dem an dieser Stelle der besondere Dank für sein Engagement ausgesprochen werden soll, die Fallbeispiele so ausgewählt, dass möglichst viele der im ersten Band des Arbeitsbehelfs aufgelisteten Methoden dabei einbezogen wurden. Auch im gegenständlichen Fall wurden die Problemstellungen nach den Kriterien der mikrobiologisch-hygienischen, ökologischen und technischen Relevanz ausgewählt. Besonderer Dank gebührt allen beteiligten Autor:innen für die Erstellung der zahlreichen Fachbeiträge.

Als Zielgruppe gelten Wasserversorgungs- und Abwasserentsorgungsunternehmen, Planer:innen, Sachverständige, Universitäten und Behörden.

ÖSTERREICHISCHER
WASSER- UND ABFALLWIRTSCHAFTSVERBAND

Wien, im Juni 2022

An der Erstellung des ÖWAV-Arbeitsbehelfs 52, Teil 2, haben mitgewirkt:

Leitung:

Dr. Franziska ZIBUSCHKA, ehem. Universität für Bodenkultur Wien
Univ.-Prof. PD. Mag. Dr. Andreas FARNLEITNER, MSc.Tox., Technische Universität Wien & KL Krems

Ausschussmitglieder – Kernteam:

Univ.-Prof. PD. Mag. Dr. Andreas FARNLEITNER, MSc.Tox., Technische Universität Wien & KL Krems
Mag. Dr. Christina FRICK, MA 39, Wien
Assoc. Prof. PD. Mag. Dr. Alexander KIRSCHNER, Medizinische Universität Wien & KL Krems
DI Gerhard LINDNER, Medizinische Universität Wien
DI Philipp PROKSCH, Universität für Bodenkultur Wien
HR Dr. Ulrike SCHAUER, ehem. Amt der NÖ Landesregierung, St. Pölten
Mag. Dr. Barbara SCHRAMMEL, Amt der NÖ Landesregierung, St. Pölten
DI Wolfgang VOGL, VWMS GmbH, Zwerndorf
Dr. Franziska ZIBUSCHKA, ehem. Universität für Bodenkultur Wien

Weitere Ausschussmitglieder

Dr. Alfred ALBIN, Universität Innsbruck
Prof. (FH) DI Dr. Manfred FRENZL, Ingenieurbüro Frenzl & Co KG, Tulln
Dr. Werner GUGUBAUER, Amt der NÖ Landesregierung, St. Pölten
Univ. Prof. Mag. Dr. Thomas HEIN, Universität für Bodenkultur Wien
Dr. Thomas LENDENFELD, WSB Labor-GmbH, Krems an der Donau
Mag. Ulrich PURTSCHER, Eurofins Umwelt Österreich GmbH & Co. KG, Wiener Neudorf
DI Dr. Georg REISCHER, Technische Universität Wien
DI Dr. Gabriela RYZINSKA-PAIER, MA 39, Wien
Dr. Manfred SCHINKINGER, SY-Lab Geräte GmbH, Neupurkersdorf
Doz. DI Dr. Angela SESSITSCH, Austrian Institute of Technology GmbH, Tulln
Ao. Univ. Prof. DI Dr. Regina SOMMER, Medizinische Universität Wien
DI Eduard TAUFRAZTZOBER, Eurofins Umwelt Österreich GmbH & Co. KG, Wiener Neudorf
Mag. Dr. Alexandra TIETZ, MA 39, Wien
Dipl.-Biol. Dr. Julia VIERHEILIG, Technische Universität Wien
Dr. Michael VOGL, Eurofins Umwelt Österreich GmbH & Co. KG, Wiener Neudorf
Dr. Markus WERDERITSCH, MA 31, Wien
DI (FH) Norbert WOLF, Amt der NÖ Landesregierung, St. Pölten
Mag. Dr. Thomas ZECHMEISTER, Biologische Station Neusiedlersee, Illmitz
Mag. Dr. Christa ZOUFAL-HRUZA, MA 39, Wien
DI Dr. Marija ZUNABOVIC-PICHLER, MA 31, Wien

Für den ÖWAV:

Lorenz SCHOBER, MSc, Bereichsleiter Recht & Wirtschaft/Qualität und Hygiene im ÖWAV, Wien

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139: ein „Emerging Pathogen“ in Badegewässern im Zuge des Klimawandels (Alexander K.T. Kirschner, Carmen Rehm, Julia Vierheilig, Andreas H. Farnleitner)	11
2	Klassifizierung und Herkunftsbestimmung fäkaler Verunreinigungen in Oberflächengewässern am Beispiel der Donau (Alexander K.T. Kirschner, Christina Frick, Andreas H. Farnleitner)	16
3	Vollautomatisierte, schiffsgestützte Messungen der Enzymaktivität zur flächendeckenden Identifizierung von Hotspots fäkaler mikrobiologischer Einträge in großen Gewässern (Katalin Demeter, Philipp Stadler, Wolfgang Vogl, Domenico Savio, Julia Derx, Alexander K.T. Kirschner, Matthias Zessner, Andreas H. Farnleitner)	20
4	Ereignisbezogene automatisierte Probenahme zur Darstellung der mikrobiologischen Dynamik in Karstquellen (Christian Reszler, Hermann Stadler †, Regina Sommer, Wolfgang Zerobin, Andreas H. Farnleitner)	25
5	Antibiotikaresistenz in Oberflächengewässern: Herkunft und Ausbreitung (Clemens Kittinger, Gernot Zarfel)	30
6	Eutrophierung, toxische Cyanobakterien am Beispiel des urbanen Donau-Altarmgewässers Alte Donau und des alpinen Mondsees (Katrin Teubner, Martin T. Dokulil, Rainer Kurmayer)	35
7	Das Potenzial der DNA-basierten, hochauflösenden Bakteriengemeinschaftsanalytik für die Beurteilung des mikrobiologischen Zustands eines Gewässers am Beispiel der Donau (Domenico Savio, Alexander Eiler, Georg Reischer, Rita Linke, Juraj Parajka, Alfred P. Blaschke, Robert L. Mach, Günter Blöschl, Alexander K.T. Kirschner, Andreas H. Farnleitner)	46
8	Rasche Aufklärung der Infektionsquellen bei Legionärskrankheit durch den Einsatz von molekular-biologischen Methoden, Darstellung von zwei europäischen Ausbruchsszenarien (Barbara Schrammel)	53
9	Mikrobiell beeinflusste Korrosion in natürlichen Wässern: Mechanismen und experimenteller Ansatz zur Risikoabschätzung (Paul Linhardt)	57
10	Analyse von SARS-CoV-2 im Abwasser als ergänzende Informationsquelle für das Pandemie-Management – ein Beispiel für die Anwendung des abwasserepidemiologischen Ansatzes (Julia Vierheilig, Jörg Krampe, Norbert Kreuzinger)	62
11	Biostabilität – Warum treten bei manchen Trinkwässern im Verlauf der Verteilung erhöhte Koloniezahlen auf?	67
12	Quantitative Bestimmung der Effizienz von Desinfektionsverfahren am Beispiel der UV-Bestrahlung von Trinkwasser (Regina Sommer, Georg Hirschmann, Gerhard Lindner, Michael Reiter, Elisabeth Holzhammer, Sonja Knetsch, Andrea Lettl, Angelika Schmidhuber, Alois Schmalwieser)	70
13	Anwendung der Online-Durchflusszytometrie für das Grundwassermonitoring am Beispiel eines Karstquelleinzugsgebiets (Philipp Proksch, Christoph Schönher, Benedikt Schmid, David J. Kerschbaumer, Canan Keskinöz, Ernest Mayr, Marija Zunabovic-Pichler, Reinhard Perfler)	77
14	Allgemeine Literatur	83
	ÖWAV-Regelwerk	93

Übersicht zu den zusammengestellten Fallstudien

Im Jahre 2017 wurde der ÖWAV-Arbeitsbehelf 52 „*Mikrobiologie und Wasser – Teil 1: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse*“ vorgestellt (ÖWAV 2017). Dieser Arbeitsbehelf versucht einen kurzen und verständlichen Überblick für den:die Praktiker:in im Wasserfach über die derzeit vorhandenen Untersuchungsverfahren zu geben. Dabei wird neben den kultivierungsbasierten Standardverfahren vor allem die Vielfalt der ergänzenden/komplementären Verfahren dargestellt und erklärt. Der Bogen wird dabei von der DNA-/RNA-Diagnostik bis zur Online-Messtechnik gespannt.

Mit dem nun vorliegenden ÖWAV-Arbeitsbehelf 52 „*Mikrobiologie und Wasser – Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten*“ (ÖWAV 2022) sollen in einem weiteren Schritt die Lösungsmöglichkeiten mithilfe der neuen ergänzenden mikrobiologischen Methodik und molekularen Diagnostik als Erweiterung zur Standardmethodik für das Wasserfach möglichst eindrucksvoll und verständlich exemplarisch illustriert werden.

Der Bedarf an komplementären Untersuchungsmethoden

Standardmethoden, wie beispielsweise der kultivierungsbasierte Nachweis von Fäkalindikatoren (vgl. Kapitel 2.3.1. und Tab. 1 in ÖWAV 2017) sind in der regelmäßigen akkreditierten Überwachung der mikrobiologisch-hygienischen Wasserqualität essenziell (z. B. menschlicher Gebrauch, Freizeit/Schwimmen, Bewässerung). Sie stellen ein grundlegendes Element im modernen Qualitätsmanagement von Wasserressourcen im Sinne der öffentlichen Gesundheit dar. Ohne sie wäre das tägliche Leben in dieser Form nicht vorstellbar. Nichtsdestotrotz können viele weiterführende Frage- und Problemstellungen im Wasserfach mithilfe kultivierungsbasierter Standardmethoden nicht oder nur unzureichend bearbeitet oder gelöst werden. Dieser Bedarf an methodischen Ergänzungen wird durch die zunehmenden Anforderungen an die Qualitätsvorgaben verstärkt, wie beispielsweise durch risiko-basierte Analysenziele oder die Notwendigkeit der Aufklärung von Ursache oder Herkunft mikrobiologischer Kontaminationen. Die Möglichkeit zur Öffnung der mikrobiologischen „Black-Box“ wird daher in vielen Fällen im Zuge eines proaktiven und nachhaltigen Ressourcen- und Qualitätsmanagements zunehmend eingefordert.

Die neuen Möglichkeiten der Mikrobiologie und molekularen Diagnostik

Die rasanten Entwicklungen im Bereich der Lebenswissenschaften, Bio- und Informationstechnologien haben beeindruckende Möglichkeiten für die mikro- und molekularbiologische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten geschaffen. Mithilfe moderner molekularbiologischer und biochemischer Methoden lassen sich beispielsweise Mikroorganismen und Viren in ihre „Bausteine“ zerlegen (z. B. Basen der Nukleinsäuren oder Aminosäuren von Proteinen), um daraus Information zu deren Identität, Herkunft, häufig auch zur Relevanz bzw. Aktivität abzuleiten. Die generierten Datenmengen können anschließend mithilfe bioinformatischer Analysetools archiviert, mit Referenzdatenbanken verglichen und letztendlich ausgewertet werden (z. B. Identifikation unbekannter viraler oder bakteriologischer Isolate). Viele der vor einigen Jahren in der mikrobiologischen Untersuchung von Wasser noch gänzlich unlösbaren Fragestellungen sind mit diesen modernen Verfahren einer Analyse zugänglich gemacht geworden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig festzuhalten, dass diese neuen Methoden die gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchungsstandards keinesfalls ersetzen, sondern bei Bedarf komplementieren können.

Die ausgewählten 13 illustrativen Fallstudien

Im vorliegenden Band konnten 13 Fallstudien mithilfe zahlreicher facheinschlägiger Expert:innen aus Wissenschaft und Praxis zusammengestellt werden, die die Lösungsmöglichkeiten bei weiterführenden Fragestellungen im Wasserfach möglichst breit illustrieren. Die Auswahl und Kombination der Methoden ist rein beispielhaft zu verstehen und es besteht eine Vielzahl an anderen Möglichkeiten der Anwendung.

Der thematische Bogen ist dabei großzügig angelegt und umfasst Fallstudien zu i) mikrobiologisch-hygienischen, ii) mikrobiell-ökologischen sowie iii) technisch-biotechnologischen Aspekten und Fragestellungen im Wasserfach. Die Themen wurden darüber hinaus so gewählt, dass unterschiedliche Gewässer, Wasserressourcen und Nutzungsarten, wie etwa Oberflächenwasser, Grundwasser, Trinkwasser und Abwasser, vertreten sind (siehe Übersichtstabelle 1, Spalten 2–4).

Besondere Bedeutung wurde der Auswahl und Kombination der Methodik geschenkt, um eine repräsentative Übersicht zu den methodischen Lösungsmöglichkeiten von heute und morgen zu geben. Viele der Fallstudien sind so aufgebaut, dass sie – ausgehend von der Anwendung mikrobiologischer Standardverfahren – eine Ergänzung und Erweiterung durch komplementäre, neue, innovative Methoden bei bis dato ungelösten oder weiterführenden Problem- und Fragestellungen aufzeigen (siehe Übersichtstabelle 1, Spalte 5, Art der Methodenanwendung und -kombination).

Neben der Anwendung von kultivierungsbasierten Verfahren kommt den Fallbeispielen von nicht-kultivierungsbasierten mikrobiologischen Analyseverfahren eine große Bedeutung zu (vgl. Übersichtstabelle 1, Spalte 6, Eingesetzte Methoden). Das breite Spektrum der lösungsorientierten Anwendungsmöglichkeiten von molekularbiologischen Verfahren wird in den Arbeiten Nr. 1, 2, 5, 6, 8, 10 (PCR und quantitative PCR-Anwendungen) und Nr. 5, 6, 7, 8, 9, 10 (Sequenzierung und molekulare Typisierung) demonstriert. Auch die biochemische Identifikation mittels MALDI-TOF-Fingerprinting ist enthalten (Arbeit Nr. 5).

Die mikroskopische Analyse mikrobieller Zellzahlen, Biovolumina und Biomassen wird in Arbeit Nr. 6 illustriert. Als rezente Erweiterung dazu wird der Einsatz der Zytometrie anhand der Arbeiten Nr. 1 und 13 (Festphasenzytometrie und Durchflusszytometrie) gezeigt. Spezifische Färbetechniken (z. B. FISH) kommen hier ebenfalls zur Anwendung.

Innovativen Verfahren zur Bestimmung der mikrobiziden Aktivität mittels Biodosimetrie (Arbeit Nr. 12), des Korrosionspotenzials mittels Mikroelektroden (Arbeit Nr. 9) sowie der Bestimmung der Biostabilitätsdynamik von Wasser (Arbeit Nr. 11) wird ebenfalls ausreichend Platz gegeben.

Automatisierte Probenentnahmen und Messtechniken sowie Online-Messverfahren zur Analyse der mikrobiologischen Wasserqualität finden ebenfalls zunehmende Bedeutung in der wasserwirtschaftlichen Anwendung. Diese werden in den Arbeiten Nr. 3, 4 und 13 vorgestellt.

Übersichtstabelle 1

Artikelnummer	Wasserressource/ Systemtypus	Standort bzw. Habitat	Fragestellung	Art der exemplarischen Methodenanwendung bzw. Methodenkombination	Eingesetzte Methoden	Bezug zu Teil 1, ÖWAV-Arbeitsbehelf 52 (2017)
HYGIENISCHE ASPEKTE						
1	Stehendes Gewässer, Badegewässer	Neusiedler See (A)	Badegewässerqualität, Detektion und Risikoabschätzung des Auftretens von <i>Vibrio cholerae</i>	Standardnachweismethodik mittels Kultivierung ergänzt durch Kombination aus FISH, Festphasen-Zytometrie und qPCR (toxigene Stämme) zur Detektion und Stamm-Differenzierung von <i>Vibrio cholerae</i>	Kultivierung von <i>Vibrio cholerae</i> qPCR (multiplex) FISH Festphasenzytometrie	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik, 2.3.2.2 Zellbasierende Untersuchungen
2	Fließgewässer	Donau, „Joint Danube Survey“ (D, A, HR, SRB, RO)	Quantifizierung und Herkunftsbestimmung (Mensch vs. Tier) von fäkalen Belastungen entlang der Donau	Standardnachweismethodik für Fäkalindikatoren mittels Kultivierung ergänzt durch molekularbiologische Quantifizierung genetischer Fäkalmarker	Kultivierung von <i>E. coli</i> und Enterokokken, qPCR	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik
3	Stehendes Gewässer, Fließgewässer	Lower Columbia River, Lake Mendota (USA)	Schiffsgestützte und vollautomatisierte Kartierung fäkaler Belastungen großer Gewässeroberflächen zur Ursachenfindung	Standardnachweismethodik für Fäkalindikatoren mittels Kultivierung ergänzt durch die Automatisierung der Probenentnahme und enzymatische Messung zur flächenhaften Darstellung von Kontaminationen großer Einzugsgebiete	Kultivierung <i>E. coli</i> (MPN) Enzymatische Glukuronidase-Bestimmung Automatisierte Probenentnahme Online-Monitoring von Temperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert, Trübung, fDOM, Nitrat	2.3.2.4 Untersuchung mikrobieller In-situ-Aktivitäten, 2.3.4 Automatisierung und Online-Messung
4	Grundwasser	Karstquelle (A)	Automatisierte, event-gesteuerte Probenentnahme zur Erfassung der Quellwasserdynamik hinsichtlich fäkaler Belastung	Standardnachweismethodik für Fäkalindikatoren mittels Kultivierung im Vergleich zu chemophysikalischen Online-Parametern (während Starkregen-Ereignissen mit Automatisierung der Probenentnahme)	Kultivierung <i>E. coli</i> (MPN) Automatisierte Probenentnahme Chemische-physikalische Parameter: Trübung, SAK254	2.3.4 Automatisierung und Online-Messung
5	Kläranlagen, Fließgewässer	Mur und Kläranlage (A)	Entwicklung und Zusammenhang der Antibiotika-Resistenz in Umweltproben im Vergleich zu klinischen Isolaten	Standardnachweismethodik für Fäkalindikatoren mittels Kultivierung und der klassischen Resistenzbestimmung ergänzt durch Stammtypisierung und der Bestimmung von Resistenzen mittels Sequenzierungsmethoden und Fingerprinting zur Artbestimmung	Kultivierung <i>E. coli</i> Molekularbiologische Analytik (Multiplex-PCR, Sequenzierung, MLST), MALDI-TOF-Fingerprint zur Artbestimmung	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik

Artikelnummer	Wasserressource/ Systemtypus	Standort bzw. Habitat	Fragestellung	Art der exemplarischen Methodenanwendung bzw. Methodenkombination	Eingesetzte Methoden	Bezug zu Teil 1, ÖWAV- Arbeitsbehelf 52 (2017)
ÖKOLOGISCHE ASPEKTE						
6	Stehendes Gewässer, Badegewässer	Mondsee, Alte Donau bei Wien (A)	Zusammenhang von Eutrophierung und Zusammensetzung des Phytoplanktons, der Dynamik von Blaualgen und deren Toxinproduktion	Standardnachweismethodik für die Bestimmung der Blaualgen- Biomasse, Biovolumen und Zellzahl-Messung ergänzt durch Sequenzierung zur Artbestimmung und qPCR zur Bestimmung des Auftretens von Toxingenen	Biomasse, Biovolumen und Zellzahl-Messung Artspezifischer Vergleich des Toxingehalts mittels qPCR auf Toxin-Genregion Sequenzierung zur Artbestimmung	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik, 2.3.2.3 Analyse mikrobieller Biomassen
7	Fließgewässer	Donau, „Joint Danube Survey“ (D, A, HR, SRB, RO)	Populationsdynamik-Analyse der bakteriellen Gemeinschaft durch hochauflösende DNA-Sequenzierung entlang der gesamten Donau und entlang sich verändernder Umweltfaktoren	Direkte Sequenzierung der mikrobiellen Gemeinschaft ohne Standardnachweismethodik zur hoch auflösenden Identifizierung von bakteriellen Gemeinschaften, die als suspendiert oder partikelassoziiert unterschieden werden	DNA-Hoch-Durchsatz- Sequenzierung, Vergleich mit Sequenz-Datenbanken, zur ökologischen und hygienischen Charakterisierung der Donauabschnitte	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik
TECHNISCHE ASPEKTE						
8	Kühltürme, künstliche wasserführende Systeme	Stoke-on-Trent (GB), Warstein (D)	Aufklärung der Infektionsquelle bei Ausbruchsszenarien von Legionärskrankheit durch Identifikation der Erreger mittels molekularbiologischer Methoden und eindeutiger Zuordnung zu einem Umweltstamm	Standardnachweismethodik mittels Kultivierung zur Erregerisolation und Detektion ergänzt durch die Differenzierung der Isolate mittels DNA-Diagnostik zur Zuordnung der Umweltproben zu den Erkrankten	Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i> , quantitative PCR, molekulare Epidemiologie in Umwelt- und Patient:innen- Proben	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik
9	Wasser- bzw. Abwasser- Leitungssysteme	anonymisiert	Risikoabschätzung des Auftretens von korrosionsrelevanten mikrobiellen Vorgängen in einem Gewässer	Einsatz einer Sonde MICRA-buoy direkt im Wasserkörper zur Bestimmung der Bildung von korrosionsrelevantem Biofilm an Werkstoffproben	Mikroelektroden: In-situ- Einsatz, Quasikontinuierliche Messung des Korrosions- potenzials	2.3.2.4 Mikrobielle In-situ-Aktivitäten 2.3.4 Automatisierung Online-Messung

Artikelnummer	Wasserressource/ Systemtypus	Standort bzw. Habitat	Fragestellung	Art der exemplarischen Methodenanwendung bzw. Methodenkombination	Eingesetzte Methoden	Bezug zu Teil 1, ÖWAV- Arbeitsbehelf 52 (2017)
10	Abwasser	anonymisiert	Abwasserbasierte Epidemiologie: Ergänzendes Monitoring der Prävalenz/ Inzidenz von SARS-CoV-2-Infektionen in der Bevölkerung	Nachweismethodik des Infektionsgeschehens durch die klinische Testung von Einzelpersonen ergänzt durch quantitative molekularbiologische Analyse der Virenfracht und ihrer Mutationen in Tagesmischproben vom Kläranlagenzulauf eines gesamten Abwassereinzugsgebiets	RT-qPCR auf SARS- CoV-2-Viren, dPCR zur Differenzierung von neuen Varianten	2.3.2.1 DNA- und RNA-Diagnostik
11	Trinkwasser- Verteilungsnetz	anonymisiert	Ermittlung des biologischen Stabilitätszustands (Vermehrungspotenzial) im Trinkwassernetz und nach Aufbereitungsschritten	Standardnachweismethodik der Koloniezahlmessung ergänzt durch die Messung des Gehalts an biologisch abbaubarem organischen Kohlenstoff	Kultivierung KBE bei 22 °C, Biotestverfahren: BDOC- Bestimmung	2.3.3 Biostabilität
12	Trinkwasser- desinfektion mittels UV-Bestrahlung	standortunabhängig, Prüfstand	Quantitative Bestimmung der Wirksamkeit von UV-Geräten zur Trinkwasserdesinfektion unter standardisierten Prüfbedingungen	Einsatz von UV-254 nm kalibrierten Mikroorganismen (Biodosimeter) zur biodosimetrischen Messung der Reduktionsäquivalenten Fluenz (J/m ²)	Kultivierung des Biodosimeters (z. B. Sporen von Bacillus subtilis) vor und nach UV-Bestrahlung unter definierten Betriebs- bedingungen des UV-Geräts im Rahmen der Typprüfung. Hydraulische und physikalische Parameter (Durchfluss, Bestrahlungs- stärke, UV-Transmission des Wassers)	2.3.1 Kultivierungs- basierte Verfah- ren
13	Trinkwasser- Ressource	Transportleitung, Karstquelle (A)	Erfassung der Dynamik eines Karstquell- Systems durch Online-Messung der Bakterienzellzahl	Standardnachweismethodik mittels Kultivierung der Koloniezahl und Durchflusszytometrie-Messung der Gesamtzellzahl (unspezifisch, alle bakteriellen Zellen) im Labor im Vergleich zur automatisierten Messung der Gesamt-Zellzahl mittels Online- Durchflusszytometrie	Kultivierung KBE bei 22 °C, Durchflusszytometrie im Labor (Gesamtzellzahl) Automatisierte Proben- entnahme und Online- Durchflusszytometrie vor Ort	2.3.2.2 Zellbasierende Untersuchungen 2.3.4 Automatisierung Online-Messung

Abschlussbemerkung

Der Einsatz neuer komplementärer mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Analysemethoden, gekoppelt mit neuen Möglichkeiten in der Bioinformatik und Datenverarbeitung, hat im Wasserfach gerade erst begonnen. Ein methodischer Quantensprung scheint im Gange. Um einen adäquaten Einsatz dieser neuen Möglichkeiten zu gewährleisten, ist vor allem die enge Kooperation zwischen der wasserwirtschaftlichen Praxis und der universitären Forschung unumgänglich. Dabei erscheint eines wesentlich: Jede Methodik hat ihre Möglichkeiten und Grenzen. Es gibt keine universell anwendbaren Untersuchungsmethoden, lediglich geeignete „Werkzeuge“ für gut definierte Fragestellungen. Expert:innen sind dabei gefordert, die entsprechenden Informationen bereitzustellen.

Neben dem vorliegenden ÖWAV-Arbeitsbehelf sei auch auf die Ausgabe 11–12/2021 der *Österreichischen Wasser- und Abfallwirtschaft* (ÖWAW 2021) zur weiteren Illustration der neuen methodischen Möglichkeiten verwiesen (<https://www.oewav.at/%C3%96WAV/Fachzeitschrift-%C3%96WAW/Ausgaben-aktuell>). In dieser Ausgabe der ÖWAW werden 5 Originalarbeiten zu dieser Thematik mit nationaler wasserwirtschaftlicher Relevanz präsentiert.

Literatur

ÖWAV (2017): ÖWAV-Arbeitsbehelf 52: Mikrobiologie und Wasser – Teil 1: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse. Wien 2017.

ÖWAV (2022): ÖWAV-Arbeitsbehelf 52: Mikrobiologie und Wasser – Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten. Wien 2022.

ÖWAW (2021): The new possibilities of Microbiological Diagnostics for Water Quality Analysis, *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft*, 11–12/2021, Springer Verlag, Wien, New York.

1 **VIBRIO CHOLERAE NON-O1/NON-O139: EIN „EMERGING PATHOGEN“ IN BADEGEWÄSSERN IM ZUGE DES KLIMAWANDELS**

Alexander K.T. Kirschner^{1,2,3}, Carmen Rehm^{1,2,3}, Julia Vierheilig^{3,4}, Andreas H. Farnleitner^{2,3,5}

¹ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wassermikrobiologie

² Karl Landsteiner Privatuniversität Krems, Fachbereich Wasserqualität und Gesundheit

³ Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und Gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

⁴ Technische Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement

⁵ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungszentrum Wasser und Gesundheit

Vibrio-cholerae-Bakterien sind natürliche Bewohner von Badegewässern mit leichtem bis mäßigem Salzgehalt. Um die Konzentrationen, das Vorhandensein toxigener Varianten und deren Steuerung durch Umweltfaktoren bestimmen sowie das Infektionsrisiko abschätzen zu können, wurden in den letzten Jahren kultivierungsunabhängige Methoden entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Der Artikel zeigt die Möglichkeiten und Vorteile dieser neuen Methoden auf.

In der gezeigten Studie kamen neue kultivierungs-unabhängige Verfahren wie Festphasenzytometrie und quantitative PCR für ein besseres Verständnis des Vorkommens und der gesundheitlichen Bedeutung von *Vibrio cholerae* in Badegewässern zum Einsatz.

1.1 Einleitung

Seen oder Teiche werden gerne als Badegewässer benutzt. Die mikrobiologische Wasserqualität dieser Badegewässer wird nach der österreichischen Badegewässer-Verordnung [1] auf Basis der Bestimmung von Standard-Fäkalindikatorbakterien (SFIB), *Escherichia coli* und intestinalen Enterokokken, beurteilt. Im Unterschied zu über die fäkale Belastung potenziell eingetragenen Krankheitserregern treten in bestimmten Badegewässern auch natürlich vorkommende, fakultative Krankheitserreger (Erreger, die sich sowohl frei in der Umwelt als auch als in einem Wirt vermehren können) wie *Vibrio cholerae*, *Aeromonas spp.* oder *Pseudomonas spp.* auf, die bei der Untersuchung gemäß Badegewässerverordnung nicht erfasst werden. Bestimmte österreichische Badegewässer (insbesondere der Neusiedler See) sind in den letzten Jahren vor allem mit Krankheitsfällen in Verbindung gebracht worden, die von dem Erreger *V. cholerae* ausgelöst wurden [2, 3]. Das Bakterium *V. cholerae*, das vor allem als Erreger der schweren Durchfallerkrankung Cholera bekannt ist, ist ein natürlicher Bewohner von Gewässern mit meist leichtem bis mäßigem Salzgehalt. Historisch gesehen wurden verschiedene *V.-cholerae*-Stämme in Serogruppen eingeteilt, wobei über 200 Serogruppen beschrieben wurden. Von diesen können nur Vertreter von zwei Serogruppen (O1 und O139) beim Menschen Cholera auslösen [4]. Voraussetzung dafür ist u. a. das Vorhandensein der Gene für das Cholera-toxin. Von diesen beiden Serogruppen unterscheidet man alle anderen und fasst diese als sogenannte nicht-O1/nicht-O139 Serogruppen zusammen, bzw. als nicht-toxigene *V. cholerae* (NTVC). NTVC verursachen nicht die Cholera, aber können verschiedenartige Infektionen wie leichter verlaufende Durchfallerkrankungen, Ohrenentzündungen, Wundinfektionen und in Folge Sepsis auslösen [5]. Weit aus seltener wurde über nekrotisierende Fasciitis als Folge einer *V.-cholerae*-Infektion berichtet [2, 6, 7].

Da aufgrund der Klimaerwärmung und der damit einhergehenden zunehmenden Erwärmung der Gewässer sowie der zunehmenden Reiseaktivitäten und Ausbreitung über tierische Vektoren (Einschleppung pathogener Stämme) mit einer Zunahme an Infektionsfällen zu rechnen ist [8] (Pretzer et al. 2017), kann ein *V.-cholerae*-Monitoring bestimmter Gewässer sinnvoll sein. Gängige kultivierungsbasierte Standardverfahren [9] beruhen auf aufwendigen most-probable-number (MPN)-Verfahren, weshalb ein vereinfachtes quantitatives Membranfiltrationsverfahren vorgeschlagen wurde (Kirschner et al. 2018). Kultivierungsbasierte Verfahren besitzen für spezifische Fragestellungen jedoch bestimmte Nachteile.

So gehen die Bakterien unter bestimmten Bedingungen (z. B. niedrige Temperatur) in den sogenannten VBNC (viable but nonculturable) Zustand über, eine Art Überdauerungsstadium, in dem sie mit Kultivierungsmethoden nicht nachweisbar sind, aber dennoch infektiös sein können [10]. Das trifft insbesondere für toxische Stämme der Serogruppe O1 zu, die sogar in Cholera-Epidemiegebieten nur sehr selten mittels Kultivierung in den Gewässern nachgewiesen werden können. Zudem wurde gezeigt, dass das Kultivierungsverfahren generell die Anzahl an *V.-cholerae*-Bakterien im Vergleich zu kultivierungsunabhängigen Verfahren um bis zu drei Log-Stufen unterschätzen kann (Schauer et al. 2015; Bliem et al. 2018). Zellbasierende, kultivierungsunabhängige Verfahren mittels Festphasenzytometrie ermöglichen dabei die sensitive Quantifizierung geringer Zellzahlen (Schauer et al. 2012), molekularbiologische Verfahren auf Basis von quantitativer multiplex PCR ermöglichen auch die gleichzeitige Quantifizierung von toxischen und nicht-toxischen Stämmen (Bliem et al. 2015).

1.2 Fragestellungen

- Kommen im Neusiedler See *V.-cholerae*-Bakterien vor und wie hoch ist ihre Konzentration?
- Kommen toxische Stämme im Neusiedler See vor?
- Welchen Einfluss hat die Temperatur auf die Konzentrationen von *V. cholerae*?
- Ist es möglich, auf Basis der Daten eine provisorische Risikoabschätzung durchzuführen?

1.3 Ergebnisse und Interpretation

1.3.1 *V.-cholerae*-Konzentrationen und Umweltfaktoren

Die Konzentrationen von *V. cholerae* im Neusiedler See wurden im Jahr 2011 und 2012 umfangreich untersucht. Neben dem Kultivierungsverfahren konnte ein neu entwickeltes, sensitives zellbasierendes Verfahren (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in Kombination mit Festphasenzytometrie = FISH-SPC) zum Einsatz kommen (Schauer et al. 2012, 2015). Im Vergleich der beiden Methoden zeigte sich, dass das Kultivierungsverfahren deutlich niedrigere Konzentrationen lieferte (Abb. 1). Insbesondere in der kalten Jahreszeit konnten mit dem Kultivierungsverfahren keine *V. cholerae* nachgewiesen werden, während das zellbasierende Verfahren das permanente Vorhandensein dieser Bakterien im Wasser des Neusiedler Sees klar dokumentierte. Offensichtlich „überwintert“ eine geringe Anzahl an lebenden, nicht-kultivierbaren (VBNC) Zellen in der Größenordnung von 1 – 10 pro ml Wasser. In der warmen Jahreszeit lag die Anzahl der mittels Kultivierungsverfahren bestimmten koloniebildenden Einheiten im Mittel um 0,7 Log-Stufen (das 5-Fache) und einem Maximalwert von bis zu 3 Log-Stufen (das 1.000-Fache) unter den gefundenen Zellzahlen.

Um die bestimmenden Faktoren der Vermehrung von *V. cholerae* im See zu bestimmen, konnten die mit dieser Methode ermittelten Zellzahlen mit einer Vielzahl von Umweltparametern verknüpft werden. Dabei stellte sich heraus, dass neben der Temperatur das Auftreten von bestimmten Zooplanktonorganismen (Cladoceren, Blattfußkrebse) sowie der Anteil an Schwebstoffen (durch windbedingte Aufwirbelung des Sediments) positiv mit den *V.-cholerae*-Zellzahlen verknüpft waren (Schauer et al. 2015).

1.3.2 Nachweis potenziell toxischer *V.-cholerae*-Stämme

Der Nachweis toxischer Stämme, die potenziell Cholera auslösen können, ist mit kultivierungsbasierten Methoden sehr aufwendig (Screening von Tausenden Isolaten) und zum Teil unmöglich. Diese befinden sich überwiegend in einem VBNC-Zustand. Ein molekularbiologisches Verfahren, das auf dem gleichzeitigen quantitativen Nachweis von toxischen und nicht-toxischen *V. cholerae* mittels quantitativer Multiplex-PCR beruht, wurde vor kurzem erfolgreich entwickelt und im Neusiedler See in einer Jahresstudie umfassend angewandt (Bliem et al. 2015, 2018). Es zeigte sich, dass die *V.-cholerae*-Bakterien erst ab einer Temperatur von > 15 °C nachweisbar waren. Das qPCR-Verfahren lieferte erst bei höheren Konzentrationen (> 103 genomische Einheiten pro 100 ml) positive Ergebnisse (Abb. 2), was auf die methodisch bedingte geringere Sensitivität des qPCR-Verfahrens zurückzuführen war. Bei positiven qPCR-Ergebnissen

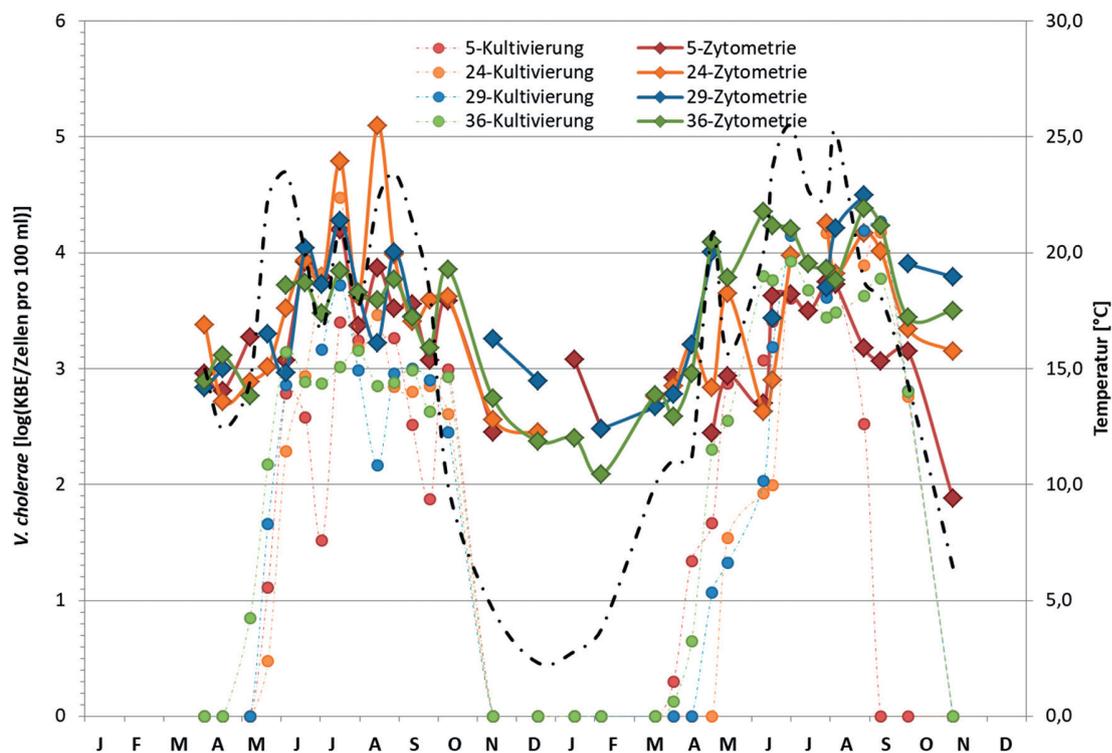


Abb. 1 Konzentrationen von *V. cholerae*-Bakterien an 4 Stationen (5, 36, 29, 24) im Neusiedler See im Jahr 2011 und 2012, bestimmt mittels Kultivierung (KBE, koloniebildende Einheiten) und Festphasenzytometrie (Zellen). Daten aus Schauer et al. (2015). Die durchschnittliche Wassertemperatur (schwarze, gestrichelte Linie) ist ebenfalls abgebildet.

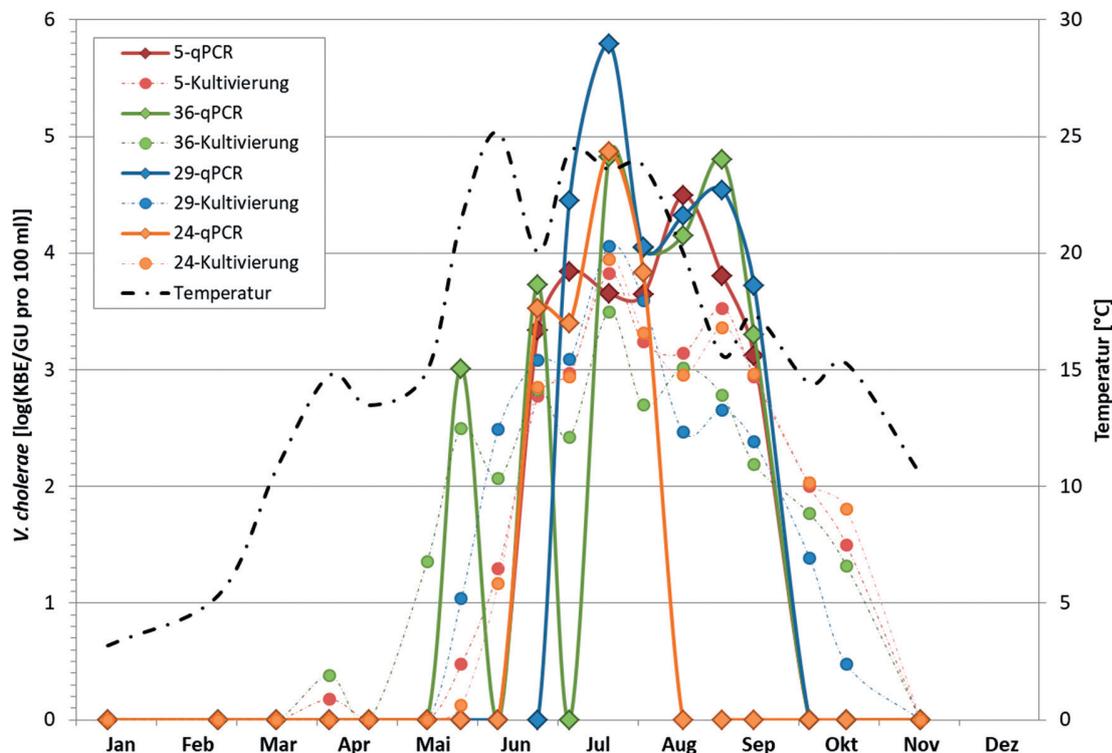


Abb. 2 Konzentrationen nicht-toxischer *V. cholerae*-Bakterien an 4 Stationen (5, 36, 29, 24) im Neusiedler See im Jahr 2014, bestimmt mittels Kultivierung (KBE, koloniebildende Einheiten) und quantitativer PCR (GU, Genomische Einheiten). Daten aus Bliem et al. (2018). Die durchschnittliche Wassertemperatur (schwarze, gestrichelte Linie) ist ebenfalls abgebildet. Toxische *V. cholerae* konnten mittels Multiplex-qPCR in keiner Probe nachgewiesen werden und sind demnach nicht grafisch dargestellt

allerdings lagen die Werte im Mittel um eine Log-Stufe (das 10-Fache, Bereich: 1,5- bis 100-Fache) über den Kultivierungsdaten, wie auch schon mittels Festphasenzytometrie gezeigt wurde (siehe oben).

Toxigene *V. cholerae* konnten mit dem neuen Multiplex-qPCR-Verfahren in keiner Probe nachgewiesen werden. Alle Proben lieferten negative Ergebnisse, auch in den parallel dazu untersuchten Salzlacken, in denen die *V.-cholerae*-Konzentrationen noch deutlich höher lagen (Bliem et al. 2018). Das Vorhandensein toxigener, zum Auslösen von Cholera befähigter Stämme in relevanten Konzentrationen kann demnach praktisch ausgeschlossen werden.

1.3.3 Provisorische Risikoabschätzung

Auf Basis der vorliegenden soliden quantitativen Daten konnte kürzlich eine provisorische Risikoabschätzung für Bade- und Freizeitgäste des Neusiedler Sees durchgeführt werden (Schauer et al. 2015). Diese Risikoabschätzung entspricht aufgrund fehlender Informationen nicht den Anforderungen einer quantitativen mikrobiellen Risikobestimmung [11], sondern stellt den Versuch dar, eine erste grobe Einschätzung des Risikos für diverse Infektionsszenarien zu erarbeiten.

Aufgrund des bisherigen Ausbleibens positiver Nachweise toxigener *V. cholerae* (siehe oben, Bliem et al. 2018) und aufgrund der hohen berichteten Infektionsdosen (105 – 108 KBE) für Cholera [12, 13], ist das Risiko für Badegäste an Cholera zu erkranken derzeit praktisch gleich Null.

Eine zukünftige Einschleppung von toxigenen Stämmen über Vögel oder Menschen und die potenzielle Vermehrung dieser Stämme im See sind jedoch – besonders im Lichte der Klimaerwärmung – nicht auszuschließen. Unter der Annahme, dass die *V.-cholerae*-Stämme im See prinzipiell das nötige genetische Rüstzeug zur Auslösung von Durchfallerkrankungen besitzen und dass in diesem Fall die Infektionsdosen ähnlich denen der Cholera sind, wäre das Risiko, beim Schwimmen im Neusiedler See an einer Darminfektion zu erkranken eher gering, aber nicht auszuschließen. Die im See mittels Festphasenzytometrie beobachteten Konzentrationen von bis zu $1,3 \times 10^6$ Zellen bzw. mittels qPCR gemessenen bis zu $6,2 \times 10^6$ genomischen Einheiten pro L Wasser (Abb. 1, 2; Schauer et al. 2015; Bliem et al. 2018) könnten unter Umständen für eine Infektion ausreichen.

Im Falle der immer wieder beobachteten Ohr- und Wundinfektionen bewegt sich die Abschätzung eines Risikos ebenfalls im sehr unsicheren Bereich. Für diese Infektionen existiert derzeit noch keine Literatur zur Infektionsdosis. Es ist wahrscheinlich, dass die Infektionsdosis im Vergleich zu Darminfektionen deutlich niedriger liegt und wenige Zellen genügen könnten, in eine Wunde einzudringen und eine Infektion auszulösen. Angesichts eines Todesfalles eines Chemotherapiepatienten im Jahr 2005 [3] kann jedoch der Schluss gezogen werden, dass Personen, die ein stark beeinträchtigtes Immunsystem besitzen, beim Baden im Neusiedler See Vorsicht walten lassen sollten. Vor allem beim Auftreten von Wunden und etwaigen typischen Symptomen einer Wundinfektion sollten diese so schnell wie möglich einen Arzt konsultieren und mit ihm die Möglichkeit einer *V.-cholerae*-Infektion erörtern.

1.4 Schlussfolgerungen

- *V.-cholerae*-Bakterien kommen im Neusiedler See als natürliche Bewohner in hohen Konzentrationen vor. Die Verwendung neu entwickelter kultivierungsunabhängiger Methoden zeigt, dass die Kultivierung die Anzahl der *V.-cholerae*-Bakterien unterschätzt.
- Es ist anzunehmen, dass auch in anderen leicht salzhaltigen Badegewässern in Ostösterreich *V. cholerae* in hohen Konzentrationen vorkommen. Ein Monitoring dieser Bakterien in „verdächtigen“ Badegewässern wäre zu empfehlen.
- Der Einsatz der quantitativen Multiplex-PCR ermöglicht ein umfassendes Screening auf das Vorhandensein von nicht-toxigenen und toxigenen Varianten von *V. cholerae*.
- Der Einsatz des sensitiven FISH-SPC-Verfahrens ermöglichte die Bestimmung der wichtigsten Umweltfaktoren, die die Konzentrationen von NTVC beeinflussen.

- Die Temperatur ist einer der Hauptfaktoren, die die Vermehrung von *V. cholerae* beeinflussen. Aufgrund der Auswirkungen des Klimawandels ist davon auszugehen, dass in Österreich die damit verbundene überdurchschnittliche Erwärmung die Vermehrung von *V. cholerae* fördert.
- Eine umfassende quantitative Risikobestimmung bezüglich *V.-cholerae*-Infektionen in Badegewässern ist aufgrund diverser fehlender Informationen nicht möglich. Provisorische Abschätzungen auf Basis vorhandener Daten für den Neusiedler See wurden in Bezug auf Ohren- und Wundinfektionen für Personen mit geschwächtem Immunsystem als erhöht eingeschätzt.

1.5 Detailmethodik

Kultivierbare *V. cholerae* wurden mittels Membranfiltration (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.1) nachgewiesen. Der zellbasierende Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in Kombination mit Festphasenzytometrie (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.2). Der molekularbiologische Nachweis erfolgte mittels Multiplex-qPCR (quantitative PCR, vgl. Teil 1, Kapitel 2.3.2.1), mit der mehrere Zielorganismen in Kombination detektiert und quantifiziert werden können.

1.6 Referenzarbeiten

Bliem R, Schauer S, Plicka H, Obwaller A, Sommer R, Steinrigl A, Alam M, Reischer GH, Farnleitner AH, Kirschner A (2015): A novel triplex quantitative PCR strategy for quantification of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 81:3077–3085.

Bliem R, Reischer G, Linke R, Farnleitner AH, Kirschner AKT (2018): Spatiotemporal dynamics of *Vibrio cholerae* in turbid alkaline lakes as determined by quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 84:e00317–e00318.

Kirschner AKT, Pleininger S, Jakwerth S, Rehak S, Farnleitner AH, Huhulescu S, Indra A (2018): Application of three different methods to determine the prevalence, the abundance and the environmental drivers of culturable *Vibrio cholerae* in fresh and brackish bathing waters. *J Appl Microbiol* 125:1186–1198.

Pretzer C, Druzhinina IS, Amaro C, Benediktsdóttir E, Hedenström I, Hervio-Heath D, Huhulescu S, Schets FM, Farnleitner AH, Kirschner AKT (2017): High genetic diversity of *Vibrio cholerae* in the European lake Neusiedler See is associated with intensive recombination in the reed habitat and the long-distance transfer of strains. *Environ Microbiol* 19:328–344.

Schauer S, Jakwerth S, Bliem R, Baudart J, Lebaron P, Huhulescu S, Kundi M, Herzig A, Farnleitner AH, Sommer R, Kirschner A (2015): Dynamics of *Vibrio cholerae* abundance in Austrian saline lakes, assessed with quantitative solid-phase cytometry. *Environ Microbiol* 17:4366–4378.

Schauer S, Sommer R, Farnleitner AH, Kirschner AKT (2012): Rapid and sensitive quantification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* cells in water samples by use of catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization combined with solid-phase cytometry. *Appl Environ Microbiol* 78:7369–7375.

2 KLASSIFIZIERUNG UND HERKUNFTSBESTIMMUNG FÄKALER VERUNREINIGUNGEN IN OBERFLÄCHENGEWÄSSERN AM BEISPIEL DER DONAU

Alexander K.T. Kirschner^{1,2,3}, Christina Frick⁴, Andreas H. Farnleitner^{2,3,5}

¹ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wassermikrobiologie

² Karl Landsteiner Privatuniversität Krems, Fachbereich Wasserqualität und Gesundheit

³ Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und Gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

⁴ Magistrat der Stadt Wien, MA 39 Prüf-, Inspektions- und Zertifizierungsstelle

⁵ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungszentrum Wasser und Gesundheit

Kenntnis über Ausmaß und Herkunft fäkaler Verunreinigungen ist für ein zielorientiertes Management von Wasserressourcen von großer Bedeutung. Mit dem mikrobiologischen Nachweis der Standardfäkalindikatorbakterien (SFIB) *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken konnte das Ausmaß fäkaler Verunreinigung über den gesamten Verlauf der Donau und ausgewählter Zuflüsse bestimmt werden. Dabei wurden große urbane Bereiche als wichtige Eintragsquellen identifiziert. Zur Herkunftsbestimmung der Verunreinigungen (menschlich vs. tierisch) wurde eine dazu komplementäre Untersuchungsmethode, der Nachweis von „verursacher-assoziierten genetischen Fäkalmarkern“ mittels quantitativer PCR (qPCR), herangezogen. Mit diesen Fäkalmarkern konnte erstmals nachgewiesen werden, dass menschliche Fäkalquellen (Abwässer) die dominanten Eintragsquellen im gesamten Donaauraum für die vorliegende Untersuchungsperiode und die hydrologischen Verhältnisse darstellten.

2.1 Einleitung

Der mikrobiologische Nachweis fäkaler Verunreinigungen in Wasserressourcen für diverse Verwendungszwecke (z. B. Bewässerung, Badewasser, Trinkwasser) basiert auf dem Nachweis sogenannter Standardfäkalindikatorbakterien (SFIB). Bakterien wie *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken, die in hohen Konzentrationen im Darm von warmblütigen Tieren und Menschen vorkommen und mit dem Stuhl ausgeschieden werden, werden seit über 100 Jahren zum Nachweis für eine fäkale Kontamination herangezogen. Der Nachweis von SFIB kann relativ einfach durch standardisierte Kultivierungsmethoden (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.1) erfolgen. Mit dem Nachweis von SFIB in Gewässern kann zwar das Ausmaß der fäkalen Verunreinigung bestimmt und somit das potenzielle Vorhandensein von Krankheitserregern nachgewiesen werden, über die Verursacher der Fäkalkontamination geben sie allerdings keine Auskunft. Die Information, um welche Fäkalquellen es sich handelt, und woher die fäkalen Einträge stammen, ist jedoch essenziell für ein zielorientiertes Management von Wasserressourcen [14, 15]. Bei der Herkunftsbestimmung können menschliche (meist Abwässer) und tierische (Wildtiere und Nutztiere) Quellen unterschieden werden. Zur Herkunftsbestimmung von fäkalen Verunreinigungen haben sich in den letzten Jahren verursacher-assoziierte genetische Marker etabliert. Mittels quantitativer PCR (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) werden Gensequenzen von Bakterien, die mit dem Menschen oder mit bestimmten Tiergruppen assoziiert sind, nachgewiesen. Bei vielen der etablierten Marker handelt es sich um Bakterien der Gattung *Bacteroides*, die in großer Anzahl im Verdauungstrakt vorkommen [16, 17].

2.2 Fragestellungen

- Wie hoch ist das Ausmaß fäkaler mikrobiologischer Verunreinigung im gesamten Verlauf der Donau und ausgewählter Zubringer für den gewählten Untersuchungszeitraum?
- Was sind die dazu gehörigen Quellen der fäkalen Verunreinigung in der Donau und ihrer Zubringer (tierisch vs. menschlich)?

2.3 Ergebnisse und Interpretation

Zwei Donau-Studien (Joint Danube Surveys, JDS) über den gesamten Flussverlauf der Donau wurden von Mitte August bis September 2001 und 2007 durchgeführt. Auf einer Länge von 2 600 km wurden 96 (JDS 2007) bzw. 98 (JDS 2001) Entnahmestellen ausgewählt, davon 75 bzw. 76 direkt an der Donau und 21 bzw. 22 an Zuflüssen. Bei der dritten Befahrung der Donau 2013 wurden 70 Stellen untersucht, die Beprobung fand nicht nur in der Flussmitte, sondern jeweils auch am rechten und linken Ufer statt. Die Beprobungskampagnen dauerten jeweils ca. 6 Wochen und fanden überwiegend bei niedrigen bzw. mittleren Wasserständen statt, Hochwassersituationen waren auf kurze Abschnitte und Zeiträume von wenigen Tagen begrenzt. Die Klassifikation der mikrobiologischen Wasserqualität erfolgte in 5 Stufen (Tab. 1), angelehnt an die 5-stufige ökologische Bewertung der Gewässer gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie [18] sowie aufgehängt auf den Grenzwerten der EU-Badegewässerrichtlinie [19].

Tab. 1 Mikrobiologische Klassifikation der Wasserqualität bezüglich fäkaler Belastung

KBE/100ml	gering	mittel	kritisch	stark	sehr stark
<i>E. coli</i>	≤ 100	> 100 – 1.000	> 1.000 – 10.000	> 10.000 – 100.000	> 100.000
Enterokokken	≤ 40	> 40 – 400	> 400 – 4.000	> 4.000 – 40.000	> 40.000

Anhand der SFIB-Konzentrationen konnte die Donau in sechs Abschnitte eingeteilt werden (Kirschner et al. 2009, [154]) (Abb. 3). Von Deutschland bis oberhalb von Wien wurde eine geringe bis mittlere fäkale Belastung festgestellt. Zwischen Wien und der Slowakei variierte der Grad an fäkaler Belastung bis zur Kategorie kritisch. Flussabwärts von Budapest bis Serbien stieg die Belastung bis zu stark an. Nach einer Abnahme der fäkalen Einträge im vierten Abschnitt, stieg die Belastung im nächsten Abschnitt bis Rumänien wieder stark an. Im letzten Abschnitt bis zum Delta war wieder eine leichte Abnahme feststellbar. Die fäkale Belastung wurde überwiegend durch große urbane Bereiche (Wien, Bratislava, Budapest, Belgrad und Bukarest) verursacht. Die höchsten Konzentrationen wurden allerdings in bestimmten Zuflüssen festgestellt (Abb. 3). Die erhaltenen Resultate legten die Hypothese nahe, dass kommunale, vom Menschen stammende Abwässer die Hauptquelle der mikrobiologischen Fäkalbelastung waren. Diese Hypothese wurde anhand der Bestimmung der Häufigkeiten und Konzentrationen von genetischen Fäkalmarkern und anschließender Korrelationsanalysen zu SFIB-Konzentrationen überprüft [20, 21].

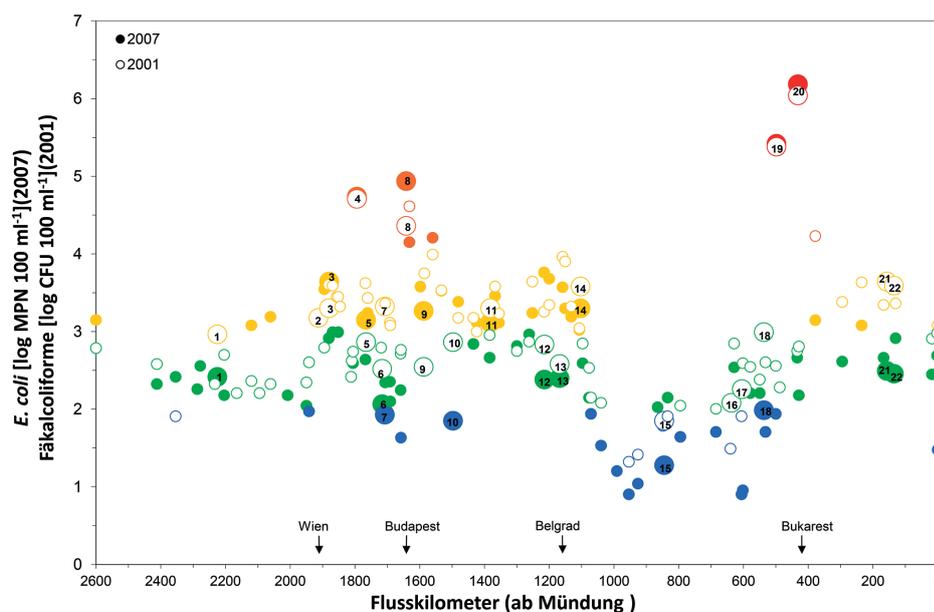


Abb. 3 Fäkale Kontamination in der Donau (kleine Kreise) und ihre Zubringer (große Kreise); 1: Inn, 2: Schwechat, 3: Morava, 4: Moson Danube, 5: Vah, 6: Hron, 7: Ipoly, 8: Rackeve-Soroksar Arm start, 9: Rackeve-Soroksar Arm end, 10: Sio, 11: Drava, 12: Tisza, 13: Sava, 14: Velika Morava, 15: Timok, 16: Iskar, 17: Olt, 18: Jantra, 19: Russenski Lom, 20: Arges, 21: Siret, 22: Prut (nach Kirschner et al. 2009, geändert)

Während die Mensch-assoziierten Marker in 80 bis 90 % der Proben nachweisbar waren, lag die Rate bei den Markern für Schweine und Wiederkäuer bei unter 10 % (Kirschner et al. 2015, 2017). Die Konzentrationen der mensch-assoziierten Marker BacHum und HF183II in den Wasserproben waren darüber hinaus um Größenordnungen höher als jene der positiven Tier-assoziierten Markernachweise (Abb. 4a).

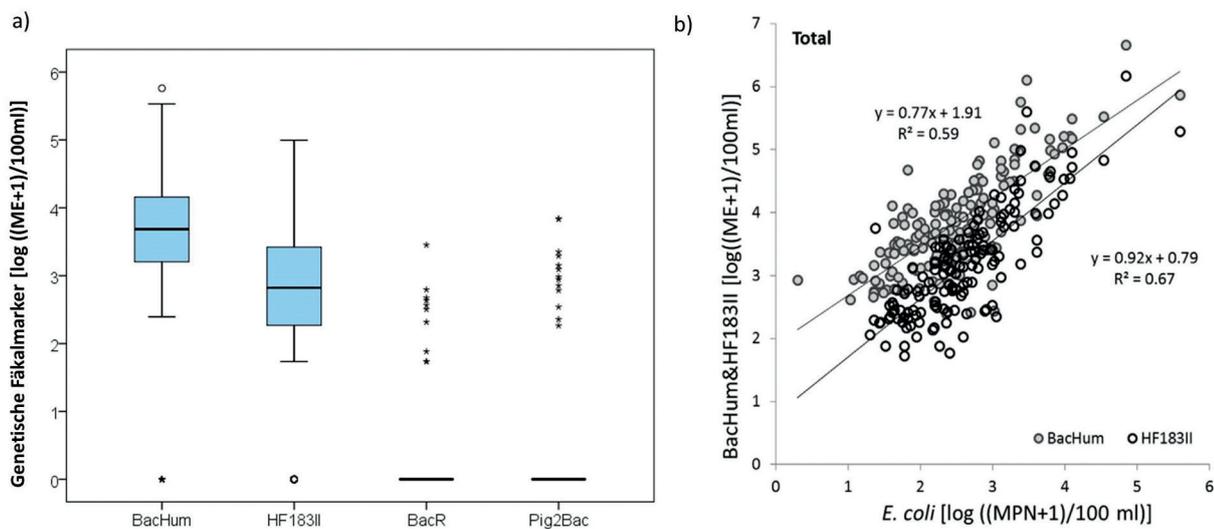


Abb. 4 Genetische Fäkalmarker in der Donau und Zuflüssen: a) Konzentrationen von Mensch- und Tier-assoziierten (Box-plots: Balken = Median, Box = 25 und 75 Perzentil, Whisker = 5 bzw. 95 Perzentil, ° = Ausreißer, * = Extremwert); b) Regressionsanalyse *E. coli* und Mensch-assoziierte Fäkalmarker (aus Kirschner et al. 2017)

E. coli und Enterokokken zeigten hoch signifikante Korrelationen zu den Mensch-assoziierten Fäkalmarkern (Abb. 4b), wobei in der Donau die Korrelation zwischen *E. coli* und BacHum ($r = 0,77$, $p < 0,001$) bzw. HF183II ($r = 0,82$, $p < 0,001$) am höchsten war. Zwischen 59 und 67 % der *E.-coli*- Variabilität in der Donau konnten durch die Mensch-assoziierten Marker erklärt werden. In den Zubringern konnte sogar bis zu 80 % der Variabilität von *E. coli* mit der Variabilität der Mensch-assoziierten Fäkalmarker erklärt werden. Die hohe Korrelation zwischen SFIB und den genetischen Mensch-assoziierten Markern sowie die hohen Konzentrationen humaner Marker bei gleichzeitig äußerst geringen Konzentrationen und Häufigkeiten tierischer Marker indizierten, dass humane Fäkalquellen die dominanten Eintragsquellen in den Zubringern und in der Donau waren (Kirschner et al. 2017).

2.4 Schlussfolgerungen

- Mittels Analyse der Standardfäkalindikatorbakterien konnte die Belastungssituation während der drei JDS 2001, 2007 und 2013 über den gesamten Verlauf der Donau für die Untersuchungsperiode (jeweils Mitte August bis Ende September unter Niedrigwasser bzw. Mittelwasserbedingungen) erfasst werden.
- Eine dazu komplementäre Analyse der genetischen Fäkalmarker konnte eindeutig die Hauptquellen der Verunreinigung identifizieren.
- Humane Quellen (Abwasser) waren die Hauptquelle fäkaler Belastung über den gesamten Verlauf der Donau und auch in den Zubringern, während tierische Quellen von geringer Bedeutung waren.
- Diese Informationen können eine wichtige Basis für Entscheidungsträger darstellen, um nachhaltige Monitoring- und Managemententscheidungen zu treffen. Darüber hinaus bieten sie die Grundlage für eine weiterführende Modellierung der fäkalen Eintragsituation sowie der Abschätzung der notwendigen Maßnahmen hinsichtlich einer sicheren Wasserverwendung mittels der mikrobiellen Risikoabschätzung [22, 23].
- Genetische Nachweismethoden bieten im Gegensatz zu kultivierungsbasierten Methoden die Möglichkeit, Rückstellproben tiefgekühlt aufzubewahren (−80 °C) und zu einem späteren Zeitpunkt entsprechend der Fragestellung und Hypothesen zu analysieren.

2.5 Detailmethodik

- Die Fäkalindikatorbakterien *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken wurden mittels kultivierungsbasierter Methoden (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.1), zum Teil mit standardisierten MPN-Verfahren, zum Teil mit der standardisierten Membranfiltrations-Methode nachgewiesen.
- Die genetischen Fäkalmarker wurden mit einer qPCR (quantitative PCR, vgl. Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) bestimmt. Es wurden Marker, die mit dem Menschen (BacHum) [24] und HF183II [25] bzw. mit Wiederkäuern (BacR) (Reischer et al. 2006) und Schweinen (Pig2Bac) [26] assoziiert sind, für die Studie ausgewählt.

2.6 Referenzarbeiten

Kirschner AKT, Kavka GG, Velimirov B, Mach RL, Sommer R, Farnleitner AH (2009): Microbiological water quality along the Danube River: Integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. *Wat Res* 43:3673-3684.

Kirschner AKT, Reischer GH, Jakwerth S, Savio D, Ixenmaier S, Toth E, Sommer R, Mach RL, Linke R, Eiler A, Kolarevic S, Farnleitner AH (2017): Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. *Wat Res* 124:543-555.

Kirschner AKT, Kavka G, Reischer GH, Sommer R, Blaschke AP, Vierheilig J, Mach RL, Farnleitner AH (2015): Microbiological Water Quality of the Danube River: Status Quo and Future Perspectives. In: *Handbook of Environmental Chemistry, special volume „The Danube River Basin“*; Liska I & Slobodnik J, (eds.), Springer Verlag; Berlin, ISBN 978-3-662-47738-0.

Reischer GH, Kasper DC, Steinborn R, Mach RL, Farnleitner AH (2006): Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl Environ Microbiol* 72:5610-5614.

3 VOLLAUTOMATISIERTE, SCHIFFSGESTÜTZTE MESSUNGEN DER ENZYMAKTIVITÄT ZUR FLÄCHENDECKENDEN IDENTIFIZIERUNG VON HOTSPOTS FÄKALER MIKROBIOLOGISCHER EINTRÄGE IN GROSSEN GEWÄSSERN

Katalin Demeter¹, Philipp Stadler², Wolfgang Vogl³, Domenico Savio⁴, Julia Derx⁵, Alexander K.T. Kirschner^{4,6,7}, Matthias Zessner², Andreas H. Farnleitner^{1,4,7}

¹ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungszentrum Wasser und Gesundheit

² Technische Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement

³ Vienna Water Monitoring Solutions

⁴ Karl Landsteiner Privatuniversität Krems, Fachbereich Wasserqualität und Gesundheit

⁵ Technische Universität Wien Institut für Wasserbau und Ingenieurhydrologie

⁶ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wassermikrobiologie

⁷ Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und Gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

Der fluoreszenzbasierte Nachweis der enzymatischen β -D-Glucuronidase (GLU)-Aktivität kann als schnelle Monitoringmethode zum indirekten Hinweis auf fäkale Verschmutzung (Proxyparameter) in Gewässern genutzt werden. Neue technologische Implementierungen ermöglichen die vollautomatisierte, echtzeitnahe und präzise Messung von GLU mit mobilen Geräten. Der hier präsentierte Referenzartikel (Stadler et al. 2019) lieferte die ersten räumlich hochaufgelösten Daten der GLU-Aktivität in großen Gewässern, erfasst durch schiffsgestützte Messungen. Die Studie zeigt die Anwendbarkeit dieses neuartigen Ansatzes für ein Qualitäts-Screening für Binnengewässer und die Identifikation von Kontaminationen. Die Untersuchungen wurden in Nordamerikanischen Binnengewässern entlang eines bis zu 500 km langen Flussverlaufs und in Seen mit einer Gesamtfläche von 50 km² durchgeführt. Die Aussagen werden durch Erkenntnisse von einem vor kurzem publizierten Übersichtsartikel ergänzt (Demeter et al. 2020). Die hier präsentierte Methodik hat großes Potenzial als Screeningmethode zur schnellen und flächendeckenden Vorerkundung und Charakterisierung fäkaler Verschmutzungen bei großen Gewässern.

3.1 Einleitung

Die fäkale mikrobiologische Verunreinigung von Gewässern kann hohe zeitliche und räumliche Variabilität aufweisen. Für ein zeitnahe und proaktives Management von Wasserressourcen kann die schnelle und sensitive Erkennung solcher Variationen essenziell sein. Kultivierungsbasierte Standardmethoden, wie der Nachweis des Fäkalindikatorbakteriums *E. coli*, sind zur schnellen Bewertung und hochfrequenten Analyse der mikrobiologischen Wasserqualität nicht optimal geeignet, da Ergebnisse erst 18 bis 72 Stunden nach Probenentnahme vorhanden sind und ein beträchtlicher Arbeitsaufwand damit verbunden ist.

Vor über 25 Jahren wurden Labormethoden zur fluoreszenzbasierten Messung der enzymatischen Aktivität als schnelle Methode zur Erfassung fäkaler Belastungen erstmals in der Fachliteratur vorgeschlagen [27, 28]. Das Messprinzip basiert auf der optischen Detektion der In-situ- β -D-Glucuronidase-Enzymaktivität (GLU). GLU wird seit langem als Kombinationsmerkmal bei der mikrobiologischen Identifikation von *E. coli* verwendet (neben der Indolbildung, der β -D-Galactosidaseaktivität, sowie Wachstum bei > 37 °C und hohen Konzentrationen an Gallensalzen). Die kultivierungsunabhängige Messung der GLU-Aktivität direkt im Wasser ist heute schon mittels moderner Messgeräte möglich. Diese Messgeräte ermöglichen eine vollautomatisierte, echtzeitnahe Messung der Enzymaktivität mit robusten und analytisch präzisen Ergebnissen [29–31].

Das Potenzial von zeitlich hoch aufgelösten GLU-Daten für die Überwachung der mikrobiologischen Wasserqualität wurde in einer Vielzahl von Wasserressourcen durch automatisierte Messungen verdeutlicht [30–34]. Bisher lag der Fokus von Studien jedoch auf der zeitlichen Dynamik von mikrobiellen Pa-

parametern an einer Messstation. Die räumliche Heterogenität der mikrobiellen Belastung innerhalb und zwischen einzelnen Gewässern wurde noch nicht ausreichend dokumentiert.

3.2 Fragestellungen

- Können flächendeckende und räumlich-aufgelöste Muster der GLU-Aktivität innerhalb größerer See- und Flussgebiete mittels vollautomatisierter schiffsgestützter Messungen realisiert werden?
- Können automatisierte Messungen der GLU-Aktivität als indirekter Indikatorparameter (Screeningmethode) zum schnellen und flächendeckenden Hinweis fäkaler Verschmutzungen in großen Gewässern dienen?

3.3 Darstellung

Um die Anwendbarkeit von schiffgestützten GLU-Messungen unter verschiedensten Umweltbedingungen zu bewerten und den Nutzen zur Identifikation von Hotspots fäkaler Verschmutzungen sowie der Erstellung von Wasserqualitätskarten zu evaluieren, wurde die Methodik in drei großen Binnengewässern getestet. Zwei dieser Untersuchungen sollen hier präsentiert werden: (i) Lake Mendota, ein mittelgroßer, eutropher (nährstoffreicher) See im Mittleren Westen der USA, dessen Umland sowohl landwirtschaftlich als auch urban genutzt wird; und (ii) Lower Columbia River im Nordwesten der USA, dessen Einzugsgebiet ausgeprägte Variationen in Klima und Landnutzungen aufweist und der sowohl durch aufgestaute als auch durch frei fließende Strecken verläuft. Die Wasserqualitätskarten des Lake Mendota wurden in eine Serie von drei Untersuchungen aufgenommen. Abhängig von der Zeit seit dem letzten Niederschlagsereignis und dessen Intensität zeigte die GLU-Aktivität des Seewassers eine deutliche räumliche Variabilität (vgl. Abb. 5 A-C und D-F). Während das tiefe zentrale Becken des Lake Mendota GLU-Werte nahe der Nachweisgrenze aufwies, wurden an Zuflüssen und Einmündungen (Yahara River, Pheasant Branch Creek, städtische Oberflächenentwässerung) höhere Werte beobachtet. Am höchsten waren sie wenige Stunden nach einem intensiven lokalen Gewitter (Abb. 5C und F). Diese Beobachtungen sowie das Muster der Zusammenhänge mit limnologischen Parametern (z. B. $R^2 = 0,6$, $p < 0,001$ mit Trübung, lineare Regression) lassen darauf schließen, dass die räumliche Variation der GLU-Aktivität durch hydrologische Prozesse bestimmt wird, z. B. durch die Einmündung des Yaharas, der ein landwirtschaftliches Einzugsgebiet entwässert und große Mengen an Schwebstoffen, Nährstoffen und vermutlich auch tierischen Fäkalien mit sich führt. Limnologische Prozesse im See selbst scheinen hier nicht der dominante Treiber der GLU-Variation zu sein.

Die GLU-Aktivität im Lower Columbia River war einerseits durch einen stromabwärts ansteigenden Trend, andererseits durch kurz andauernde, aber hohe Spitzenwerte aufgrund von Einmündungen von Flüssen gekennzeichnet (Abb. 6) mit einem starken Zusammenhang mit Chlorophyll-a ($R^2 = 0,55$, $p < 0,001$, lineare Regression), einem Indikator für Algenwachstum und gute Nährstoffverfügbarkeit. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Zuflüsse, die landwirtschaftliche und urbane Gebiete entwässern, die vorherrschenden Treiber der räumlichen Muster der GLU-Aktivität sind. Innerhalb des Stausees des The Dalles Damms wurde eine Abnahme der GLU-Aktivität beobachtet. Eine plausible Erklärung dafür ist die Retention von partikelassoziierten Mikroorganismen aufgrund erhöhter Sedimentation innerhalb von Stauseen.

Um die Korrelation zwischen den GLU-Aktivitätsmessungen und einer Standardmethode zum Nachweis für fäkale Belastungen (*E. coli* mittels IDEXX, Colilert-18) zu bestimmen, wurden 18 Wasserproben aus den Uferbereichen des Lake Mendota mit beiden Methoden analysiert. Der hohe und signifikante Zusammenhang zwischen den zwei Methoden ($R^2 = 0,71$, $p < 0,001$, $n = 18$, lineare Regression) zeigt das Potenzial schneller GLU-Messungen als indirekter Hinweis für fäkale Verschmutzung von Gewässern auf und stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein.

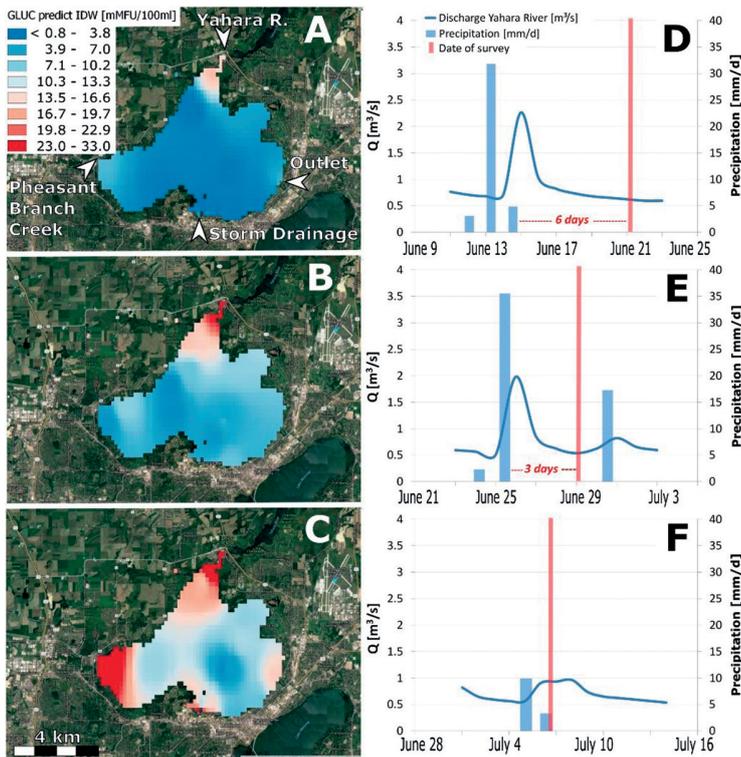


Abb. 5 Auf der linken Seite (A, B und C) zeigen Übersichtskarten des Lake Mendota die räumlichen Muster der GLU-Aktivität und deren Unterschiede in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zum letzten Niederschlagsereignis. Auf der rechten Seite (D, E und F) sind die entsprechenden Ganglinien (Abfluss in m³/Sekunde) des Yahara River (blaue Linie), die Niederschlagsmenge (blaue Balken) und das Datum der Datenerhebung der jeweiligen Abb. A-C (roter Balken) dargestellt. GLUC predict IDW, GLU interpoliert mit inverser Distanzgewichtung; MFU, Modified Fishman Units. Quelle: Stadler et al. 2019, Fig. 2.

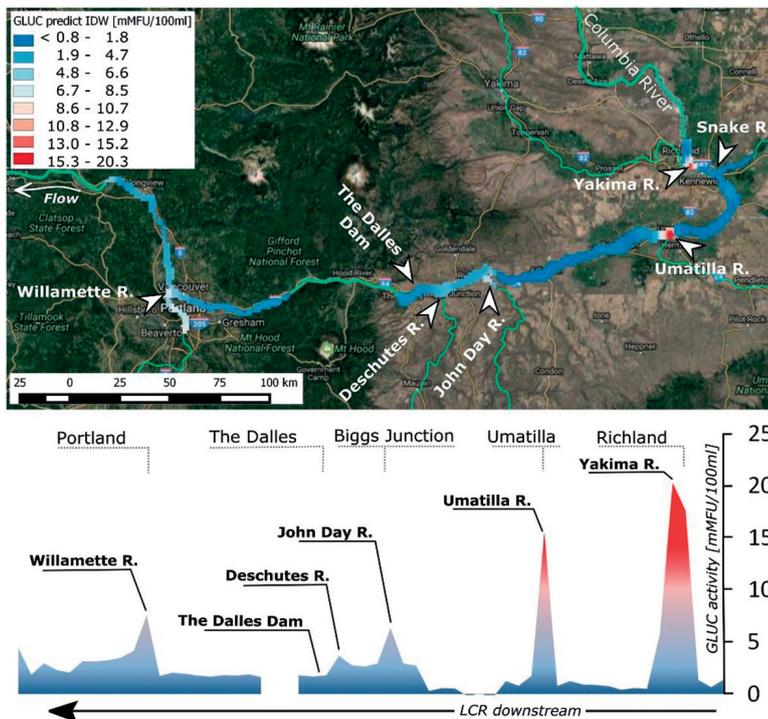


Abb. 6 Karte der GLU-Aktivität im Lower Columbia River und bei den Einmündungen seiner Nebenflüsse. Die Grafik unter der Karte stellt den entsprechenden Verlauf der GLU-Aktivität dar. GLUC predict IDW, GLU interpoliert mit inverser Distanzgewichtung; MFU, Modified Fishman Units. Quelle: Stadler et al. 2019, Fig. 5.

Nach derzeitigem Wissensstand kann die Aussagekraft der GLU-basierten Untersuchungsmethode hinsichtlich der Indikation fäkaler Belastungen je nach Habitat und Situation unterschiedlich sein [30, 33]. GLU-Aktivität wurde beispielsweise auch bei nicht-darmbewohnenden Mikroorganismen, wie Umweltbakterien und Algen, sowie auch bei frei gelösten Enzymen beobachtet [35, 36]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die mikrobielle GLU-Aktivität eine wichtige Rolle im menschlichen Magen-Darm-System spielt. Im menschlichen Stoffwechsel werden viele „unerwünschte“ Substanzen in biologisch inaktivierte Glucuronide umgewandelt und in den Darm ausgeschieden. Im Darm können Hunderte Bakterienarten mithilfe ihres GLU-Enzyms die Glucuronsäure von den Glucuroniden entfernen, um diese für sich als Kohlen- und Energiequelle zu nutzen [37].

Deswegen ist die GLU-Aktivität nicht nur auf das Fäkalindikatorbakterium *E. coli*, sondern auf eine Vielfalt von Fäkalbakterien zurückzuführen. Daher wurde kürzlich vorgeschlagen, die GLU-Aktivität als konservativen biochemischen indirekten Indikatorparameter, sogenannten Proxyindikator für fäkale Verunreinigungen anzusehen. Der Begriff Proxyindikator hier bedeutet, dass die Qualität als Zeiger fäkaler Einträge je nach Eintragungssituation (z. B. rezente fäkale Einträge aus Kläranlagen, ältere fäkale Kontaminationen durch Einträge von Oberflächenabfluss) unterschiedlich sein kann (z. B. [38, 39]). Deswegen ist es wichtig, die erhobenen GLU-Messdaten mithilfe anderer Analysemethoden für fäkale Verschmutzungen an repräsentativen Vergleichsserien zu überprüfen (z. B. mittels molekularbiologischer Methoden durch genetische Fäkalmarker, s. Beitrag 2). Darüber hinaus kann der Vergleich mit anderen online erhobenen Messdaten die Interpretation unterstützen.

3.4 Schlussfolgerungen

- Die Anwendung demonstriert das hohe Potenzial der automatisierten enzymatischen GLU-Messung für das räumlich hochaufgelöste und flächendeckende Screening von Gewässern zur Identifikation von Hotspots fäkaler Belastungen, die mit herkömmlichen Untersuchungsstrategien nicht zu bewerkstelligen sind.
- GLU-Aktivität ist als konservativer biochemischer Proxyindikator für fäkale Verunreinigungen anzusehen. Es ist daher zu empfehlen, die Indikationsqualität für die jeweilige Untersuchungssituation mittels mikrobiologischer Parameter für fäkale Einträge anhand repräsentativer Vergleichsserien zu überprüfen. Besonders geeignet erscheinen hier molekularbiologische Messverfahren, z. B. PCR-Quantifizierung genetischer Fäkalmarker, die einen direkten kultivierungsunabhängigen Nachweis und das Anlegen von Rückstellproben ermöglichen.
- Der Vergleich mit anderen online erhobenen chemisch-physikalischen und biochemischen Messdaten kann die Interpretation räumlich hochaufgelöster GLU-Daten sehr unterstützen bzw. erleichtern.

3.5 Detailmethodik

Die Bestimmung der β -D-Glucuronidase Aktivität basiert auf der spezifischen bakteriellen Hydrolyse des Substrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid und der Fluoreszenzdetektion (Anregung: 365 nm, Emission: 455 nm) des enzymatischen Reaktionsprodukts. Für eine Messung wurden jeweils 6,5 ml Wasserprobe automatisch entnommen. Die automatisierte Messung dauert 15 min. Der Assay wurde auf Modified Fishman Units [MFU/100 ml] kalibriert [40]. Das Messgerät (Coli-Minder: VWMS, Austria) verfügt über ein wasserdichtes Gehäuse. Die Konstruktion und Funktion desselben Prototyps wurden durch [29] und [31] ausführlich beschrieben.

Die wesentliche technische Basis für diese Studie war die Fast Limnology Automated Measurement (FLA-Me) Plattform [41], deren Kernmerkmal eine schiffsgestützte Probenahme von Binnengewässern ist. Wasser wird zu einer Reihe von Sensoren gefördert. In dieser Studie waren es Sonden für Temperatur [°C], pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit [μ S/cm], Trübung [FNU], fluoreszierende gelöste organische Stoffe (fDOM; [RFU], Chlorophyll a [μ g/l]) sowie ein optischer Nitratanalysator (Nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$ [mg/l])). Alle Messungen wurden durch ein mitgeführtes GPS georeferenziert.

Das Fäkalindikatorbakterium *Escherichia coli* wurde mittels eines kultivierungsbasierten, standardisierten MPN-Verfahrens nachgewiesen ([42], IDEXX Colilert-18).

3.6 Referenzarbeiten

Demeter K, Burnet JB, Stadler P, Kirschner AKT, Zessner M, Farnleitner AH (2020): Automated online monitoring of fecal pollution in water by enzymatic methods. *Curr Opin Environ Sci Health* 16:82-91.

Stadler P, Loken LC, Crawford JT, Schramm PJ, Sorsa K, Kuhn C, Savio D, Striegl RG, Butman D, Stanley EH, Farnleitner AH, Zessner M (2019): Spatial patterns of enzymatic activity in large water bodies: Ship-borne measurements of beta-D-glucuronidase activity as a rapid indicator of microbial water quality. *Sci Tot Environ* 651:1742-1752

4 EREIGNISBEZOGENE AUTOMATISIERTE PROBENAHME ZUR DARSTELLUNG DER MIKROBIOLOGISCHEN DYNAMIK IN KARSTQUELLEN

Christian Reszler¹, Hermann Stadler †, Regina Sommer², Wolfgang Zerobin³, Andreas H. Farnleitner^{4,5,6}

¹ JR-AquaConSol GmbH

² Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wassermikrobiologie

³ ehemals MA 31 – Wiener Wasser

⁴ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungszentrum Wasser und Gesundheit

⁵ Karl Landsteiner Privatuniversität Krems, Fachbereich Wasserqualität und Gesundheit

⁶ Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und Gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

Dieser Beitrag beschreibt ein Konzept zur Beprobung von Karstquellen im Falle von hydrologischen Ereignissen wie z. B. Starkregen (Ereignisbeprobung) hinsichtlich mikrobiologischer Parameter, um diese hoch aufgelöst zusammen mit hydrologischen Parametern analysieren zu können. Hierzu wird eine verschachtelte Probenahme („Nested Sampling“) gewählt, um die gesamte Dynamik eines Ereignisses zu erfassen. Die Ereignisbeprobung kann als Beobachtung des „worst case“ betrachtet werden, um (i) Prozesse der Karstabflussreaktion zu identifizieren, (ii) die Schutzfähigkeit eines Systems zu bestimmen und (iii) Aquifertypen zu charakterisieren. Die beschriebenen Untersuchungsmethoden sind von größter praktischer Bedeutung, um zielgerichtete Schutzmaßnahmen im Einzugsgebiet und eine optimale Wassergewinnung zur Bereitstellung einer guten Rohwasserqualität gewährleisten zu können. Die Methodik wurde am Beispiel von Karstquellen unter Verwendung des Parameters *E. coli* gezeigt. Darüber hinaus hat sie großes Potenzial, auch bei anderen Wasserressourcen angewendet zu werden (zielgerichtete Untersuchungen von Badegewässern, Monitoring unerwünschter Einleitungen in Fließgewässer etc.). Dabei können unterschiedliche Parameter als Triggersignale genutzt werden (z. B. Niederschlag, Durchfluss, Online-Glukuronidase-Messung).

4.1 Einleitung

Obwohl ereignisbezogene Untersuchungen im Bereich der Hydrologie und Hydrogeologie seit vielen Jahren zum Standardrepertoire zählen und schon früh erste Ereignisbeobachtungen (Änderungen in den hydrologischen Bedingungen) belegt sind, fehlte bei diesen weitgehend die Messung mikrobiologischer Parameter. Erst seit wenigen Jahren besteht die Möglichkeit, anhand von Zeitserien auch statistische Zusammenhänge zwischen hydrologischen und mikrobiologischen Parametern zu analysieren. Die Herausforderung an die Probenahme von mikrobiologischen Parametern besteht darin, ein Messkonzept zu entwickeln, mit dem zum Zeitpunkt von Änderungen in den hydrologischen Bedingungen Proben fachgerecht gezogen werden, sodass mit entsprechenden Probenintervallen die volle Dynamik des Ereignisses auf mikrobiologischer Seite abgebildet wird und, dass die Proben zeitgerecht in das mikrobiologische Labor geliefert werden. Der vorliegende Beitrag stellt ein Konzept für Ereignisbeprobungen bei sommerlichen Starkregenereignissen vor, mit dem Ziel, mikrobiologische Parameter für die Entwicklung von Frühwarnsystemen zugänglich zu machen. Dazu werden in-situ messbare Parameter, mikrobiologische (Feld-)Laboranalysen sowie automatisierte Probenahmetechniken kombiniert. Das Konzept wird anhand einer Quelle mit dem Einzugsgebiet bestehend aus verkarstungsfähigen Gesteinen gezeigt. Karstquellen stellen in Österreich eine wichtige Trinkwasserressource dar; ca. 50 % der Bevölkerung werden aus Karstquellen versorgt (Kralik 2001).

4.2 Fragestellungen

- Wie kann man an Quellen oder Oberflächengewässern Zeitreihen mikrobiologischer Parameter gewinnen, um die maximale mikrobiologische Belastung zu erfassen?
- Was sind die dazu geeigneten Messmethoden und -parameter?
- Welche Methoden zur Frühwarnung lassen sich aus den Daten ableiten?

4.3 Darstellung

Das Konzept wird anhand des Beispiels einer Karstquelle eines Modelluntersuchungsgebiets in den nördlichen Kalkalpen gezeigt. Abb. 7 zeigt die dabei gewonnenen und analysierten Daten (August 2009). Hydrologische Parameter (vor allem die Schüttung der Quelle), aber auch chemisch-physikalische Parameter wurden und werden online gemessen und bilden die Basis für die Ereignisanalyse bei sommerlichem Starkregen. Neben der Trübung ist der spektrale Absorptionskoeffizient bei 254 nm ein wichtiger Online-Qualitätsparameter. Der Parameter ist ein Summenparameter für organische Einträge aus dem Einzugsgebiet und in hoher Auflösung mess- und verfügbar.

Die mikrobiologischen Untersuchungen auf Basis der automatisierten Probenahmen zeigten sehr deutlich die Ereignisabhängigkeit mikrobiologischer Aktivitäten. Abhängig vom Quell- und Ereignistypus sowie der jeweiligen Situation im Einzugsgebiet (z. B. Ausmaß oberflächenverfügbarer Fäkalien) konnten starke Konzentrationsdynamiken verzeichnet werden. Häufig konnten *E. coli*-Konzentrationsanstiege an rasch reagierenden Karstquellen von 60- bis 1600-fach innerhalb weniger Stunden verzeichnet werden.

Bei den untersuchten Ereignissen können aus mikrobiologischer Sicht drei – in der Abfolge gleichbleibende – Phasen unterschieden werden (vgl. Abb. 7):

- In Phase 1 wird durch das rasche Eindringen von Oberflächenabflüssen in die Aquifere ein hydraulischer Druck auf das bereits vorhandene Grundwasser ausgeübt. Dies führt zu einem Anstieg der Schüttung und Mobilisierung von Aquifersedimenten. Letzteres zeigt sich auch in einem Anstieg der Trübung. Durch diese interne Sedimentmobilisierung und den verstärkten Abrieb von Biofilmen in den Aquiferbereichen kommt es in dieser Phase im Quellwasser daher hauptsächlich zu einer Zunahme an suspendierten natürlichen Quellwassermikroorganismen. Unmittelbar oberflächeneingetragene Mikroorganismen sind in dieser Phase nicht zu detektieren.
- In Phase 2 erreichen die von der Oberfläche eingetragenen Stoffe (z. B. DOC, Nährstoffe, Partikel, Mikroorganismen, chemische Substanzen) den Quellbereich (Stofftransport). In dieser Phase kommt es zu einem exponentiellen Anstieg von oberflächenassoziierten Mikroorganismen. Dies zeigt sich auch im markanten Anstieg des SAK254, der wie *E. coli* stark oberflächenassoziiert ist.
- Schließlich kommt es in Phase 3 bei rückgängiger Schüttung zu einem teilweise exponentiellen Rückgang von stoffbezogenen Parametern und in ähnlicher Weise von mikrobiologisch-hygienischen Parametern.
- Interessant ist im vorliegenden Beispiel (siehe Abb. 7), dass beim zweiten Ereignis am Ende des Monats zwar ein markanter Schüttungsanstieg als Reaktion auf einen kurzen Starkregen zu beobachten ist, aber sowohl die qualitätsbezogenen Parameter (SAK254 und Trübung) als auch die *E.-coli*-Anzahl nur eine geringe Dynamik zeigen. Hier dürften die Stoffe von der Oberfläche durch das erste Ereignis bereits weitgehend mobilisiert worden sein. D. h., die Intensität der mikrobiologischen Belastung ist auch abhängig von der Verfügbarkeit von Stoffen (hier Fäzes) an der Oberfläche als Input in das Karstsystem und daher auch von der Abfolge von Ereignissen in den Sommer- und Herbstmonaten.

Gemäß der Herkunft der Stoffe von der Oberfläche müsste ein Zusammenhang der Dynamik des Online-Qualitätsparameters SAK254 mit dem Auftreten von *E. coli* bestehen. Auf Basis der Daten von herkömmlichen Einzelbeprobungen konnte dieser Zusammenhang aber bislang nicht detektiert werden. Mit der Ereignisbeprobung wurde nun sichtbar, dass in einzelnen Phasen des Ereignisses (Anstieg und Rückgang) zwischen den beiden Parametern SAK254 und dem Auftreten von *E. coli* ein sehr starker Zusammenhang besteht (Abb. 8). Daraus folgt, dass der leicht zu messende Parameter SAK254 als Proxy-Parameter – anstatt der schwierig in Echtzeit zu messenden mikrobiologischen Parameter – für eine mögliche Frühwarnung hinsichtlich oberflächlicher mikrobiologischer Einträge verwendet werden kann (Stadler et al. 2010). Eine durch den Parameter SAK254 (und auch Trübung) gesteuerte Rohwassergewinnung kann daher auch die fäkale Belastung des Trinkwassers beeinflussen und geringhalten.

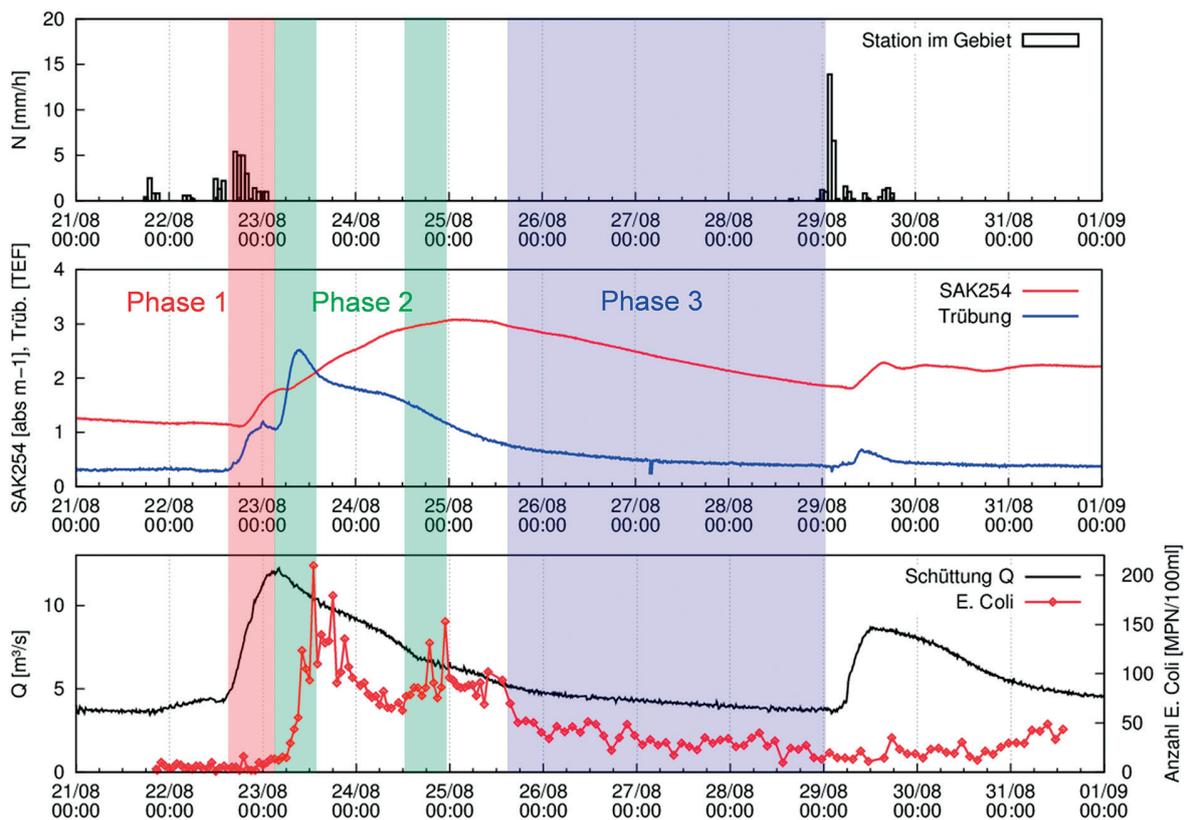


Abb. 7 Darstellung der Daten einer Ereignisbeprobung und die einzelnen Phasen der Reaktion der einzelnen Parameter. MPN steht für „Most Probable Number“ (höchstwahrscheinliche Anzahl)

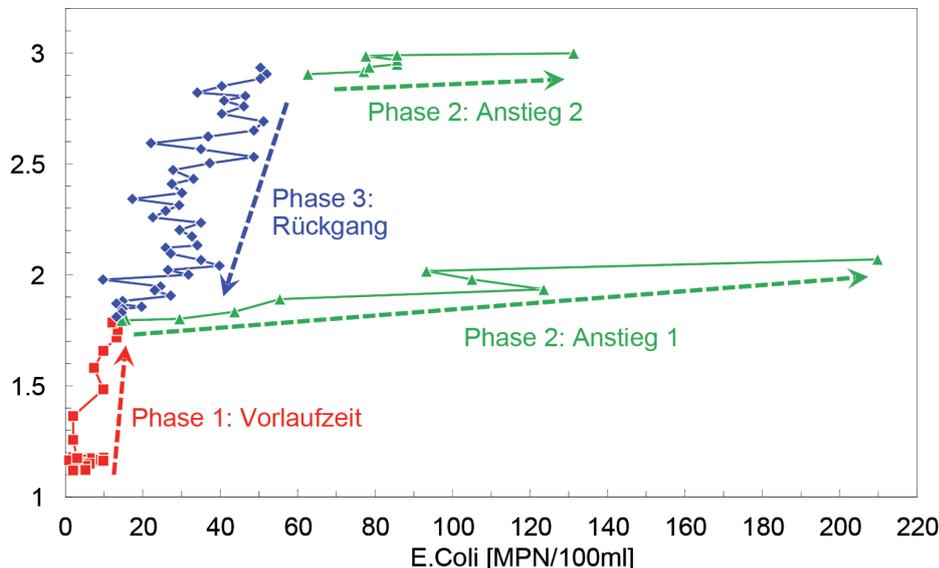


Abb. 8 Zusammenhang zwischen der Anzahl an *E. coli* und dem SAK254 in einzelnen Phasen des Ereignisses (siehe Abb. 7, Stadler et al. 2010). Die Pfeile zeigen den Verlauf während der Phasen.

4.4 Schlussfolgerung

- Das vorgestellte Konzept der automatisierten Ereignisbeprobung an Quellen ermöglicht die Erfassung der Dynamik mikrobiologischer Parameter über ein gesamtes hydrologisches Ereignis. Sie kann als Beobachtung des „worst case“, d. h. maximale mikrobiologische Belastung bei einem Starkregenereignis, betrachtet werden.

- Die Zeitreihen ermöglichen eine detaillierte Analyse zusammen mit hydrologischen Parametern, die in hoher Auflösung verfügbar sind.
- Ziel der Analysen ist es, (i) Prozesse zu identifizieren (Systemerkundung), (ii) die Schuttfähigkeit eines Systems zu bestimmen (Herkunft der Inhaltstoffe, Verweilzeiten) und (iii) Aquifertypen (Fließwege etc.) zu charakterisieren.
- Der online gemessene spektrale Absorptionskoeffizient (SAK) bei 254 nm kann als Proxy-Frühwarnparameter für fäkale Einträge verwendet werden.
- Die Methodik wurde am Beispiel von Karstquellen unter Verwendung des Parameters *E. coli* gezeigt. Sie ist übertragbar auf weitere Anwendungen, etwa in Oberflächengewässern (z. B. Badeschwämmern), und unter Verwendung neuer, in Entwicklung befindlicher Geräte mit einer entsprechenden Erweiterung der gemessenen Parameter.
- Die beschriebenen Arbeiten sind Teil eines integrativen Ansatzes durch Kombination von Methoden der Hydrologie, Hydrogeologie und Mikrobiologie. Daraus können Empfehlungen für das Mengen- und Qualitätsmanagement von zur Trinkwassergewinnung verwendeten Karstquellen erarbeitet werden (Farnleitner et al. 2017).

4.5 Detailmethodik

Neben den hydrogeologischen Rahmenbedingungen (Dauer und Intervall der Untersuchung, gewählte Jahreszeit etc.) muss die an Karstquellen sehr ausgeprägte Abflussdynamik einhergehend mit einer raschen Änderung der Qualitätsparameter auch von mikrobiologischen Quelluntersuchungen berücksichtigt werden. Die beschriebene Methodik beruht auf dem Konzept der verschachtelten Probenahme („Nested Sampling“, Farnleitner et al. 2011). Neben der Basisbeprobung (z. B. vierteljährlich oder monatlich) und der Beprobung mit einer höheren Frequenz in definierten Projektzeiträumen (z. B. Schneeschmelze), wird die automatisierte Probenahme bei kurzfristigen vordefinierten Änderungen im hydrologischen Verhalten gestartet. Der Start der Probenahme kann anhand verschiedener Triggerkriterien erfolgen. Zum Beispiel wurde im vorliegenden Fall bei Überschreiten einer vordefinierten Niederschlagsintensität eine Nullprobe, also eine Probe vor Beginn des Ereignisses, an der Quellstation entnommen. Eine maßgebliche Niederschlagsstation wurde ebenfalls online übertragen, um das Niederschlagsereignis verfolgen zu können. Bei Erreichen des zweiten Triggerkriteriums, ein entsprechender Schüttungsanstieg an der Quelle, wurde die eigentliche kontinuierliche Beprobung mittels eines zweiten Probennehmers im definierten Intervall gestartet. Die Steuerung erfolgte dabei über eine zentrale Station, wo die Daten gesammelt wurden. Im vorliegenden Konzept wurden sogenannte LEOS (Low Earth Orbiting Satellites) als Kommunikationsschiene zwischen den Stationen (Niederschlagsstation und Quelle) gewählt, da diese auch sehr enge alpine Täler lückenlos abdecken und keinerlei terrestrische Kommunikationsinfrastruktur benötigen (Stadler et al. 2008).

Die automatisierte mikrobiologische Probenentnahme wurde für den Parameter *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt. Dieser Parameter ist erstens ein für alpine Karstwasserressourcen hervorragend geeigneter Parameter zur Erfassung mikrobiologischer Fäkaleinträge und zweitens direkt vor Ort mittels feldtauglicher Analysemethoden bestimmbar. Prinzipiell ist diese automatisierte Probenentnahmetechnik bei entsprechend ausgestatteten Geräten jedoch auch auf andere mikrobielle Parameter übertragbar. Die dafür notwendigen Proben wurden anhand automatisierter Probennehmer in sterilen 100-ml-Gefäßen gezogen und nach maximal 24 h Lagerung bei In-situ-Quellwassertemperatur (5 bis 6 °C) analysiert (Colilert-18 Verfahren; IDEXX, USA [42]). Reduktionen der *E.-coli*-Konzentrationen, d. h. Absterben der Fäkalindikatoren, aufgrund von (unterschiedlich langer) Lagerung wurden anhand dafür eigens ermittelter Reduktionskoeffizienten korrigiert. Aus den Quellwasserproben wurde ermittelt, dass sich die Koloniezahlen von *E. coli* bei Lagerung im Schnitt alle 5 bis 7 Tage auf die Hälfte reduzierten. In weiterführenden Arbeiten wurden auf Basis der gewonnenen Ereignisproben Methoden zur Herkunftsbestimmung fäkaler Einträge mittels genetischer Marker entwickelt (Mikrobielles Source Tracking – MST, Reischer et al. 2011).

Technisch wurde die automatisierte Probenahme mit Bühler-Probennehmern (PB MOS) durchgeführt. Die Entnahme erfolgte im Vakuumprinzip, sodass das Probenmedium nur mit dem Saugschlauch, dem

Dosiergefäß und den Verteilern in Berührung kommt. Saugschlauch und Dosiergefäß wurden vor jeder Probenahme gespült und ausgeblasen, sodass eine Beeinflussung zwischen aufeinander folgenden Proben weitgehend verhindert werden konnte.

4.6 Referenzarbeiten

Farnleitner AH, Reischer GH, Stadler H, Kollanur D, Sommer R, Zerobin W, Blöschl G, Barrella KM, Truesdale JA, Casarez EA, Di Giovanni GD (2011): Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies. Chapter 18 – Agricultural and Rural Watersheds. In: Hagedorn C, Haarwood J, Blanch A (eds), Springer – New York. pp 399-432.

Farnleitner AH, Savio D, Sommer R, Reischer G, Kirschner A, Zerobin W, Stadler H (2017): Integrated strategy to guide health-related microbial quality management at alpine karstic drinking water resources. In: White WB (ed), Karst Groundwater Contamination and Public Health. Springer, Cham. 2018. pp 185-192.

Kralik M (2001): Strategie zum Schutz der Karstwassergebiete in Österreich. Bericht BE-189, Umweltbundesamt, Wien. ISBN 3-85457-585-8. Reischer GH, Kollanur D, Vierheilig J, Wehrspaun C, Mach R, Stadler H,

Sommer R, Farnleitner AH (2011): A hypothesis-driven approach for the identification of fecal pollution sources in water resources. *Environ Sci Technol* 45:4038-45.

Stadler H, Skritek P, Sommer R, Mach RL, Zerobin W, Farnleitner AH (2008): Microbiological monitoring and automated event sampling at karst springs using LEO-satellites. *Wat Sci Technol* 58:899-909.

Stadler H, Klock E, Skritek P, Mach RL, Zerobin W, Farnleitner AH (2010): The spectral absorption coefficient at 254 nm as a real-time early warning proxy for detecting faecal pollution events at alpine karst water resources. *Wat Sci Technol IWA Publishing*. 62:1898-1906.

5 ANTIBIOTIKARESISTENZ IN OBERFLÄCHENGEWÄSSERN: HERKUNFT UND AUSBREITUNG

Clemens Kittinger¹, Gernot Zarfel¹

¹ Medizinische Universität Graz, Diagnostik- & Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

Antibiotikaresistenzgene und antibiotikaresistente Bakterien sind in so gut wie allen Oberflächengewässern zu finden. Die dort gefundenen Gene und Bakterien können im Rahmen von Monitoring Programmen zur Abschätzung der epidemiologischen Situation, aber auch zur Bewertung des potenziellen Risikos für die menschliche Gesundheit genutzt werden. Dafür ist aber eine ausreichende Information über Ausbreitung, Verteilung und Persistenz der untersuchten Resistenzmechanismen und Bakterien notwendig.

In dieser Studie konzentrierten wir uns auf Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) als einen der klinisch wichtigsten Resistenzmechanismen. Zu diesem Zweck wurden ESBL-bildende *Enterobacteriaceae* (hauptsächlich *Escherichia coli*) aus dem Fluss Mur und aus einer Kläranlage, die in den Fluss entwässert, isoliert. Diese Isolate wurden mit klassischen Methoden wie Antibiotika-Empfindlichkeitstests und modernen Methoden wie Sequenzierung und Stammtypisierung auf ihren epidemiologischen Hintergrund untersucht. Zusätzlich wurden sie mit klinischen Isolaten verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass klinisch bedeutsame Resistenzgene und Klone auch in der Kläranlage und dem Fluss zu finden waren, diese aber in den dortigen Populationen nicht dominierten. Das Vorhandensein einer großen Anzahl verschiedener (konjugativer) Plasmide in den Isolaten ist ebenfalls ein Indikator für die hohe Mobilität der genetischen Information, die auch für ein breites Spektrum von Resistenzen verantwortlich ist.

5.1 Einleitung

Die vom Menschen verursachten Antibiotikaresistenzen sind eine der großen Herausforderungen für die Medizin im 21. Jahrhundert [43, 44]. Dabei sind die Auswirkungen dieser Entwicklung nicht nur in medizinischen Einrichtungen und bei erkrankten Personen zu beobachten. Die Ausbreitung von Bakterien, die Resistenzen tragen, wurde in den letzten Jahrzehnten zunehmend auch in der Umwelt insbesondere in Oberflächengewässern beobachtet [45–47]. Selbst Bakterien, die Resistenzen gegen Reserveantibiotika entwickelt haben, werden in Flüssen und Seen zunehmend häufiger gefunden. Einer der wichtigsten Resistenzmechanismen in der Humanmedizin seit den 1990er-Jahren ist der von Beta-Laktamasen mit erweitertem Spektrum (ESBL) [44, 46]. Diese Enzyme finden sich vor allem in Organismen, die den menschlichen oder tierischen Darm besiedeln und so über Ausscheidungen in Oberflächengewässer gelangen.

Es gibt Hunderte von verschiedenen ESBLs und mehr als ein Dutzend bekannte Beta-Laktamasen-Enzym-Familien. ESBL-produzierende Bakterien, die in verschiedenen Gebieten vorkommen, werden auch von unterschiedlichen Enzymtypen dominiert. Während das CTX-M-15-Enzym in klinischen Isolaten stark dominiert, ist CTX-M-15 in Isolaten von Nutztieren praktisch nicht vorhanden [44]. Bei Schweinen ist das Enzym CTX-M-1 stark verbreitet, während bei Geflügel neben CTX-M-1 auch SHV-12 co-dominiert [48]. Auch der Stammhintergrund ist unterschiedlich. *Klebsiella* spp sind auf den Intensivstationen eine der häufigsten gefundenen ESBL tragenden Bakterien, während im nicht ambulanten Bereich *E. coli* stark dominiert. Insbesondere der Multilocus-Sequenztyp (MLST) ST131 von *E. coli* ist dabei weltweit besonders stark vertreten [44].

Daher kann die Zusammensetzung von Isolaten bzw. die aufgefundenen Resistenzgene aus Oberflächengewässern auch etwas über die Quellen aussagen und darüber hinaus aber auch, je nach Entfernung zu potenziellen Quellen, über das Überleben von verschiedenen ESBL-Resistenzen in Oberflächengewässern. In weiterer Folge können diese Informationen auch dazu beitragen, die Gesundheitsrisiken für den Menschen abzuschätzen. Um die genaue Herkunft resistenter Bakterien und Resistenzmechanismen zu be-

stimmen, reicht die rein phänotypische Bestimmung der Resistenz meist nicht aus. Für die Untersuchung nosokomialer (d. h. krankenhausessoziierter) Ausbrüche wurde eine Reihe neuer Methoden entwickelt, mit denen sich sowohl auf globaler Ebene als auch bei einzelnen Ausbrüchen in Gesundheitseinrichtungen epidemiologische Zusammenhänge gut verfolgen lassen. Diese Methoden lassen sich ebenso auf Isolate aus Oberflächengewässern anwenden. Methoden wie MALDI-TOF (eine massenspektrometrische Analyseverfahren) [49] erleichtern die Stammidentifizierung und reduzieren (bei korrekter Durchführung) die Fehlerquote, sind aber gegebenenfalls noch mit klassischen Methoden zu ergänzen.

Die Multi-Locus-Sequenztypisierung auf der Grundlage von DNA-Sequenzinformationen, auch in ihrer verbesserten Form der Kerngenom-MLST, bei der das gesamte Genom des Bakteriums sequenziert wird, bringt enorme Vorteile, insbesondere, wenn sie mit globalen Datenbanken verknüpft wird. Dabei sorgt eine gute Datenlage, vor allem von klinischen Isolaten, für die Möglichkeit, die Ergebnisse aus den Oberflächengewässern in das epidemiologische Umfeld einzuordnen.

Die Gene, die für ESBL-Resistenzen codieren, liegen oft auf genetischen Elementen außerhalb des eigentlichen bakteriellen Chromosoms, den sogenannten Plasmiden. Diese Plasmide können von Bakterium zu Bakterium durch Konjugation weitergegeben werden. Auch Plasmide kann man mithilfe von genetischen Markern unterscheiden und in Gruppen einteilen. Die häufigste Methode bei ESBL tragenden Plasmiden ist die Einteilung über die Genabschnitte, die für die Vermehrung der Plasmide nötig sind, die Replikon-Typen [50].

Prinzipiell ist wie bei klinischen Studien die Methode je nach Fragestellung zu wählen.

5.2 Fragestellungen

- Was sind die genotypischen und phänotypischen Merkmale von ESBL-tragenden Isolaten aus der Mur und aus einleitenden Kläranlagen?
- Welche (epidemiologischen) Verbindungen können von Umweltstämmen zu klinischen Isolaten mit ESBL-Resistenzmechanismus gezogen werden?

5.3 Darstellung

Es wurde *E. coli* als Studienobjekt ausgewählt, da *E. coli* sowohl als einer der häufigsten (fakultativen) Infektionserreger in der Medizin als auch als klassischer Leitkeim in der Wasserhygiene eine wichtige Rolle spielt (Zarfel et al. 2017, 2013). Für erste Studien wurden die Isolate aus der Kläranlage der Stadt Graz im Jahr 2009 entnommen, die Vergleichsisolate aus klinischen Proben wurden im gleichen Zeitraum vom Institut für Hygiene der Medizinischen Universität Graz gesammelt (Zarfel et al. 2013). Die Isolate der zweiten Studie wurden im Oktober, November und September 2015 und im Jänner 2016 direkt aus der Mur im Zentrum von Graz (Keplerbrücke, rechtes Murofer) entnommen (Zarfel et al. 2017).

Die Gene, die für CTX-M-15 kodieren, waren in allen Proben die häufigste Form von ESBL, aber die Dominanz war bei den Isolaten aus Oberflächenwasser deutlich geringer als bei den klinischen Isolaten: 46 % der ESBL *E.-coli*-Isolate aus der Mur und 44 % der ESBL *E.-coli*-Isolate aus der Kläranlage im Vergleich zu 76 % bei den untersuchten klinischen ESBL *E.-coli*-Isolaten trugen das CTX-M15 Gen. Inwieweit das höhere Vorkommen von CTX-M-1 in den Umweltproben als in den klinischen Proben auf einen Eintrag aus der Tierzucht zurückzuführen ist, lässt sich allein auf der Grundlage dieser Studie nicht klären. Betrachtet man die Verwandtschaft oder Klonalität der Isolate, so zeigen die Isolate aus den Oberflächengewässern eine höhere genetische Vielfalt. Auffallend ist auch, dass die Umwelt-Isolate, die den klassischen klinischen Isolaten am ähnlichsten sind, die anzahlmäßig größten klonalen Cluster bilden. Diese Cluster treten aber seltener (meist nur einmal) an verschiedenen Probenorten auf.

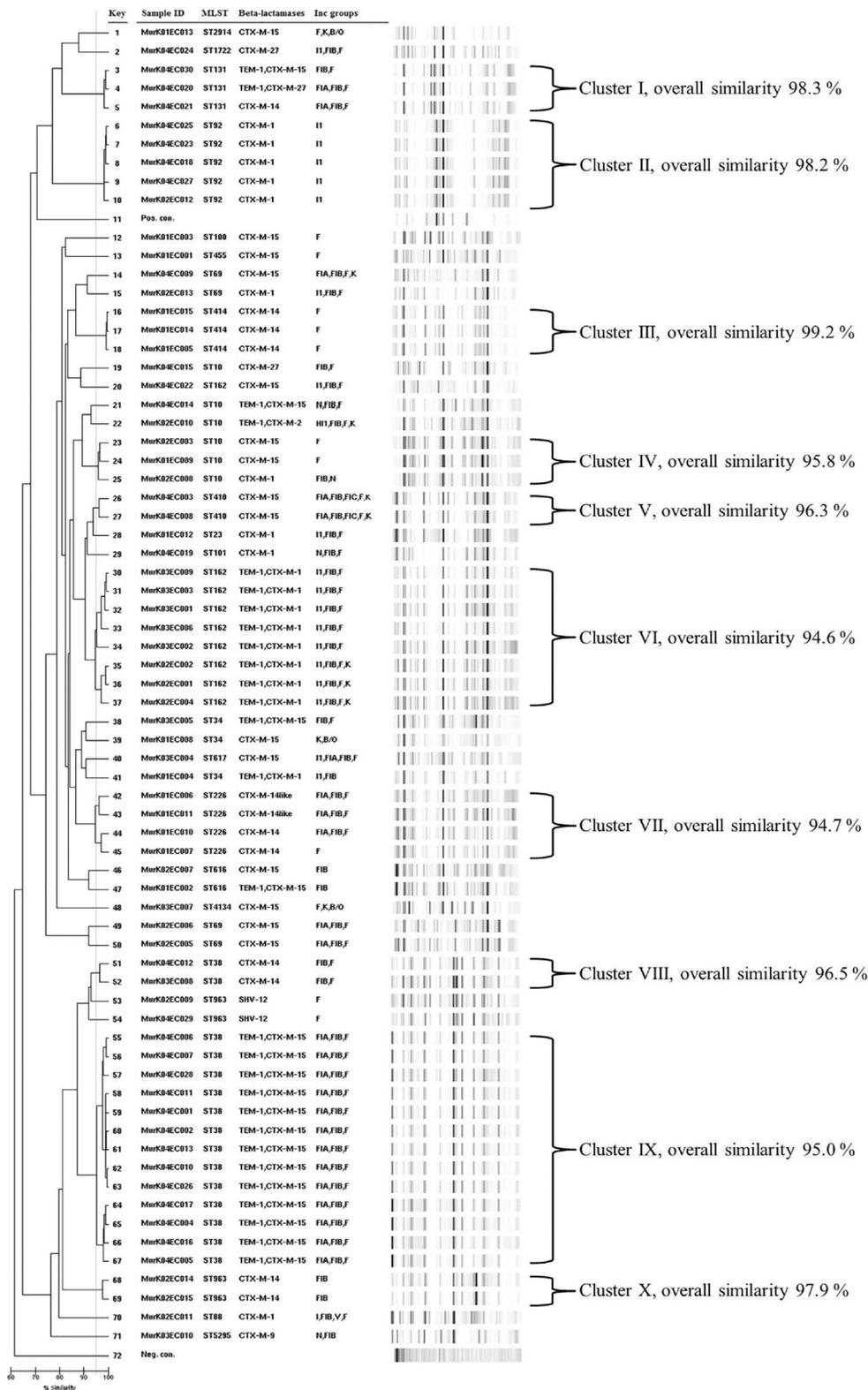


Abb. 9 DiversiLab-Dendrogramm, einschließlich der nachgewiesenen Beta-Laktamase-Gene und Plasmid-Inc-Gruppen, aller 70 isolierten *E. coli*-ESBL. Das Dendrogramm wurde mithilfe der Pearson-Korrelation berechnet inklusive einer DiversiLab Positiv- (Pos. con.) und Negativkontrolle (Neg. con.) für den *E. coli*-Kit. Die Isolierung begann im Oktober 2015 mit Murk01-Isolaten, gefolgt von November mit den Murk02-Isolaten, im Dezember mit den Murk03-Isolaten und den Isolaten vom Januar 2016, den Murk04-Isolaten. Die beiden größten Cluster mit CTX-M-1 (Cluster II und Cluster VI) enthalten Isolate aus mehreren Probenahmen. Der große Cluster IX mit CTX-M-15 enthält nur Isolate, die im Januar 2016 gesammelt wurden. Die bessere Auflösung des DiversiLab-Systems im Vergleich zur MLST-Typisierung zeigt sich bei ST38, der sowohl in Cluster VIII als auch in Cluster IX vorkam, und bei ST963, der in Cluster X vorkam, aber auch zwei Isolate enthielt, die keinem Cluster zugeordnet werden konnten.

Dies deutet darauf hin, dass die Klone erst kürzlich in das Oberflächenwasser in einer hohen Keimzahl eingebracht wurden. Klone, die über mehrere Monate in der Probensammlung auftauchten, zeigen öfters abweichende Resistenzgene und Antibiotogramme (Abb. 9). Dies deutet leider auch darauf hin, dass die Trennschärfe der Rep PCR, die eindeutig höher ist als alle anderen in diesen Studien verwendeten Methoden, bei diesen Isolaten an ihre Grenzen stößt. Die Möglichkeiten der Ganzgenomsequenzierung könnten hier aber in Zukunft Abhilfe schaffen. Bei den Untersuchungen auf Plasmidebene zeigte sich das Vorhandensein von mehr als einem Plasmid in der Mehrzahl der Isolate. Seltene Replikon-Typen waren in den Oberflächenwasser-Isolaten häufiger als bei klinischen Isolaten, aber die dominierenden Plasmide waren durchwegs Plasmide des Typs F, die in über 90 % aller Oberflächenwasser-Isolate und allen klinischen Isolaten gefunden wurden (Abb. 9).

5.4 Schlussfolgerungen

- Klinisch bedeutsame Klone wurden sowohl in Flüssen und als auch in der Kläranlage gefunden.
- Im Vergleich zu den klinischen Isolaten kam es zu einer Verschiebung der vorherrschenden Merkmale wie dominante Stämme, Co-Resistenz und ESBL-kodierende Gene; dieser Shift war bereits in der Kläranlage zu beobachten.
- Das Vorhandensein von – von Bakterien zu Bakterien übertragbaren (konjugativen) – Plasmiden wurde bei allen Isolaten festgestellt, wobei die Mehrheit der Isolate drei oder mehr verschiedene Plasmide trug. In dieser Hinsicht gab es kaum einen Unterschied zwischen klinischen Isolaten und Isolaten aus dem Wasser.
- Die Anpassung der ESBL-Resistenz bei *E. coli* in Oberflächengewässern scheint in erster Linie über den Stammhintergrund zu erfolgen, zum einen durch das Überleben der besser angepassten Stämme und zum anderen durch die Übertragung der resistenztragenden Plasmide auf eben solche Stämme.

5.5 Detailmethodik

5.5.1 Klassische Methoden

Die Isolierung von ESBL-produzierenden Enterobacteriaceae erfolgte auf einem für klinische Proben entwickelten ChromID™-Agar. Agardiffusionstests wurden zur phänotypischen Bestimmung von Resistenzprofilen verwendet, einschließlich des ESBL-Bestätigungstests gemäß CLSI.

5.5.2 Moderne Methoden

Die Identifizierung auf Artniveau erfolgte mit der MALDI-TOF-Methode. Bei der genetischen Analyse wurden acht verschiedene Familien von ESBL-Enzymen mittels PCR untersucht. Die PCR-Produkte wurden sequenziert, um das genaue Enzym zu bestimmen. Multiplex-PCR wurde zur Typisierung der Plasmidreplikontypen verwendet (50). Das Vorhandensein eines Plasmids mit einem Replikon-Typ/Inc-Gruppe erlaubt es nicht, dass ein zweites Plasmid desselben Typs dauerhaft in der Bakterienzelle vorhanden ist, daher kann mit dieser Methode gut die Anzahl der vorhandenen Plasmide (sowie deren genetische Einordnung) erfasst werden. Der Stammhintergrund wurde mit MLST geklärt. Das verwendete MLST-Schema basiert auf der Sequenzierung von sieben Housekeeping-Genen (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA*). Das Diversilab-Replicon-Typing-System, basierend auf dem Rep-PCR-Prinzip, wurde zur genaueren Verwandtschaftsbestimmung der Isolate durchgeführt. Dabei wurden die Abstände zwischen repetitiven Sequenzen in den Genomen mittels PCR nachgewiesen. Diese Abstände ändern sich, wenn Veränderungen im Genom eines Bakteriums auftreten. Bei eng verwandten Stämmen ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass sie sich stark verändern und sich die Abstände zwischen den Genen unterscheiden als bei weniger verwandten Stämmen. Daher können die entdeckten Fragmente verwendet werden, um ein Verwandtschafts-Dendrogramm zu berechnen und den Prozentsatz der gemeinsamen Identität anzugeben. Die gleiche Berechnung kann mit dem PhenePlate-System durchgeführt werden, allerdings auf der Grundlage der Nutzung bzw. Nicht-Nutzung von verschiedenen Kohlenstoffquellen [51, 52].

5.6 Referenzarbeiten

Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, et al. (2013): Comparison of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut* 173:192-199.

Zarfel G, Lipp M, Gurtl E, Folli B, Baumert R, Kittinger C (2017): Troubled water under the bridge: Screening of River Mur water reveals dominance of CTX-M harboring *Escherichia coli* and for the first time an environmental VIM-1 producer in Austria. *Sci Tot Environ* 593/594:399-405.

6 EUTROPHIERUNG, TOXISCHE CYANOBAKTERIEN AM BEISPIEL DES URBANEN DONAU-ALTARMGEWÄSSERS ALTE DONAU UND DES ALPINEN MONDSEES

Katrin Teubner¹, Martin T. Dokulil², Rainer Kurmayer²

¹ Universität Wien, Department für Funktionelle und Evolutionäre Ökologie,

² Universität Innsbruck, Wassermikrobiologie, Forschungsinstitut für Limnologie, Mondsee

Die durch den Menschen bedingte Einbringung von Nährstoffen in die Gewässer (Eutrophierung) ist oft an eine Massenentwicklung des Phytoplanktons gekoppelt. Es zeigt sich darüber hinaus die Tendenz, dass bei zunehmender Eutrophierung der Anteil der Cyanobakterien am Phytoplankton zunimmt. Detaillierte Untersuchungen haben ergeben, dass für viele Cyanobakterien, wie bspw. *Planktothrix rubescens* (Burgunderblutalge), die Cyanotoxinkonzentration und die Biomasse des jeweiligen cyanotoxinbildenden Cyanobakteriums miteinander statistisch signifikant korrelieren. Damit kann man davon ausgehen, dass bei einer erheblichen Eutrophierung und nachfolgend massenhafter Bildung von Cyanobakterien, das Gewässer zugleich mit Cyanotoxinen belastet ist. Dies bewirkt Änderungen im Nahrungsnetz im Seen-Ökosystem und vermindert zugleich die Nutzung eines solchen Gewässers als Trinkwasser-Ressource sowie Erholungsgewässer. Die beiden hier besprochenen Fallbeispiele, d. h. die Alte Donau in Wien und der Mondsee im Salzkammergut, haben eine prägnante Eutrophierungsperiode durchlaufen, welche mit Massenentwicklungen von Cyanobakterien verbunden waren. Die Maßnahmen um der Eutrophierung entgegen zu wirken, waren jedoch in diesen beiden Fallbeispielen verschieden. Während man in der Alten Donau über ein künstliches Ausfällen des kritischen Nährelementes Phosphor die Phytoplanktonbiomasse abrupt reduzierte und mit nachfolgenden Maßnahmen (Ansiedlung von Unterwasserpflanzen und Röhrichtpflanzen) einen langfristig-nachhaltigen Sanierungserfolg garantierte, setzte man im Mondsee auf ein striktes Unterbinden des unkontrollierten Nährstoffeintrags (Ringkanalisation) und überließ den See nachfolgend seinen Selbstreinigungsprozessen.

6.1 Einleitung

Die Eutrophierung, d. h. die durch den Menschen bedingte Einleitung von Nährstoffen, und das Wachstum von Phytoplankton in Gewässern hängen ursächlich miteinander zusammen, da die Nährstoffe die Basis für das Wachstum jener Primärproduzenten darstellen. Der Nährstoffeintrag durch den Menschen, der über eine natürliche Eutrophierung wie z. B. bei der Verlandung eines Sees hinausgeht, verändert das natürliche Gefüge in einem stehenden aquatischen Ökosystem. So sind allgemein natürlich-nährstoffarme Gewässer von einer guten Transparenz des Wassers aufgrund geringer Mengen an Schwebstoffen, wie z. B. den Algen, charakterisiert. Im Gegensatz dazu wird ein übermäßiger Nährstoffeintrag von Phytoplankton-Massenentwicklungen begleitet, wobei sich hier insbesondere problematische Cyanobakterien entwickeln können.

6.2 Fragestellung

- Welche Nährstoffe bedingen ein übermäßiges Phytoplanktonwachstum?
- Wie setzte sich das Phytoplankton in dem flachen Altarm Alte Donau und dem Mondsee während der Eutrophierung zusammen?
- Wie hoch ist der Anteil der Cyanobakterien am Gesamtbiovolumen des Phytoplanktons in dem jeweiligen Gewässer und welche potenziellen Gefahren gehen insbesondere von ihnen aus?

6.3 Darstellung

6.3.1 Rolle der kritischen Nährstoffe im Gewässer

Das kritische Nährelement im Süßwasser ist meist der Phosphor (P), und weniger der Stickstoff (N) oder das Silizium (Si) (ein optimales Wachstum des Phytoplanktons ist bei Vorliegen der molaren Nährstoffrelation von N : P : Si = 16 : 1 : 17 gegeben) (Teubner et al. 1999, 2003; Teubner und Dokulil 2002). Daher ergibt sich eine Zunahme der Phytoplanktonbiomasse insbesondere dann im Süßwasser, wenn die wachstumsbegrenzenden Konzentrationen von Phosphor sich erhöhen. Wegen des Hintergrunds eines exponentiellen Wachstums der Algen, d. h. einer Zunahme des Biomasseertrags (Zellteilungen) gesteuert vom Nährstoffangebot, werden bei einer grafischen Darstellung beide Größen, d. h. die Algenbiomasse $f(x)$ in Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration $[x]$ logarithmisch abgebildet (Abb. 10). Die Algenbiomasse wird hierbei entweder über den Chlorophyll-a-Gehalt des Phytoplanktons (Arbeitsbehelf 52, Teil 1, Kapitel 2.3.2.3; chemische Extraktion s. ÖNORM M 6231 [53] bzw. algologische Pigmentanalyse, z. B. HPLC, Greisberger und Teubner 2007) oder das Phytoplankton-Biovolumen abgeschätzt (Abb. 11). Eine allgemeine Beschreibung zur mikroskopischen Erfassung des Biovolumens von Phytoplankton ist in Utermöhl [54] gegeben.

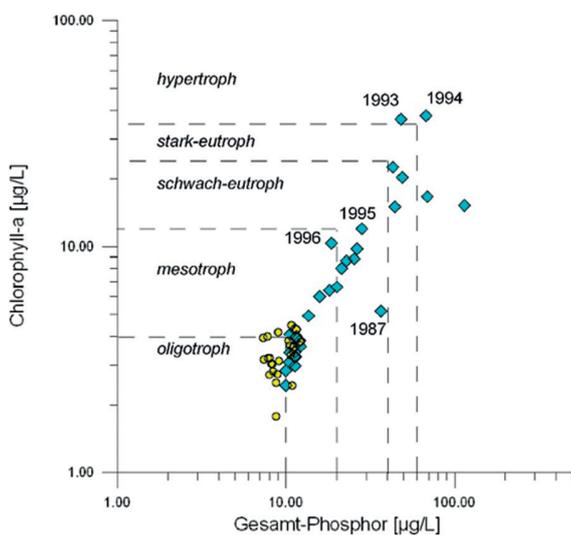


Abb. 10 Chlorophyll-a-Konzentration in Abhängigkeit von der Gesamt-Phosphorkonzentration für die beiden Fallbeispiele Alte Donau (1987–2019, Symbol: blaue Rhomben; 1987 bereits mit höheren Gesamt-Phosphorwerten bei relativ niedrigem Chl-a-Wert zu Zeiten der Unterwasser-Characeen-Rasen; Cyanobakterienblüten in den hypertrophen Jahren 1993 und 1994 gaben Anlass zur Sanierung, 1995 und 1996 zeigen die beiden Sanierungsjahre der chemischen RIPOX-Phosphatfällung) und Mondsee (1982–2003, Symbol: gelbe Kreise). Der Gesamt-Phosphor wird als Nährstoffpool für das Phytoplanktonwachstum betrachtet, die Konzentration von Chlorophyll-a als Maß für die Phytoplankton-Biomasse. Bei diesem Trophie-Klassifikationsschema werden Jahresmittelwerte gezeigt (Grenzwerte siehe Tab. 1). Man beachte die logarithmische Skalierung beider Achsen (Erklärung siehe exponentielles Wachstum des Planktons im Text).

Bei den beiden hier genannten Fallbeispielen, der Alten Donau, einem abgeschnittenen Altarm der Donau in Wien, und beim alpinen Mondsee im Salzkammergut, kam es jeweils über viele Jahre zu einer Eutrophierung infolge eines massiven Phosphoreintrags. Während in der Alten Donau der Phosphatgehalt über eine aktive Sanierung reduziert wurde (Phosphatfällung und nachfolgende Biomanipulationsmaßnahmen zur Restaurierung des städtischen Erholungsgewässers, Teubner et al. 2003; Dokulil et al. 2018), ergab sich für den Mondsee die Reduktion des Phosphors alleine durch eine strikte Verhinderung eines weiteren Phosphateintrags. Letzteres wurde mit dem Bau einer Ringkanalisation und nachfolgend durch das natürliche Ausdünnen dieser Nährstoffressource für die Algen erreicht [55] (Dokulil und Teubner 2005, 2012; Jeppesen et al. 2005) [56].

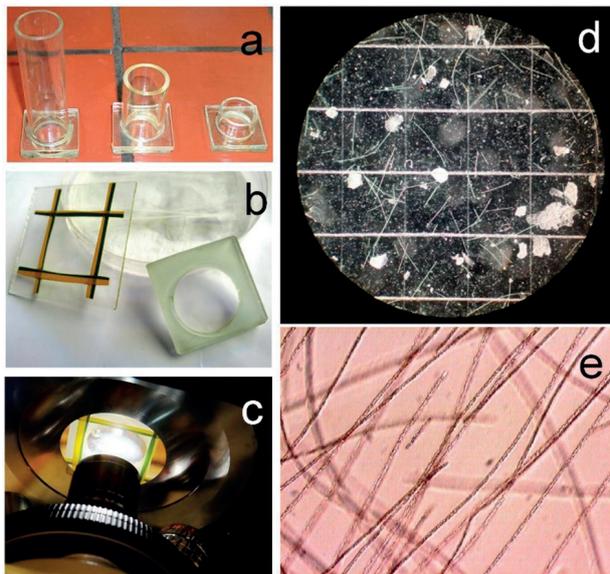


Abb. 11 Mikroskopisches Abschätzen des Biovolumens vom Phytoplankton, Bsp. *Planktothrix rubescens*, Mondsee: Eine mit „Lugol’scher Lösung“ fixierte Seewasserprobe wird in eine Sedimentationskammer gefüllt (die Menge des untersuchten Wasservolumens ist somit definiert). Dabei wird in hohen Kammern (a: 100 mL, 50 mL, 10 ml) das Algenmaterial einer größeren Probenmenge als in einer flachen Kammer angereichert (b: 2 mL). Nach der Sedimentation der Algen am Kammerboden erfolgt die Auszählung unter dem Mikroskop (c), wobei sich auf ein Raster in der Sedimentationskammer (c, d) oder in der Optik des mikroskopischen Strahlengangs bezogen wird. Somit müssen nicht die sedimentierten Algen der gesamten Probe gezählt werden – es genügt, einen Teil der Wasserprobe definiert zu erfassen. Bei großen Phytoplanktern, wie den langen Fäden von *P. rubescens*, werden große Rasterflächen der Zählkammer bei einer relativ geringen Vergrößerung ausgezählt (d: z. B. 20-fach jeweils ein Block von vier einzelnen Rasterfeldern). Bei kleinen Zellen werden einzelne Rasterfelder bei hoher mikroskopischer Vergrößerung ausgewertet (d: z. B. diagonal der Kammerfläche 20 Rasterfelder). Dabei werden so viele Rasterflächen je Algenart gezählt, bis ein statistisch abgesichertes Zählergebnis vorliegt, d. h. je Algenart etwa „unabhängige“ 100 Zählereignisse (Zellen, Fäden, Kolonien) erfasst wurden. Zugleich wird die Größe der Algen mikroskopisch vermessen (μm -Dimension, dient der Berechnung des Verdrängungs-Biovolumens). Über das definierte Probenvolumen kann aus der Zahl der Zählereignisse die Abundanz je L je Algenart berechnet werden. Bei zusätzlichem Erfassen der mikroskopischen Dimension ergibt sich analog das Biovolumen in mm^3 je L für eine jeweilige Algenart. Für die Bestimmung des Biovolumens von *P. rubescens* (e) wird die Anzahl der Fäden gezählt und das (Verdrängungs-) Biovolumen anhand der Zylinderformel berechnet. Für letztes wird mikroskopisch die Länge der Einzelfäden (sehr variabel) sowie deren Breite (relativ enger Schwankungsbereich) mikroskopisch vermessen und als mittlere Länge und Breite in die Zylinderformel eingesetzt (Fotos: K. Teubner).

In der Alten Donau gab die Massenentwicklung des kürzlich in Europa sich weiter verbreitenden subtropischen Cyanobakteriums *Raphidiopsis raciborskii* (syn. *Cylindrospermopsis raciborskii*) (Dokulil 2016) und der damit befürchteten Toxinbildung [57] des städtischen Erholungsgewässers in Wien, den letzten Stein des Anstoßes zur Gewässersanierung. Ein weiteres toxisches Cyanobakterium, welches häufiger in den nachfolgend weniger dramatischen Eutrophierungsperioden auftrat, war das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* (Netzblualge). Im Mondsee verursachte eine intensive burgunderrote Färbung des Wassers aufgrund der Massenentwicklung des Cyanobakteriums *Planktothrix rubescens* (Burgunderblutalge) ein Nachdenken über eine Nährstoffreduktion, da die Badewasserqualität in der beliebten Tourismusregion Mondseeland dramatisch gefährdet war (Abb. 12, siehe auch [56]). Im Gegensatz zu den zuerst genannten Cyanobakterien, *Raphidiopsis raciborskii* und *Microcystis* spp, ist *Planktothrix rubescens* ein typischer Plankter in den tiefen alpinen Seen im schwach-mesotrophen Nährstoffzustand (siehe Mondsee in Abb. 10). Dieses Cyanobakterium vermehrt sich insbesondere in den tiefen Wasserschichten, dem Metalimnion (Abb. 13). Im Mondsee wuchs dieses Cyanobakterium im Zuge der übermäßigen Nährstoffanreicherung dann jedoch nicht mehr ausschließlich in der Tiefe, sondern wurde auch in die oberen Wasserschichten (Epilimnion) während der thermischen Schichtung im Sommer eingespült. Damit verlieh *P. rubescens* dem gesamten Wasserkörper die für dieses Cyanobakterium typische burgunderrote

Farbe. Die Farbe resultiert aus dem zellulären photosynthetischen Pigment Phycoerythrin, welches als Anpassung an die grünen Schwachlichtverhältnisse der Blutburgunderalge ein optimales Wachstum in der Gewässertiefe gewährt.

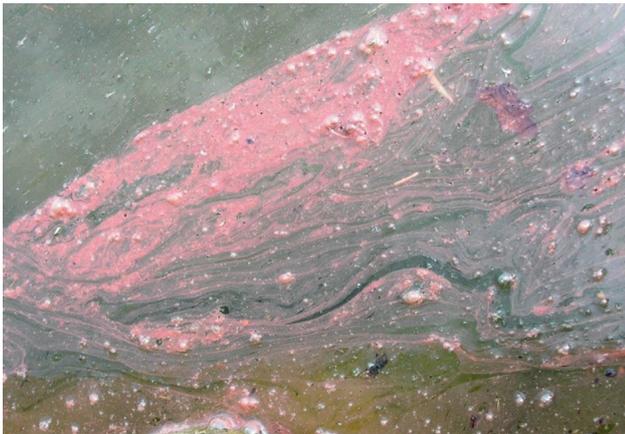


Abb. 12 Makroskopisch erkennbare Überzüge von Cyanobakterien sind an der Wasseroberfläche gut zu erkennen, hier gezeigt werden die burgunderroten Aufrahmungen des Cyanobakteriums *Planktothrix rubescens* für das Beispiel Mondsee im Jahr 2004 (Foto aus: <http://www.lakeriver.at>)

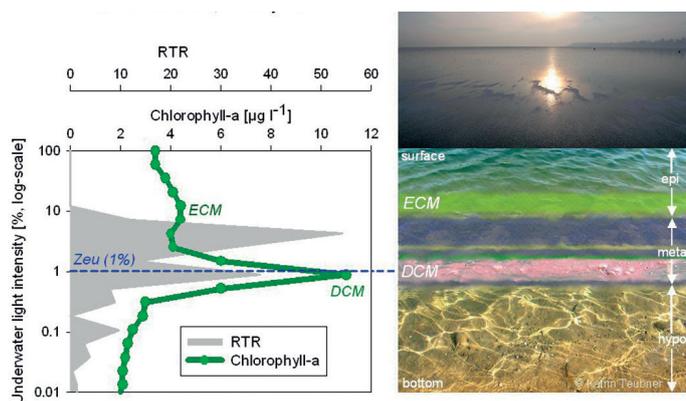


Abb. 13 Tiefenprofil eines tiefen alpinen Sees: links grafische Darstellung, rechts Schema. Hier bildet sich neben dem Phytoplanktonmaximum an der Oberfläche (epilimnetisches Chlorophyll-Maximum, ECM) die eigentliche Phytoplanktonbiomasse in einer Tiefe von etwa 10 m aus (Tiefen-Chlorophyll-Maximum, DCM). Das DCM wird in alpinen Seen wie dem Mondsee zu 90 % von dem Cyanobakterium *Planktothrix rubescens* dominiert (Dokulil und Teubner 2012), welches optimal bei den geringen Lichtintensitäten von nur 1 % Licht wachsen kann (Zeu = euphotische Zone, lichtdurchflutete Schicht). Die graue Fläche zeigt die thermische Schichtung (RTR = Wert thermischer Widerstandskraft gegen die Durchmischung des Wassers) im Tiefenprofil an (Schema aus: <http://www.lakeriver.at>)

Mit Ausnahme von extrem stark mit Nährstoffen angereicherten Gewässern, wo im Jahresmittel die Respiration (Atmung) gegenüber der Primärproduktion (Photosynthese) überwiegt (Dokulil und Teubner 2022), sind in allen übrigen stehenden Gewässern quasi im gesamten Wasserkörper planktische Algen vorzufinden. Die Biomasse der Algen kann jedoch im See sowohl horizontal als auch vertikal stark variieren. Nach dem entsprechenden Leitfaden der Gewässerzustandsverordnung (GZÜV) für das biologische Qualitätselement Phytoplankton wird an der tiefsten Stelle eines Gewässers eine sogenannte tiefenintegrierte Probe genommen [58]. Um in einem tiefen See (Bsp. Mondsee) bei einer reduzierten Zahl von vertikalen Schöpfproben trotzdem das (maximale) epilimnetische Ausmaß der Phytoplanktonentwicklung zu erfassen, wird die Sommerprobe bei etwa 12 % Lichtintensität entnommen, d. h. in der Regel in der Gewässertiefe von etwa 2 bis 3 m unter der Seenoberfläche. Für das Beispiel Alte Donau konnten die epilimnetischen Maxima (bei windstillem Sommerwetter) für den nährstoffarmen Zustand mit klarem Wasserkörper (oligotroph) in 3,0 m, bei mittlerer Nährstoffbelastung (mesotroph) in 2,6 m und bei stärkerer Nährstoffbelastung (eutroph) in 1,9 m Tiefe ermittelt werden (Teubner et al. 2020). Generell zeigt

sich dabei die Tendenz, dass bei einer erhöhten Nährstoffbasis, insbesondere von Phosphor, sich umso höhere Biomassen an Phytoplankton entwickeln können (Abb. 10) und dementsprechend die Trübe eines Wasserkörpers zunimmt (Tab. 2). In einem trüben Gewässer liegt somit die Wasserschicht des algenphysiologischen Optimums von 12 % Oberflächenstrahlung näher an der Wasseroberfläche als in einem klaren nährstoffarmen Gewässer.

Die Besonderheit der Nährstoffanreicherung in tiefen, im Sommer thermisch geschichteten Seen, liegt in der möglichen Ausprägung eines weiteren Phytoplankton-Maximums in tiefer gelegenen Wasserschichten bei etwa 0.9 bis 1 % Lichtintensität (siehe Text oben zu dem Phycoerythrin-haltigen Cyanobakterium *Planktothrix rubescens*). Somit ist in solchen Seen, wie es hier für den Mondsee beispielhaft besprochen wird, eine weitere Probenentnahme in der Tiefe notwendig, um die Nährstoffsituation und die sich daraus ableitende Bildung der Phytoplanktonbiomasse repräsentativ für den See zu erfassen. Es zeigt sich im Tiefenprofil, dass das metalimnetische Phytoplanktonmaximum etwa 4,5-fach höher sein kann als das Phytoplanktonmaximum im Epilimnion (Abb. 13, s. auch Dokulil und Teubner 2012). Gekoppelt an die thermische Schichtung des Wasserkörpers verschiebt sich im Mondsee der metalimnetische Peak von einer Tiefe in 7 m (Anfang Juni) auf 15 m (Ende August) im Verlauf eines Sommers.

Tab. 2 5-stufige Skala der Trophie-Klassifikation der Wasserqualität bezüglich des Gesamt-Phosphorgehalts, der Phytoplanktonbiomasse (Biomasseschätzung über das Biovolumen bzw. das Chlorophyll-a) und der Sichttiefe (Secchi-Tiefe). Die Grenzwerte beziehen sich auf Jahresmittelwerte. Die Werte für den Gesamtphosphor und das Chlorophyll-a sind der ÖNORM entnommen; das dem Chlorophyll-a Wert korrespondierende Phytoplanktonbiovolumen aus Teubner et al. (2018). Der Anteil des Cyanobakterien-Biovolumens am Gesamt-Biovolumen ist der gewichtete Mittelwert mit dem maximalen Wert gleich 100 gleichgesetzt (gewichtete prozentuale Anteile aus Dokulil et al. 2005). Die Grenzwerte für die Sichttiefe abgeleitet aus Teubner et al. (2020) sowie nach Forsberg und Ryding ([59])

	Oligotroph (gering)	Mesotroph (mittel)	Schwach Eutroph (kritisch)	Stark Eutroph (stark)	Hypertroph (sehr stark)
Gesamt-Phosphor [$\mu\text{g L}^{-1}$]	< 10	10 – 20	20 – 40	40 – 60	> 60
Phytoplankton Biovolumen [$\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$]	< 0,8	0,8 – 2,4	2,4 – 4,7	4,7 – 7	> 7
Phytoplankton Chlorophyll-a [$\mu\text{g L}^{-1}$]	4	4 – 12	12 – 24	24 – 35	35
Cyanobakterien [% , Max = 100]	33	59	65	81	100
Sichttiefe [m]	> 5,5	5,5 – 2,4	2,4 – 1,5	1,5 – 1	< 1

Die Phytoplanktonentwicklung verändert sich qualitativ und quantitativ innerhalb eines Jahres in Abhängigkeit vom saisonalen Verlauf von Einstrahlung und Temperatur und damit assoziierten Sukzessionen der Nährstoffverfügbarkeit (bottom-up) und Nahrungsketten (top-down). Um auch hier die Maxima im Jahresverlauf zu erfassen, werden Gewässer insbesondere dann beprobt, wenn sich jeweils ein temporäres Maximum des Phytoplanktons im Verlauf der Vegetationsperiode aufgebaut hat. Das erste Maximum im Jahresverlauf kann im Frühjahr beobachtet werden, welches im wesentlichen bottom-up, d. h. je nach Verfügbarkeit der Nährstoffe, gesteuert wird. Dieses Frühjahrsmaximum baut sich vorwiegend aus Kieselalgen auf (Diatomeen, Bacillariophyta). Im Ausnahmefall von (1) starker Nährstoffanreicherung im Frühjahr und (2) einem Flachsee (Beispiel Alte Donau) ist das Frühjahrsplankton neben Kieselalgen auch von typischen Cyanobakterien-Frühjahrsvertretern, d. h. meist fädigen nicht-koloniebildenden Cyanobakterien, geprägt (Teubner et al. 1999; Dokulil und Teubner 2000; Dokulil 2016). Das zweite Phytoplanktonmaximum wird im Sommer auf ein Klarwasserstadium folgend (massive Zooplanktonentwicklung auf Kosten des Phytoplanktons) gebildet. Hier entwickeln sich die höchsten Biovolumenanteile

von Cyanobakterien im Jahresverlauf. Diese photosynthetischen Prokaryonten können dabei einen gewichteten Biovolumenanteil von weit über 80 % am Gesamt-Biovolumen während der Monate von Juli bis September einnehmen (Dokulil et al. 2005). Typische Sommervertreter der Cyanobakterien sind oft koloniebildende Taxa wie *Microcystis aeruginosa* und *Aphanizomenon flos-aquae* (Teubner et al. 1999; Dokulil und Teubner 2000). Darüber hinaus zeigt sich allgemein die Tendenz, dass insbesondere in nährstoffreichen Gewässern die Cyanobakterien dominieren (Dokulil et al. 2005; Dokulil und Teubner 2003; [60], siehe auch Tab. 2). Ein dritter und letzter saisonaler Peak des Phytoplanktons ergibt sich im Herbst, wobei Vollzirkulation bzw. andere saisonal bedingte Anpassungen die Cyanobakterien nur vermindert begünstigen.

Die Cyanobakterien prägen damit vorwiegend das Sommerplankton in nährstoffreichen Gewässern. Die beiden extremen Umweltbedingungen, die das Wachstum der Cyanobakterien gegenüber den anderen Phytoplanktern fördern, sind somit die Nährstoffanreicherung und hohe Wassertemperaturen. Daher werden Cyanobakterien häufig in Untersuchungen angesprochen, wo es um die Auswirkung einer lokalen Eutrophierung bzw. der globalen Erwärmung geht (Dokulil und Teubner 2000; Dokulil und Teubner 2012; Teubner et al. 2020). Physiologische Besonderheiten der Cyanobakterien, die eine Massenentwicklung gegenüber anderen Phytoplanktern ermöglichen, sind (1) die Bildung von Heterocyten mancher Taxa, welche der Bindung von Luft-Stickstoff dienen (*R. raciborskii*, *A. flos-aquae*, relevant für das Bsp. Flachsee Alte Donau), (2) eine fakultativ heterotrophe Lebensweise in Ergänzung zur obligaten autotrophen Ernährung sowie (3) der Anpassung an sehr niedrige Lichtverhältnisse, wo andere Phytoplankter dann nicht mehr dauerhaft existieren können (2 und 3 sind insbesondere relevant für das Bsp. tiefer alpiner Mondsee).

6.3.2 Die besondere Rolle der Cyanobakterien aufgrund der Bildung von Cyanotoxinen

Bei forciertem Phytoplanktonwachstum, welches oft im Zuge einer ungewollten Überdüngung der Seen oder auch mit der Erwärmung infolge des Klimawandels einhergeht, rückt auch die Frage nach dem Anteil der Cyanobakterien an der Phytoplankton-Massenentwicklung in den Mittelpunkt (u. a. [57]; siehe auch % Cyanobakterien in Tab. 2). Das Interesse, die Cyanobakterien quantitativ zu erfassen, ergibt sich neben einer Bestimmung des Biovolumens (Abb. 11) auch durch deren Bildung von vielfältigen Cyanotoxinen. Der qualitative und quantitative Nachweis von Cyanotoxinen (z. B. Microcystine und Nodularin) erfolgt dabei mittels analytisch-chemischer Methodik, welche üblicherweise auf Flüssigchromatographie und Massenspektrometrikopplung beruht [61, 62]. Diese Verfahren sind aber im Vergleich zu mikroskopischen und genetischen Nachweismethoden relativ aufwendig und teuer. Bei dem Beispiel *Planktothrix rubescens* kann neben dem Biovolumen ganzer Trichome zugleich auch das Biovolumen je Zelle pro L oder die Zellzahl (in den Trichomen) je L berechnet werden. Während bei der Relation Nährstoffmenge zu Response Biomassebildung (Abb. 11) immer das Biovolumen oder ein anderes Biomasseäquivalent (Chlorophyll-a, s. oben) der photosynthetischen Plankter herangezogen wird, wird bei der Abschätzung der Toxinmenge oft der Bezug auf die Zellzahl der Cyanobakterien gewählt.

Alternativ können toxigene Cyanobakterien mittels sogenannter quantitativer (Echtzeit-)PCR-Verfahren anhand von sogenannten Referenzgenen identifiziert und auch quantifiziert werden (zur Funktionsweise der qPCR siehe Arbeitsbehelf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1). Üblicherweise werden zu diesem Zweck Genregionen, die für Phycocyanin (z. B. *Microcystis* (Kurmayer und Kutzenberger 2003); oder *Planktothrix* (Ostermaier und Kurmayer 2009; Kurmayer et al. 2011)), oder für die RNA-Polymerase (z. B. für *Raphidiopsis* oder *Chrysoosporium (Aphanizomenon) ovalisporum*), oder auch für die 16S rDNA (z. B. bei *Microcystis*) kodieren, verwendet (Referenzen in [57]). Zusätzlich können einzelne für die Toxinsynthese indikative Genregionen amplifiziert werden, und dadurch der Anteil der Toxinproduzenten im Vergleich zur Gesamtpopulation erfasst werden (Protokolle in Kurmayer et al. 2017). Die Standard-Arbeitsschritte zur Durchführung der qPCR-Methodik für Alpenseen oder auch die Alte Donau werden in Abb. 14 dargestellt: 1) Filtrieren der Wasserprobe über GF/C-Filter (beim Mondsee ca. 2 bis 4 L) und Einfrieren des Filters bei -20 °C im Reaktionsgefäß; 2) Quantitative Extraktion der DNA aus den Algen am GF/C-Filter durch kommerzielle DNA-lolationskits; 3) Quantifizierung von einzelnen toxigenen Cyanobakterien über spezifische Genregionen

durch quantitative (Echtzeit-)PCR mittels Fluoreszenzsignal; 4) Rückrechnung des Fluoreszenzsignals auf die ursprüngliche Konzentration der amplifizierten Genregion in der Ausgangslösung.

Bei den Cyanotoxinen sind vor allem Microcystine problematisch, da es sich um giftige, zyklische Peptide handelt, welche aus 7 Aminosäuren bestehende Moleküle sind. Microcystine hemmen wichtige, bei allen eukaryotischen Organismen konservierte Enzyme wie Proteinphosphatasen 1 und 2A und sind daher prinzipiell für alle höheren Organismen toxisch [57]. Bei Wirbeltieren und dem Menschen können durch den Einfluss von Microcystinen Nekrosen in der Leber hervorgerufen werden, welche bei längerer Einnahme wie durch unbehandeltes Oberflächen-Trinkwasser eine kanzerogene Wirkung entfalten können [57]. Neben den Microcystinen können von nah verwandten Cyanobakterien (z. B. *Tychonema bourellyi*, *Kamptonema* sp.) Alkaloide, z. B. (Homo-)Anatoxin-a produziert werden, welche neurotoxisch wirken.

Für den Mondsee sowie weitere alpine Seen in Österreich (z. B. Wörthersee), Deutschland (Ammersee) und der Schweiz (Zürichsee, Hallwilersee) konnten mittels qPCR-Methodik verschiedene Microcystin-Genotypen bei *Planktothrix rubescens* bestimmt und quantifiziert werden (Ostermaier und Kurmayer 2010). Darüber hinaus war es möglich, auch die durch *Planktothrix* gebildeten Toxinkonzentrationen (Microcystin) mittels qPCR-Methodik abzuschätzen. Interessanterweise ist für dieses Cyanobakterium der Anteil der Microcystin-produzierenden Cyanobakterien praktisch bei hundert Prozent. Der bestimmende Faktor für die Abundanz der Microcystin-Genotypen ist hauptsächlich durch den Zuwachs oder die Verluste der Populationsentwicklung von *P. rubescens* selbst bestimmt, was auf für dieses Cyanobakterium relativ stabile Umweltfaktoren schließen lässt (Abb. 15). Die Beständigkeit des Wachstums von *P. rubescens* (Fraßresistenz, welche nicht zuletzt durch die Toxizität bestimmt ist) wirkt sich außerdem auf die übrigen Organismen im Nahrungsnetz aus (Qu et al. 2021; Forster et al. 2021).

Nach Ostermaier und Kurmayer (2010) korrelieren die in der Wasserprobe gemessene Microcystinkonzentrationen mit der Biomasse von *Planktothrix* hoch signifikant (Zellzahl; $y = 1,058x - 0,0173$, $R^2 = 0,899$; hierbei entspricht y dem $\log_{10}(x+1)$ der Microcystinkonzentration (in $\mu\text{g/L}$) und x dem $\log_{10}(x+1)$ der *Planktothrix*-Biomasse). Anhand dieser quantitativen Relation ergibt sich, dass für $1 \text{ mm}^3/\text{L}$ *Planktothrix*-Biomasse eine Microcystinkonzentration von $3,1 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ Microcystin-LR Äquivalent auftritt (Ostermaier und Kurmayer 2010).

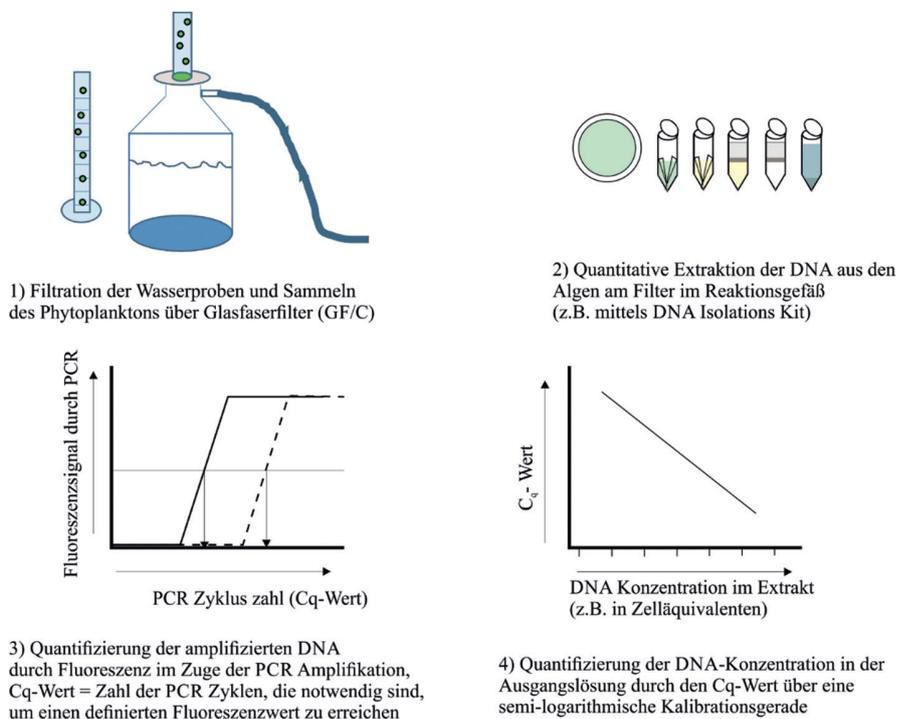


Abb. 14 Flussdiagramm zu den einzelnen Arbeitsschritten 1 bis 4 der qPCR-Methodik zur Quantifizierung von toxischen Cyanobakterien, siehe Fallbeispiel Mondsee (Ostermaier und Kurmayer 2010).

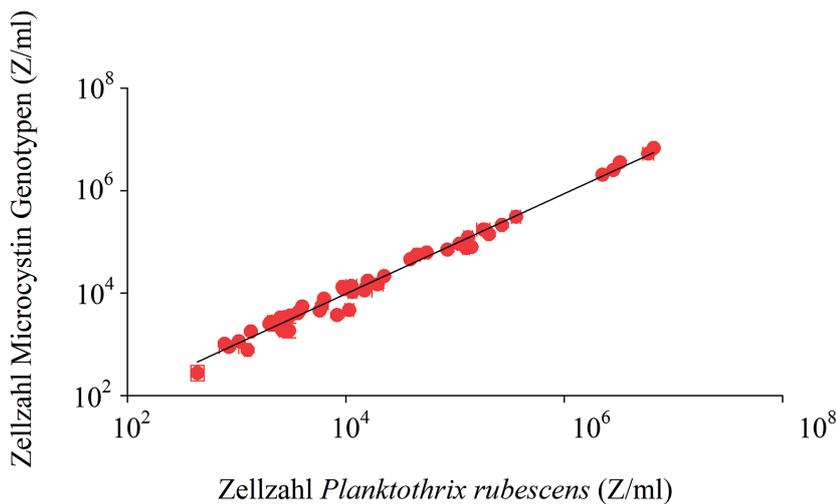


Abb. 15 Zusammenhang zwischen der Zahl von Microcystin-produzierenden Genotypen und der Gesamtzellzahl von *Planktothrix rubescens* in Alpenseen, Talsperren und Reservoirten (n = 85, Kurmayer et al. 2011). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Parallelmessungen sowie das daraus berechnete Fehlerintervall.

Bei *Microcystis aeruginosa*, einem Cyanobakterium, das bspw. massiv in der Alten Donau in der Eutrophierungsperiode vorkam, ist allgemein die Relation der Zellzahl zu der Microcystinkonzentration eher unregelmäßig, wenngleich auch hier häufig positive Korrelationen zwischen Biomasse und Microcystinkonzentration beobachtet werden konnten [61, 63]. Daher kann man davon ausgehen, dass trotz des variablen Anteils von verschiedenen Microcystin-Genotypen in einem von *Microcystis* dominierten Phytoplankton, Cyanotoxine (Microcystin) mit hoher Wahrscheinlichkeit im Wasser nachweisbar sind (Via-Odorika et al. 2004; Kurmayer und Christiansen 2009). Dementsprechend wird für eine Risikoabschätzung von Microcystin in Gewässern durch die WHO ein Quotient von 3 µg Microcystin pro 1 mm³ Biovolumen von toxischen Cyanobakterien (*Planktothrix*, *Microcystis*, *Dolichospermum*) als oberer Grenzwert angesehen ([57], S. 266). Im Zuge der seit zwei Jahrzehnten stattfindenden Phase der Reoligotrophierung wurden im Mondsee und in der Alten Donau durchschnittlich Biovolumina von den toxischen Cyanobakterien *Planktothrix* bzw. *Microcystis* < 1 mm³/L beobachtet.

6.4 Schlussfolgerungen

- Die Gewässersanierung am Fallbeispiel Alte Donau zeigt, dass die Reduktion des wachstumslimitierenden Nährelements Phosphor abrupt erreicht werden kann, aber durch weitere Maßnahmen der Biomanipulation (z. B. Makrophytenansiedlung, Pflanzung des Röhrichtgürtels) unterstützt werden muss, um eine nachhaltige Sanierung zu gewährleisten. Mit der Sanierung nahm die Wassertransparenz zu (Dokulil et al. 2018; Teubner et al. 2020). Die Sichttiefe von unter einem Meter während der Eutrophierungsperiode (hypertroph) stieg auf 3.5 m (mesotroph) und entspricht damit dem Referenzzustand dieses Gewässers. Zugleich wurde mit der Sanierung der Dominanz von Cyanobakterien entgegengewirkt, sodass sich ein gemischt zusammengesetztes Phytoplankton ergab.
- Bei einer eindeutigen Identifizierung der Hauptquellen des Nährstoffeintrags und einer nachfolgend strikten Sanierung des Einzugsgebiets beim Fallbeispiel Mondsee (Reduktion des Nährstoffeintrags durch Bau der Ringkanalisation u. a. [56]) ergab sich bereits innerhalb von 15 Jahren eine Rückkehr zu Referenzbedingungen des alpinen Sees (z. B. Dokulil und Teubner 2005). Die Reduktion der jährlichen Gesamtphosphorkonzentration folgte einem Trend, mit phasenweise raschen, aber dann auch wieder verzögerten Nährstoffabnahmen. Neuere Nährstoffeinträge bzw. eine Zunahme des Cyanobakteriums *Planktothrix rubescens*, die hier nicht weiter im Detail abgehandelt werden, ergeben sich durch andere Einträge und den Klimawandel (Dokulil und Teubner 2012; Luger et al. 2021).
- Dem Phytoplankton, welches sich unmittelbar bei einer Nährstoffanreicherung zunehmend bildet und als Primärproduzent die Grundlage der Nahrungsketten in einem Gewässer bildet, kommt

eine Schlüsselrolle bei der Bewertung von Seenökosystemen zu. Da Cyanotoxine sich auf alle höheren Organismen, beginnend bei den Wasserflöhen des Zooplanktons, hemmend oder giftig auswirken können, haben Cyanobakterien auch weitreichende Konsequenzen für die Nahrungsketten in einem Seen-Ökosystem (Qu et al. 2021). Aufgrund ihres prokaryontischen Zellaufbaus werden die Cyanobakterien über ihre photosynthetische Leistung innerhalb des Phytoplanktons weit hinaus auch mikrobiologisch vielfältig im See untersucht (Greisberger et al. 2008, [64]).

- Eine Reduktion des Nährstoffeintrags, insbesondere von Phosphor, wirkt nicht nur einer unerwünschten Massenentwicklung von Phytoplankton entgegen, sondern vermindert insbesondere auch das Wachstum von Cyanobakterien und verringert damit das Risiko der Bildung von cyanobakteriellen Toxinen im Wasser.
- Die Informationen zur Höhe und Zusammensetzung der Phytoplanktonbiomasse, insbesondere dem Anteil der Cyanobakterien, bildet eine wichtige Basis für Entscheidungsträger:innen, um nachhaltige Monitoring- und Managemententscheidungen inklusive der Restaurierung eines Ökosystems zu treffen.
- Genetische Nachweismethoden bieten sich heute an, das Potenzial an toxinbildenden Cyanobakterien (Ostermaier und Kurmayer 2010; Kurmayer et al. 2011) frühzeitig zu erkennen und etwaige steuernde Umweltfaktoren ausfindig zu machen. Durch Früherkennung und Quantifizierung des Biovolumens kann die aufwendige chemisch-analytische Nachweismethodik effizienter eingesetzt werden. Auf DNA-Sequenzierung basierende Verfahren und daraus resultierende Netzwerkanalysen ermöglichen es, resultierende Interaktionen zwischen toxischen Cyanobakterien und verschiedenen Organismen im Nahrungsnetz im Detail zu analysieren (Forster et al. 2021; Qu et al. 2021).

6.5 Detailmethodik

Die Abschätzung des Biovolumens vom Phytoplankton erfolgt nach der mikroskopischen Auszählung von Zellen, Fäden oder Kolonien der Phytoplankter sowie das Vermessen der Dimensionen der Zellgebilde (Abb. 11). Das Biovolumen einer Art wird als das Verdrängungsvolumen aller Zellen einer jeweiligen Art berechnet und auf das Volumen einer Wasserprobe bezogen. Da das mikroskopische Auszählen von Phytoplanktonproben relativ zeitaufwendig ist (ca. 4 Stunden Arbeitsaufwand am Lichtmikroskop je Probe) und auch eine gute taxonomische Kenntnis der Bearbeiter:innen voraussetzt, wird oft auf eine vereinfachte Abschätzung der Phytoplanktonbiomasse zurückgegriffen. Hierfür wird der extrahierte Chlorophyll-a Gehalt einer Phytoplanktonprobe gemessen, da dieses photosynthetische Pigment in allen Phytoplanktontaxa, wenngleich mit einem leicht variierenden zellulären Gehalt vorkommt. Im Durchschnitt beträgt der Chlorophyll-a Gehalt 0,5 % der Phytoplankton-Frischbiomasse (Teubner et al. 2018). Verhältnismäßig reich an Chlorophyll-a sind die Grünalgen, dagegen relativ arm die Cyanobakterien (Greisberger und Teubner 2007). Der relativ niedrige Gehalt von Chlorophyll-a bei den Cyanobakterien ergibt sich dadurch, dass das eigentliche photosynthetisch aktive Pigment hier nicht das Chlorophyll-a ist, sondern eine Reihe diverser photosynthetisch aktiver Phycobiline (Phycocerythrin, Phycocyanin). Aufgrund dieser speziellen Pigmente sind die Cyanobakterien in der Lage, das wenige grüne Licht im Metalimnion photosynthetisch optimal nutzen zu können (Beispiel Mondsee, s. oben). Generell lässt sich über das Messen von Markerpigmenten nicht nur die Gesamtphytoplanktonbiomasse, sondern auch die Zusammensetzung des Phytoplanktons erfassen (Greisberger und Teubner 2007).

Darüber hinaus können heute auch mittels spezifischer DNA-Sequenzierungsverfahren individuelle Vorkommen von Phytoplanktontaxa inklusive der Cyanobakterien hergeleitet werden (Ma et al. 2020). Da nicht alle Vertreter der Cyanobakterien Toxine produzieren, ist es sinnvoll, die Zusammensetzung des Phytoplanktons zum Beprobungszeitpunkt zu kennen und dadurch das Potenzial für das Auftreten von Cyanotoxinen im Verlauf der saisonalen Entwicklung besser abschätzen zu können. Die Hochdurchsatzsequenzierung von PCR-amplifizierten 16S rDNA- (für Cyanobakterien) und/oder 18S rDNA-Fragmenten (für eukaryotische Algen) und der Vergleich der Sequenzabfolge (des Barcodes) mit einer Referenzdatenbank ermöglicht über die bioinformatische Auswertung letztlich die taxonomische Zuordnung.

6.6 Referenzarbeiten

Dokulil M, Teubner K (2000): Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438:1–12.

Dokulil M, Teubner K (2012): Deep living *Planktothrix rubescens* modulated by environmental constraints and climate forcing. *Hydrobiologia* 698:29–46.

Dokulil M, Teubner K (2022): Comparative Primary Production, In: *Encyclopedia of Inland Waters*, Academic Press.

Dokulil MT (2016): Vegetative survival of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) at low temperature and low light. *Hydrobiologia* 764:241–247.

Dokulil MT, Donabaum K, Pall K, Janauer GA, Teubner K (2018): Eutrophication, Management and Sustainable Development of Urban Lakes: General Considerations and Specific Solutions for Alte Donau – A Synthesis. In: Dokulil MT, Donabaum K, Teubner K (eds) *The Alte Donau: Successful restoration and sustainable management – An ecosystem case study of a shallow urban lake*. *Aquat. Ecol. Ser. 10*, Springer, 373–385.

Dokulil MT, Donabaum K, Teubner K (eds) (2018): *The Alte Donau: Successful restoration and sustainable management – An ecosystem case study of a shallow urban lake*. *Aquat. Ecol. Ser. 10*, Springer.

Dokulil MT, Teubner K (2003): Steady state phytoplankton assemblages during thermal stratification in deep alpine lakes. Do they occur? *Hydrobiologia* 502:65–72.

Dokulil MT, Teubner K (2005): Do phytoplankton assemblages correctly track trophic changes? – An assessment using directly measured and palaeolimnological data. *Freshw. Biol.* 50:1594–1604.

Dokulil MT, Teubner K, Greisberger S (2005): Typenspezifische Referenzbedingungen für die integrierende Bewertung des ökologischen Zustandes stehender Gewässer Österreichs gemäß der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Modul 1: Die Bewertung der Phytoplanktonstruktur nach dem Brettum-Index. Abschlussbericht. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt & Wasserwirtschaft, Wien.

Forster D, Qu Z, Pitsch G, Bruni EP, Kammerlander B, Pröschold T, Sonntag B, Posch T, Stoeck T (2021): Lake Ecosystem Robustness and Resilience Inferred from a Climate-Stressed Protistan Plankton Network. *Microorganisms* 9:549.

Greisberger S, Teubner K (2007): Does pigment composition reflect phytoplankton community structure in differing temperature and light conditions in a deep alpine lake? An approach using HPLC and delayed fluorescence (DF) techniques. *J. Phycol.* 43:1108–1119.

Greisberger S, Dokulil MT, Teubner K (2008): A comparison of phytoplankton size-fractions in Mondsee, an alpine lake in Austria: distribution, pigment composition and primary production rates. *Aquat. Ecol.* 42:379–389.

Jeppesen E, Søndergaard M, Jensen JP, Havens KE, Anneville O, Carvalho L, Coveney MF, Deneke R, Dokulil MT, Foy B, Gerdeaux D, Hampton SE, Hilt S, Kangur K, Köhler J, Lammens EHHR, Lauridsen TL, Manca M, Miracle MR, Moss B, Nöges P, Persson G, Phillips G, Portielje R, Romo S, Schelske CL, Straile D, Tatrai I, Willèn E, Winder M (2005): Lake responses to reduced nutrient loading – an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* 50:1747–1771.

- Kurmayer R, Kutzenberger T (2003): Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp.* Appl. Environ. Microbiol. 69:6723-6730.
- Kurmayer R, Christiansen G (2009): The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. Freshw. Rev. 2: 31-50.
- Kurmayer R, Schober E, Tonk L, Visser P, Christiansen G (2011): Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. FEMS. Microbiol. Lett. 317:127-137.
- Kurmayer R, Sivonen K, Wilmotte A, Salmaso N (2017): Molecular tools for the detection and quantification of toxigenic cyanobacteria. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, UK
- Ma T, Jiang Y, Elbehery AHA, Blank S, Kurmayer R, Deng L (2020): Resilience of planktonic bacterial community structure in response to short-term weather deterioration during the growing season in an alpine lake. Hydrobiologia 847:535-548.
- Ostermaier V, Kurmayer R (2009): Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. Microb. Ecol. 58:323-333.
- Ostermaier V, Kurmayer R (2010): Application of real-time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium *Planktothrix sp.* Appl. Environ. Microbiol. 76:3495-3502
- Qu Z, Forster D, Bruni EP, Frantal D, Kammerlander B, Nachbaur L, Pitsch G, Posch T, Pröschold T, Teubner K, Sonntag B, Stoeck T (2021): Aquatic food webs in deep temperate lakes: Key species establish through their autecological versatility. Mol Ecol 30:1053-1071.
- Teubner K, Crosbie N, Donabaum K, Kabas W, Kirschner A, Pfister G, Salbrechter M, Dokulil MT (2003): Enhanced phosphorus accumulation efficiency by the pelagic community at reduced phosphorus supply: a lake experiment from bacteria to metazoan zooplankton. Limnol. Oceanogr. 48:1141–1149.
- Teubner K, Dokulil MT (2002): Ecological stoichiometry of TN:TP:SRSi in freshwaters: nutrient ratios and seasonal shifts in phytoplankton assemblages. Fundam. Appl. Limnol. 154:625-46.
- Teubner K, Feyerabend R, Henning H, Nicklisch A, Woitke P, Kohl J-G (1999): Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* or *Planktothrix agardhii* induced by the timing of the critical nitrogen- phosphorus-ratio in hypertrophic riverine lakes. Arch. Hydrobiol., Spec. Iss. Adv. Limnol. 54:325–344.
- Teubner K, Kabas W, Teubner IE (2018): Phytoplankton in Alte Donau: Response to trophic change from hypertrophic to mesotrophic over 22 years. In: Dokulil MT, Donabaum K, Teubner K (eds): The Alte Donau: Successful restoration and sustainable management – An ecosystem case study of a shallow urban lake. Huisman J (ed), Aquat Ecol Ser, Springer, 10:107–147.
- Teubner K, Teubner I, Pall K, Kabas W, Tolotti M, Ofenböck T, Dokulil MT (2020): New Emphasis on Water Transparency as Socio-Ecological Indicator for Urban Water: Bridging Ecosystem Service Supply and Sustainable Ecosystem Health. Front Environ Sci 8:573724.
- Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, Hisbergues M, Dittmann E, Komárek J, Erhard M, Chorus I (2004): Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis sp.* in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. System. Appl. Microbiol. 27:592-603. Dezember 2022, Wien.

7 DAS POTENZIAL DER DNA-BASIERTEN, HOCHAUFLÖSENDEN BAKTERIENGEMEINSCHAFTSANALYTIK FÜR DIE BEURTEILUNG DES MIKROBIOLOGISCHEN ZUSTANDS EINES GEWÄSSERS AM BEISPIEL DER DONAU

Domenico Savio^{1,2,3}, Alexander Eiler^{4,5}, Georg Reischer^{1,3}, Rita Linke^{1,3}, Juraj Parajka⁶, Alfred P. Blaschke^{3,6}, Robert L. Mach^{1,3}, Günter Blöschl⁶, Alexander K.T. Kirschner^{2,3,7}, Andreas H. Farnleitner^{1,2,3}

¹ Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungszentrum Wasser und Gesundheit

² Karl Landsteiner Privatuniversität Krems, Fachbereich Wasserqualität und Gesundheit

³ Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und Gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

⁴ University of Oslo, Norway, Department of Biosciences

⁵ eDNA Solutions AB, Göteborg, Schweden

⁶ Technische Universität Wien Institut für Wasserbau und Ingenieurhydrologie

⁷ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wassermikrobiologie

Eine detaillierte Kenntnis der Zusammensetzung sowie Veränderlichkeit bakterieller Lebensgemeinschaften birgt enormes Potenzial sowohl für die Beurteilung des mikrobiell-ökologischen, als auch des mikrobiologisch-hygienischen Zustands eines Gewässers. Unter Anwendung von hochauflösender Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierertechnologie konnte die longitudinale Entwicklung der Bakteriengemeinschaften entlang eines großen internationalen Flusses zum weltweit ersten Mal am Beispiel der Donau detailliert beschrieben werden. Während die Fraktion der suspendierten, frei in der Wassersäule „schwebenden“ Bakterien eine graduelle Entwicklung entlang des Flusses zeigte, wiesen die Partikel-assoziierten Bakteriengemeinschaften deutlich höhere Variabilität auf und spiegelten viel deutlicher punktuelle, laterale Einflüsse sowohl natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs wider. Die vergleichende Analyse mit hydrologischen sowie physikalisch-chemischen Begleitparametern erlaubte zudem die Identifikation von die Bakteriengemeinschaftszusammensetzung beeinflussenden Faktoren. Lokale Zeitserien kombiniert mit wiederholten longitudinalen Untersuchungen sollen zukünftig erlauben, charakteristische Referenzgemeinschaften für die Beurteilung des ökologischen Zustands dieses Fließgewässers zu beschreiben. Im Zuge dessen neu identifizierte Indikatorbakterien könnten zukünftig auch direkt mittels anderer, hochsensitiver und schneller durchführbarer Methoden (z. B. direkt im Feld) nachgewiesen werden.

7.1 Einleitung

Oberstes Ziel der „Wasserrahmenrichtlinie“ [18] ist die Vermeidung einer weiteren Verschlechterung sowie der Schutz und die Verbesserung des Zustands der aquatischen Ökosysteme und der direkt von ihnen abhängigen Landökosysteme [65]. Die für die Erreichung des Teilziels des guten ökologischen Zustands notwendige standardisierte Beurteilung des ökologischen Zustands von Fließgewässern ist in Österreich auf Basis der in der ÖNORM M 6232:1997 enthaltenen Richtlinien für die ökologische Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern geregelt [66]. Diese Richtlinien befassen sich mit der Beurteilung des Zustands von Hydrologie, Gewässermorphologie, Fischökologie, Benthoszönosen (die den Gewässergrund, Sedimente und aquatische Pflanzen bewohnenden Tiergemeinschaften), der saprobischen Gewässergüte (basierend auf der Belastung eines Gewässers durch abbaubare organische Substanzen) sowie der chemisch-physikalischen Eigenschaften eines Gewässers. Die mikrobiellen Lebensgemeinschaften von Fließgewässern, welche neben Bakterien auch Archaeen, Protozoen, Pilze und Viren umfassen, werden trotz ihrer essenziellen Rolle in nahezu allen biogeochemischen Kreisläufen in der WRRL nach wie vor nicht berücksichtigt. Diese Tatsache ist vor allem folgenden Limitierungen geschuldet: Einerseits war es bis vor wenigen Jahren technisch schlicht unmöglich, die extrem hohe Diversität des natürlichen Mikrobioms in Flusswasser gesamtheitlich erfassen zu können. Beispielsweise erfassen kultivierungsbasierte Verfahren (vgl. ÖWAV-Arbeitsbehelf 52) aufgrund ihrer hohen Selektivität meist nur einen Bruchteil der tatsächlich vorherrschenden natürlichen mikrobiellen Diversität, während weniger selektive molekular-

biologische Ansätze unter Anwendung von traditioneller DNA-Sequenzierertechnologie (ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) sehr zeitaufwendig sind und jedes einzelne Bakterium in einer eigenen Analyse identifizieren mussten. Andererseits fehlten aufgrund dieser Limitierungen natürlich auch verlässliche Beschreibungen von Referenzgemeinschaften, welche essenzielle Voraussetzung für die Ermittlung von Verbesserungen beziehungsweise Verschlechterungen des ökologischen Zustands sind. Mit dem Aufkommen von modernen Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierertechnologien – nachfolgend als Next-Generation-Sequencing-Verfahren bzw. kurz „NGS“ bezeichnet – konnte diese Hürde jedoch genommen werden [67–69]. Abb. 16 zeigt schematisch die erforderlichen Arbeitsschritte für die NGS-basierte Untersuchung des Mikrobioms eines Gewässers. Nachfolgend soll nun am Beispiel der Donau im Rahmen der weltweit ersten Studie zur hochauflösenden Untersuchung der Bakteriengemeinschaftszusammensetzung (kurz „BCC“ aus dem Englischen für „Bacterial Community Composition“) entlang eines großen, internationalen Flusses die Frage beantwortet werden, ob moderne NGS-Verfahren geeignet sind, die Dynamik der Bakteriengemeinschaft entlang von Fließgewässern ganzheitlich und in ausreichend hoher Auflösung beschreiben zu können. Darüber hinaus sollen damit einhergehende generelle Fragestellungen diskutiert werden.

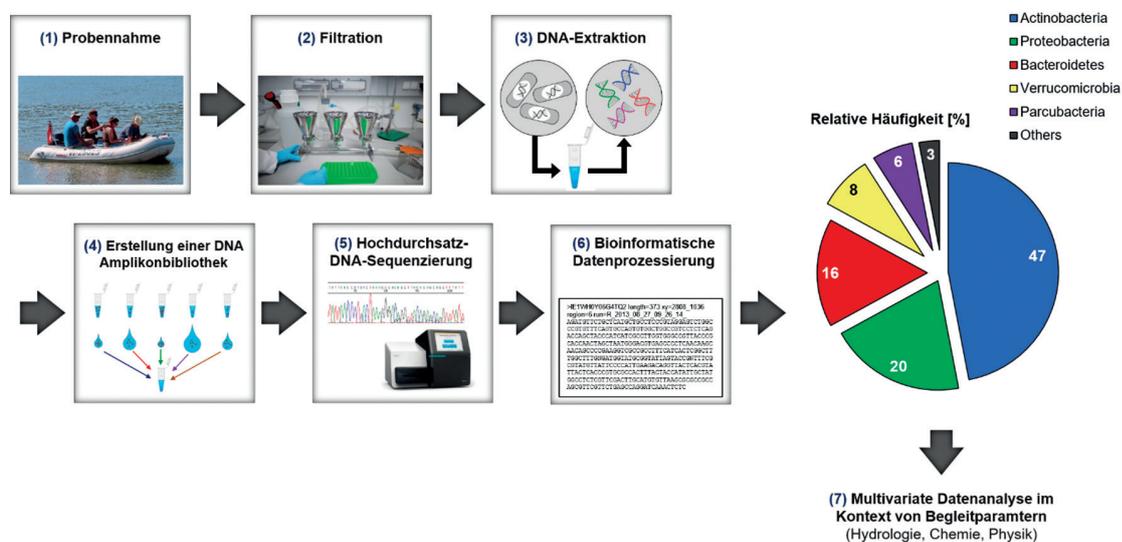


Abb. 16 Schematischer Überblick über die erforderlichen Arbeitsschritte zur hochauflösenden Untersuchung der Bakteriengemeinschaftszusammensetzung (BCC) – ausgehend von einer gezogenen Wasserprobe (1) bis hin zur Visualisierung der taxonomischen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft (BCC) einer einzelnen Wasserprobe (7). Für eine vergleichende Analyse der BCC entlang eines räumlichen oder zeitlichen Gradienten im Kontext von erhobenen chemischen, physikalischen oder hydrologischen Begleitparametern werden diese gemeinsam mit den generierten DNA-Sequenzdaten der multivariaten Datenanalyse zugeführt.

7.2 Fragestellungen

- Erlaubt uns moderne NGS-Technologie die „Black Box“ des Flusswasser-Mikrobioms zu öffnen und die diversen Bakteriengemeinschaften eines Flusses in ausreichender Tiefe zu beschreiben?
- Welche Bakterien dominieren in einem großen Fluss und wie verändert sich ihre Zusammensetzung entlang des Flusslaufs?
- Ermöglicht die NGS-basierte Mikrobiom-Untersuchung auch Aussagen über die Herkunft und ökologische Rolle bestimmter Bakterien sowie deren Tauglichkeit als Indikatoren, beispielsweise für den biogeochemischen Status eines Gewässers?

7.3 Darstellung

Bisheriges Wissen zur Mikrobiologie entlang der Donau entstammt vor allem aus einer Reihe rezenter Publikationen, welche auf Ergebnissen von im Rahmen des Joint Danube Survey-Programms in den Jahren 2001 und 2007 durchgeführten Studien basieren (Verweis auf Artikel 2 – Frick et al; [70–73]). Im Fo-

kus dieser Studien lagen neben dem Nachweis und der Herkunftsbestimmung von fäkalen Belastungen entlang des Flusses auch die generelle Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften. Eine taxonomische Zuordnung – also die auf verwandtschaftlichen Beziehungen basierende Klassifikation und Benennung – der dominierenden Bakterien im Flusswasser konnte aufgrund der damals vorherrschenden methodischen Limitierungen allerdings nur für die allerhäufigsten Bakterien geleistet werden.

7.3.1 Bakterielle Diversität und Nachweisgrenze

Auf Basis moderner NGS-Technologie konnten im Rahmen der hier präsentierten Studie insgesamt 8 697 sogenannte „OTUs“ (sogenannte „Operationale Taxonomische Einheiten“ – aus dem Englischen von „Operational Taxonomic Units“) entlang der gesamten Donau beschrieben werden. Diese OTUs wurden in der Vergangenheit verbreitet als Ersatz für Bakterienarten (Spezies) definiert, da die eindeutige Beschreibung von Bakterienarten aufgrund methodischer Limitierungen nicht möglich war. Hierfür wurden die aus den Wasserproben gewonnenen und im Rahmen der DNA-Sequenzierung entschlüsselten bakteriellen DNA-Sequenzen (Abfolge der Basenpaare des bakteriellen Genmaterials) auf Basis ihrer Sequenzähnlichkeit in OTUs gruppiert. Konkret handelt es sich bei den untersuchten DNA-Sequenzen um einen bestimmten Abschnitt des in allen Bakterien universell vorkommenden ribosomalen 16S rRNA-Gens (vgl. ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 1, Kapitel 2.2.1). Der gängigste Schwellenwert für die gemeinsame Gruppierung in eine OTU wurde zumeist bei 97 % Sequenzähnlichkeit gesetzt. Die Anzahl der unterschiedlichen in einer Wasserprobe nachgewiesenen OTUs stellt somit ein Maß für die Artenvielfalt (α -Diversität) der darin lebenden Gemeinschaft dar. Die hohe Anzahl von 8 697 in der hier präsentierten Studie beobachteten OTUs gibt somit einen ersten Eindruck des enormen Auflösungsvermögens dieser Methodik. Die darauffolgende, auf der für jede einzelne Probe beobachteten OTU-Anzahl basierende Berechnung des sogenannten Chao1-Diversitätsschätzwerts konnte eine durchschnittliche Artenvielfalt (α -Diversität) von 1 248 bzw. 2 025 OTUs für die zwei separat untersuchten Größenfraktionen, die „frei schwebenden“ beziehungsweise die Partikel-assoziierten Bakteriengemeinschaften berechnen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Partikel-assoziierten Bakteriengemeinschaften eine deutlich höhere Diversität aufweisen. Entlang des Flusses konnte für beide Größenfraktionen ein genereller abnehmender Trend in Bezug auf ihre bakterielle Diversität beobachtet werden (Abb. 17).

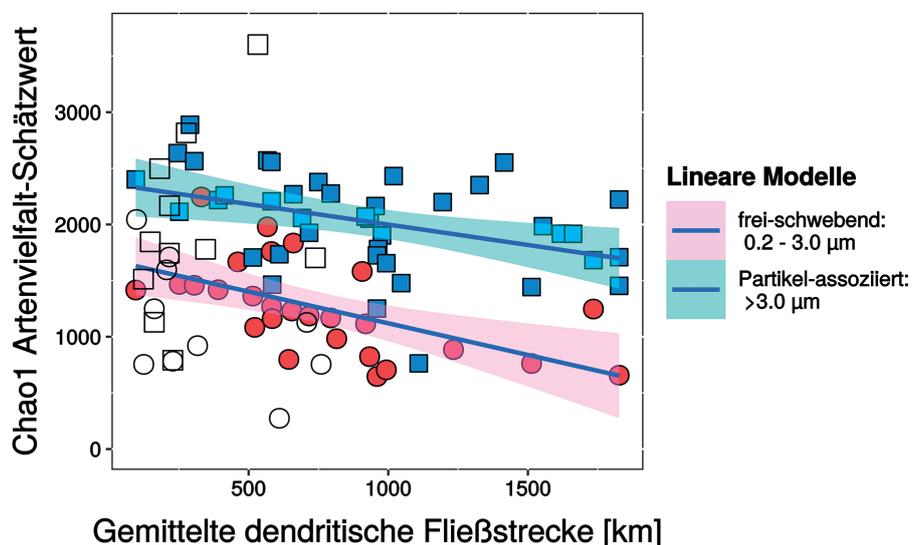


Abb. 17 Auf Basis des Chao1-Diversitätsschätzwerts berechnete Anzahl unterschiedlicher OTUs in jeder einzelnen Probe entlang der Donau als Maß der bakteriellen Diversität. Die x-Achse weist die durchschnittliche Fließstrecke aller Wasserläufe vom jeweiligen Ursprung bis zum jeweiligen Probenentnahmepunkt aus (Daten aus Savio et al. 2015)

Betreffend die Frage nach dem Auflösungsvermögen der angewandten NGS-Methodik konnte in der hier präsentierten Studie eine durchschnittliche Sequenziertiefe von rund 5 000 DNA-Sequenzen pro Probe erzielt werden. Die Sequenziertiefe beschreibt, wie viele bakterielle DNA-Sequenzen durchschnitt-

lich pro Probe entschlüsselt werden konnten. Im aktuellen Fall bedeutet dies vereinfacht, dass im Durchschnitt die jeweils 5 000 häufigsten Bakterien einer jeden Probe (~ 300 mL) identifiziert wurden. Dies entspricht einer theoretischen Nachweisgrenze von 0,02 %. Es konnten theoretisch also all jene Bakteriengruppen identifiziert werden, welche einen minimalen Anteil von 0,02 % an der gesamten Bakteriengemeinschaft einer Probe beisteuerten. Bei einer durchschnittlichen Häufigkeit von 1 Million Bakterienzellen pro Milliliter (mL) Flusswasser müsste eine Bakterienart also eine minimale Häufigkeit von 200 Zellen pro mL aufweisen, um bei der hier angewandten Sequenziertiefe nachgewiesen werden zu können. Die Sequenziertiefe kann jedoch noch deutlich erhöht werden, und lag in der hier präsentierten Studie eher am unteren Rand der Möglichkeiten. Bei einer Sequenziertiefe von 1 Million DNA-Sequenzen pro Probe und oben angenommener Bakterienzeldichte von 1 Million Bakterienzellen pro mL läge die theoretische Nachweisgrenze einer bestimmten Bakteriengruppe stark vereinfacht bei einer Zelle pro mL. In der hier präsentierten Studie wurde die Sequenziertiefe jedoch so gewählt, dass vor allem die Zusammensetzung der dominanten Bakteriengruppen beleuchtet werden konnte, und hatte nicht zum Ziel, äußerst seltene Bakterien wie beispielsweise Standardfäkalindikatorbakterien wie *Escherichia coli* zu detektieren. In moderat belasteten Gewässern – wie dies weitestgehend für die Donau der Fall ist – treten *Escherichia-coli*-Bakterien üblicherweise in Konzentrationen bis zu 1 000 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro 100 mL Flusswasser auf.

7.3.2 Zusammensetzung und longitudinale Entwicklung der Bakteriengemeinschaften

Infolge der bioinformatischen Prozessierung der Roh-DNA-Sequenzdaten (vgl. Punkt 5+6 in Abb. 16) werden die qualitätsgeprüften DNA-Sequenzen wie zuvor beschrieben in künstliche Bakterien-„Arten“, sogenannte OTUs, eingeteilt. Diesen wird nach Abgleich mit in öffentlichen Datenbanken verfügbaren Bakteriensequenzen ihre Identität (Gattung, Familie etc.) zugewiesen. In einem nächsten Schritt kann anschließend die BCC für jede einzelne Probe in Form von Tortendiagrammen (vgl. Abb. 16), oder wie in Abb. 18 gezeigt, in Form von Stapeldiagrammen visualisiert werden. Abb. 18 veranschaulicht, wie ausgehend von bereits bestehenden, auch über mehrere Jahr(zehnt)e bei –80 °C im Tiefkühlschrank lagerbaren DNA-Probenbanken auch viele Jahre nach der eigentlichen Probenahmekampagne die BCC entlang eines gesamten Flusses rekonstruiert werden kann.

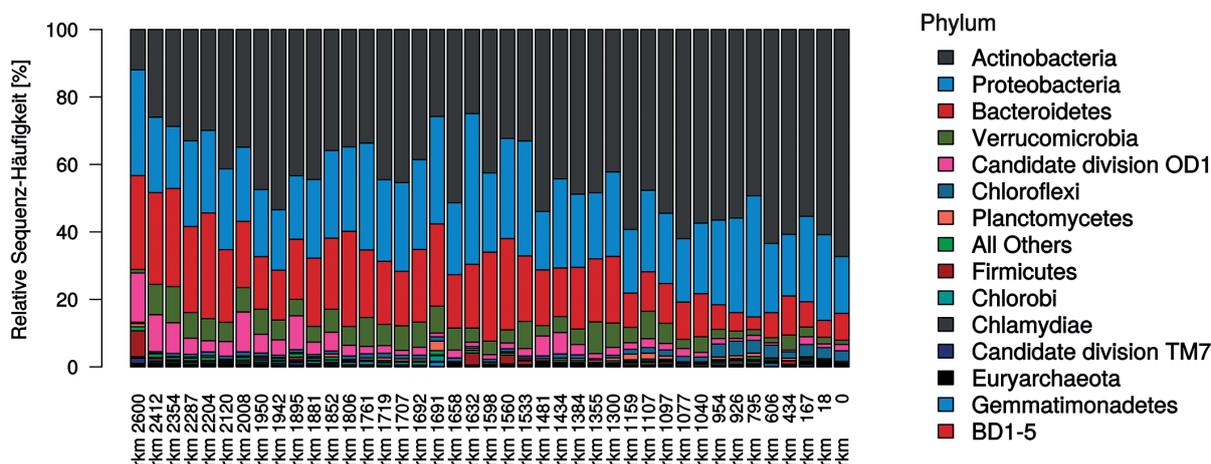


Abb. 18 Taxonomische Zusammensetzung der suspendierten, „frei lebenden“ Bakteriengemeinschaften entlang der Donau auf Ebene von Bakterienstämmen (Phyla). Gezeigt werden die relative Häufigkeiten [%] der häufigsten Bakterienstämme in den DNA-Extrakten der suspendierten Größenfraktion (0.2 bis 3.0 µm). Die Nummerierung auf der x-Achse bezieht sich auf die offizielle Flusskilometerzahl der entsprechenden Probenentnahmestelle während des Joint Danube Survey 2 (74). Diese bezieht sich im Falle der Donau auf die Entfernung zur Mündung ins Schwarze Meer

Eine besonders interessante Beobachtung hierbei war die kontinuierliche Zunahme des Anteils an Actinobakterien (Bakterienstamm Actinobacteria) in den „frei lebenden“ Bakteriengemeinschaften (Abb. 18). Dieser Bakterienstamm (Phylum) ist seit langem dafür bekannt, viele typische Süßwasserbakterien zu

beinhalten [75]. Dem entgegen konnte für Bakterien des Phylums Bacteroidetes in dieser Größenfraktion eine deutliche Abnahme der relativen Häufigkeit entlang des Flusses beobachtet werden (Abb. 18).

Eine vereinfachte Darstellung der Entwicklung der Gesamtbakteriengemeinschaften, welche auch die Häufigkeitsverteilung der hunderten bis tausenden OTUs miteinbezieht, kann auf Basis der Berechnung sogenannter Beta-Diversitätsindizes erzielt werden. Diese stellen ein Maß für die Ähnlichkeit – beziehungsweise Unähnlichkeit – der BCC zwischen zwei Proben bereit. Wie in Abb. 19 exemplarisch veranschaulicht, können die mittels eines Beta-Diversitätsindex zwischen allen möglichen Probenpaaren berechneten Unähnlichkeiten ihrer Bakteriengemeinschaften anhand eines multidimensionalen Skalierungsverfahrens (NMDS) übersichtlich dargestellt werden. Auf Basis dieser zweidimensionalen Darstellung sowie begleitend erhobenen Informationen zu jeder Probe (hydrologische, geologische, chemische oder physikalische Begleitparameter) können Zusammenhänge zwischen der Veränderung der Bakteriengemeinschaften und bestimmten Umwelteinflüssen visualisiert werden. In der hier präsentierten Studie konnte so speziell für die „frei lebenden“ Bakteriengemeinschaften eine graduelle Veränderung mit zunehmender mittlerer Fließstrecke veranschaulicht werden (Abb. 19).

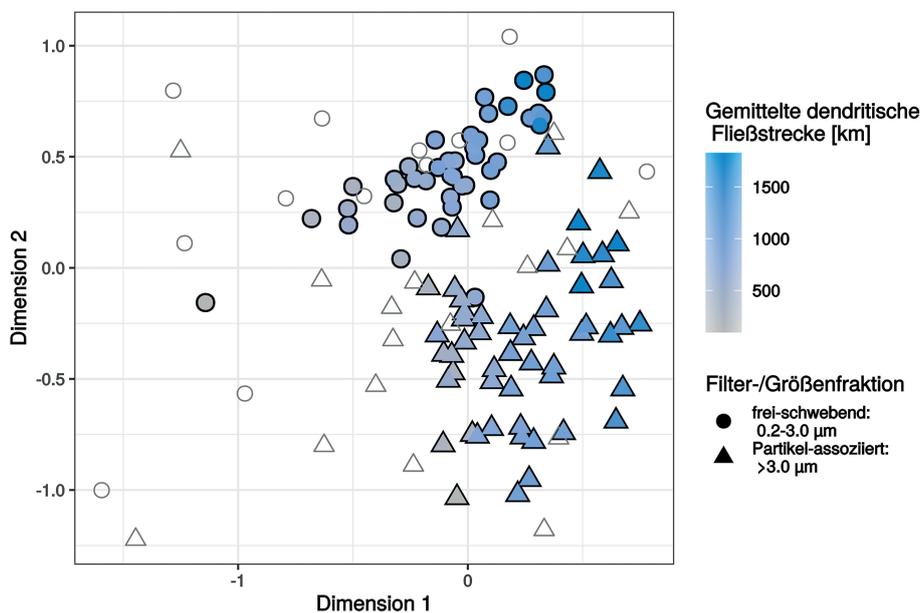


Abb. 19 Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS)-Visualisierung der berechneten Unähnlichkeiten zwischen den Bakteriengemeinschaften aller Probenpaare auf Basis des Bray-Curtis-Unähnlichkeitsindex – einem weit verbreiteten Maß zur Berechnung der Betadiversität. Ziel der NMDS ist eine räumliche Anordnung aller Proben, welche die errechneten Unähnlichkeiten ihrer Bakteriengemeinschaften untereinander bestmöglich widerspiegelt. Je näher zwei Gemeinschaften – repräsentiert durch Punkte bzw. Dreiecke – zueinander liegen, desto ähnlicher sind sie in ihrer Zusammensetzung. Kreise (●) repräsentieren die suspendierten, „frei lebenden“ Bakteriengemeinschaften in der Filtergrößenfraktion 0.2 bis 3.0 µm, Dreiecke (▲) die Partikel-assoziierten Bakteriengemeinschaften in der Filtergrößenfraktion > 3.0 µm. Der Farbgradient von grau zu blau spiegelt die zunehmende durchschnittliche Fließstrecke von allen Quellen (inkl. jener der Zubringerflüsse) zum jeweiligen Probenentnahmepunkt wider. Nicht farblich gefüllte Kreise (○) bzw. Dreiecke (△) repräsentieren die Bakteriengemeinschaften der Zubringerflüsse (Daten aus Savio et al. 2015).

Ganz generell können die berechneten Unähnlichkeiten zwischen den Bakteriengemeinschaften aller Probenpaare für Korrelationsanalysen mit den erhobenen Umweltparametern herangezogen werden, um so die bedeutendsten Einflussfaktoren für die Entwicklung der Bakteriengemeinschaften zu identifizieren. In der hier präsentierten Donau-Studie konnte so beispielsweise beobachtet werden, dass vor allem hydromorphologische Gegebenheiten in Gestalt der Fließstrecke sowie der Einzugsgebietsgröße den größten Vorhersagewert für die Entwicklung der Bakteriengemeinschaften entlang des Flusses besitzen (Savio et al. 2015).

7.3.3 Möglicher Ursprung, natürliches Habitat und ökologische Rolle von Bakterien

Rückschlüsse auf das Ursprungshabitat sowie die ökologische „Funktion“ und Rolle bestimmter Bakterien sind auf Basis der hier angewandten NGS-Methodik möglichen taxonomischen Zuordnung (Identifikation) von Bakterien leider nur sehr beschränkt möglich. Eine Möglichkeit, diese Limitierung teilweise umgehen zu können, ist das Zurückgreifen auf verfügbare Informationen zu sehr nahe verwandten Bakterien, deren DNA-Sequenzen in der Vergangenheit von Forscher:innen in ganzer Welt mit den dazugehörigen Metadaten in öffentlichen Datenbanken hinterlegt wurden. Enthalten diese Metadaten auch Informationen über das Ursprungshabitat oder die Ökologie eines Bakteriums, so können daraus – wenn auch nur eingeschränkt – Rückschlüsse auf die in der vorliegenden Probe nachgewiesene DNA-Sequenz gezogen werden. Praktisch kann dies über größtenteils frei verfügbare bioinformatische Programme und Algorithmen bewerkstelligt werden [76, 77]. Unter Anwendung dieses Prinzips zur Bestimmung des wahrscheinlichsten Ursprungshabitats auf Basis der SEQenv-Pipeline [77] konnten auch viele der entlang der Donau nachgewiesenen Bakteriensequenzen genauer charakterisiert werden. So konnte gezeigt werden, dass vor allem Bakterien, welche in der Vergangenheit häufig in Fluss-, See- bzw. Epilimnion- (die obere Wasserschicht in einem geschichteten stehenden Gewässer) -Habitaten beobachtet wurden, entlang der Donau deutlich an Abundanz gewannen (Abb. 20a). Im Gegensatz dazu konnte für Bakterien, welche aus Grundwasser- und Boden-Habitaten in den Fluss infiltrierten oder eingetragen wurden, eine abnehmende Abundanz entlang der Donau beobachtet werden (Abb. 20b). Die generell besonders für die Partikel-assoziierten Bakteriengesellschaften beobachtete deutlich höhere Variabilität ist dabei dem Einfluss der drei großen entlang der Donau gelegenen Städte Wien, Budapest und Belgrad geschuldet. Für diese konnten beispielsweise auch klare Signaturen von fäkalen Einträgen beziehungsweise Abwasserteileitungen detektiert werden (Abb. 20c; Savio et al. 2015).

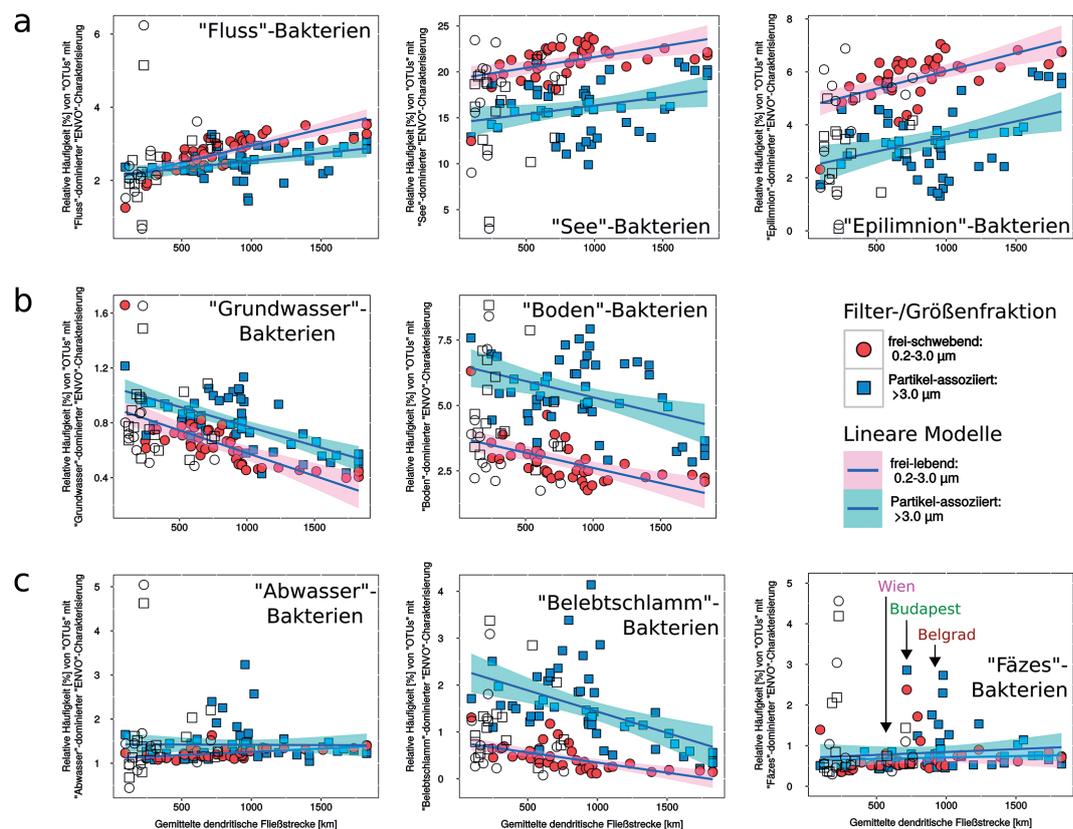


Abb. 20 Entwicklungen der relativen Häufigkeiten von OTUs entlang der Donau, welche mithilfe der SeqENV-Pipeline einem wahrscheinlichen Ursprungshabitat zugeordnet werden konnten. Wahrscheinliche (a) Fluss-, See- und Epilimnion-typische OTUs, (b) Grundwasser- und Boden-OTUs sowie (c) Abwasser-, Belebtschlamm- & Fäzes-assoziierte OTUs. Leere Kästchen repräsentieren die Proben der beprobten Zubringerflüsse; die x-Achsen weisen die durchschnittliche Fließstrecke von allen Quellen (inkl. jener der Zubringerflüsse) hin zum jeweiligen Probenentnahmepunkt aus (Daten aus Savio et al. 2015)

7.4 Schlussfolgerungen

- Die Anwendung von Hochdurchsatz-DNA-Sequenzieretechnologie (NGS) – in Kombination mit bioinformatischen Analyseverfahren/-tools – ermöglichte erstmals die hochauflösende Untersuchung der bakteriellen Populationsdynamik entlang der gesamten Fließstrecke eines großen internationalen Flusses.
- Die hier angewandte NGS-Methodik ist bestens geeignet, die „Black Box“ des Flusswassermikrobioms zu öffnen und dessen Populationsdynamik von der Quelle bis zur Mündung zu beschreiben.
- Die Analyse im Kontext von begleitend erhobenen hydrogeomorphologischen, chemischen und physikalischen Umweltparametern (Metadaten) erlaubte erstmalig das Beleuchten von Zusammenhängen zwischen der Populationsdynamik bestimmter Bakteriengruppen entlang des Flusses und sich verändernden Umwelteinflüssen, wie dies für pflanzliche und tierische Indikatoren (wie Makrozoobenthos und Algen) seit jeher der Goldstandard war.
- Auf Basis von Korrelationsanalysen zwischen Bakteriengemeinschafts- und Metadaten können Zusammenhänge zwischen Mikrobiologie sowie ökologischer bzw. hygienischer Wasserqualität identifiziert werden.
- Darauf basierend können neue Indikatorbakterien bzw. ganze Indikatorbakteriengruppen („Bakteriensignaturen“) für die Beantwortung unterschiedlichster Fragestellungen (ökologische Funktionsfähigkeit, Biostabilität, hygienische Wasserqualität) identifiziert werden.
- Auf Basis der beobachteten graduellen Veränderung der „frei lebenden“ Bakteriengemeinschaftsfraktion konnte nahegelegt werden, dass diese von allochthonen Einträgen relativ unbeeinflussten Gemeinschaften potenzielles Zeigerpotenzial für die Beurteilung des ökologischen Zustands eines Flusses haben könnten, während die Partikel-assoziierten Gemeinschaften viel deutlicher lokale von außen kommende Einflüsse wie punktuelle anthropogene Verschmutzungen, hydro-morphologische Veränderungen oder die Einmündung von Zubringerflüssen widerspiegeln.
- Monitoring-Studien ermöglichen die Untersuchung der zeitlichen Populationsdynamik des Wasser-Mikrobioms, anhand welcher repräsentative Referenzgemeinschaften für unterschiedliche saisonale und hydrologische Bedingungen beschrieben werden können.
- Einer der bedeutendsten Vorteile der hier vorgestellten NGS-Methodik ist, dass Untersuchungen auch retrospektiv für über Jahr(zehnt)e tiefgekühlte DNA-Probenbanken durchgeführt werden können. Somit können auch neue Fragestellungen – ggf. auch anhand neu entwickelter DNA-basierter Methoden – retrospektiv beantwortet werden.
- Die größten Hürden für die Anwendung der hier vorgestellten NGS-Methodik liegen aktuell noch bei der notwendigen bioinformatischen Expertise sowie der aufwendigen Probenprozessierung, wobei beide Schritte zunehmend durch kompetente Dienstleister angeboten werden.

7.5 Detailmethodik

Details zu der in der hier präsentierten Studie angewandten Methodik können der Referenzarbeit Savio et al. (2015) entnommen werden. Kurz zusammengefasst wurden bei der hier angewandten 16S rRNA-Gen-Amplikon-Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung zur hochauflösenden Untersuchung der Gesamtbakteriengemeinschaften Teilabschnitte der 16S rRNA-Gene der häufigsten Bakterien einer jeden Probe in einem Zwei-Schritt-PCR- (Polymerase-Kettenreaktions) -Verfahren vervielfältigt und um probenspezifische „Barcodes“ sowie für die DNA-Sequenzierung erforderliche Adaptersequenzen erweitert. Die DNA-Sequenzierung der DNA-Genabschnitte erfolgte auf einem Illumina® MiSeq-Sequenziergerät. Abb. 16 gibt einen Überblick über die erforderlichen Arbeitsschritte von der Probenentnahme bis hin zur Entschlüsselung der BCC einer Probe.

7.6 Referenzarbeiten

Savio D, Sinclair L, Ijaz UZ, Parajka J, Reischer GH, Stadler P, Blaschke AP, Blöschl G, Mach RL, Kirschner AKT, Farnleitner AH, Eiler A (2015): Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environ Microbiol* 17:4994-5007.

8 RASCHE AUFKLÄRUNG DER INFEKTIONSQUELLEN BEI LEGIONÄRSKRANKHEIT DURCH DEN EINSATZ VON MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN, DARSTELLUNG VON ZWEI EUROPÄISCHEN AUSBRUCHSSZENARIEN

Barbara Schrammel¹

¹ Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Abteilung Umwelthygiene

Bei gehäuften Auftreten von Legionärskrankheit ist meist ein und dasselbe wasserführende System die ursächliche Quelle, die es gilt, rasch zu finden, um den Ausbruch zu stoppen. Der positive Nachweis mittels kultivierungsbasierter Methoden in Kombination mit einer serologischen oder auf Antikörpern basierenden Typisierung der Kolonien liefert oft keine ausreichenden Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen Erregerstamm und Umweltprobe. Hier empfiehlt es sich, molekularbiologische Methoden als vergleichende Werkzeuge einzusetzen, mit denen der Erregerstamm sehr genau über den Vergleich von DNA-Sequenzen in den Umweltproben identifiziert werden kann. Je mehr Sequenzen bestimmt werden, umso genauer wird die Zuordnung. Andererseits ist eine Methodik notwendig, mit der sich effizient ein hoher Durchsatz an Proben abarbeiten lässt. In diesem Artikel werden zwei Ausbruchsszenarien skizziert und die jeweilige an die Situation angepasste Vorgangsweise.

8.1 Einleitung

Legionella pneumophila, der Erreger von 95 % aller gemeldeten Legionärskrankheitsfälle (Legionellose) europaweit [78], und andere Legionellen-Arten kommen als natürlicher Teil der Mikroorganismengemeinschaft in vielen wasserführenden Systemen vor. Erhöhte Temperaturen zwischen 20 bis 55 °C begünstigen die Vermehrung maßgeblich. Durch das Einatmen feiner Legionellen-haltiger Wassertröpfchen gelangen sie in die menschliche Lunge und können dort eine atypische Lungenentzündung auslösen.

Gibt es einen Erkrankungsfall an Legionellose, wird traditionell versucht, die Bakterien aus respiratorischem Material der erkrankten Person auf Legionellen-Nährmedium zu kultivieren. Parallel dazu werden mögliche Infektionsquellen, mit denen die erkrankte Person in Kontakt kam, ebenfalls beprobt und Kulturen angelegt. Die Artbestimmung und Typisierung mittels Serogruppen oder Antikörpern sind oft nicht ausreichend, um den Infektionsstamm von den diversen Umweltstämmen eindeutig zu unterscheiden [79]. Um einen sicheren Beweis der tatsächlichen Infektionsquelle erbringen zu können, bedarf es molekularbiologischer Detektions- und Identifikationsmethoden. Die direkte Detektion von Legionellen aus der Probe mittels kultivierungsunabhängiger Methoden wie der quantitativen PCR (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1, Seite 18) ist nach Anreicherungs-schritten möglich, aber noch immer eine große Herausforderung. Aus sehr geringen Mengen an genetischem Zielmaterial muss in einer meist komplexen Matrix, wie dem respiratorischen Sekret oder einer Kühlturmprobe, zuverlässig der gewünschte DNA-Abschnitt gefunden, vervielfältigt und damit messbar gemacht werden [80]. Der große Vorteil liegt darin, dass die Ergebnisse innerhalb weniger Stunden vorliegen und dass auch Zellen, die auf Kulturmedien nicht angezchtet werden können, nachweisbar sind [81].

Identifikationsmethoden, die sich der Analyse der DNA bedienen, nutzen deren Sequenz (genetischer Code, Basenabfolge) wie eine Visitenkarte des Erregers (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1, Seite 19). Die bislang umfassendste molekularbiologische Identifikations-Methode ist die Gesamt-Genom-Sequenzierung (Whole Genome-Sequenzierung), bei der versucht wird, das Genom (die gesamte DNA) eines Organismus zu entschlüsseln, um letztlich die einzelnen Stämme zu vergleichen. Diese Methode ist mit einem hohen Material- und Personaleinsatz verbunden, wird aber als zukunftsweisend angesehen. Vergleichende Analysen von Teilbereichen des Genoms sind aber oftmals schon ausreichend, um klare Zusammenhänge zu ermitteln. Zum Beispiel können durch die Analyse jener Gene, die für den Organismus essenziell und daher bei allen Stämmen einer Art zu finden sind (sog. „Kern-Genom“), bereits sehr genau

die Verwandtschaftsverhältnisse erkannt werden (Core Genome Multi-Locus Sequence Typing, cgMLST, Kerngenom-Multilokus-Sequenztypisierung) [82]. Seit Mitte 2018 ist an der Nationalen Referenzzentrale für Legionellen in Österreich diese Methode als molekulare Vergleichsanalyse etabliert. Mithilfe dieser Methodik wurden in Österreich im Jahr 2018 bei 4 Patientinnen und Patienten die Quellen der Infektion mit hoher Evidenz identifiziert [79].

Bei der schon länger etablierten Sequenz-basierten Typisierung (Sequence Based Typing, SBT) werden Sequenzen von mehreren, aber kürzeren DNA-Abschnitten betrachtet und Sequenztypen (ST) ausgewiesen, deren Auftreten und Virulenz weltweit miteinander verglichen werden kann [83]. Eine weitere Möglichkeit für den Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte sind die Verfahren der Hybridisierung, bei denen markierte DNA-Sonden an Zielgene binden und diese damit auffindbar machen (DNA-Microarrays, siehe Teil 1, Kapitel 2.3.2.1).

8.2 Fragestellung

- Wie können in einer Ausbruchssituation von Legionärskrankheit, in der schnelles Handeln vonnöten ist, verschiedene Legionellen-Stämme gefunden und unterschieden werden?
- Wie können wasserführende Systeme als Verursacher (Infektionsquellen) für die Verbreitung von infektiösen Legionellen eindeutig identifiziert werden, um den Ausbruch einzudämmen?

8.3 Darstellung

8.3.1 Fallstudie 1: Der Ausbruch von Stoke-on-Trent, Großbritannien, Juli 2012 (Coetzee et al. 2012; Mentasti et al. 2016)

Vom 02.07. bis 02.08.2012 wurde ein vermehrtes Auftreten von Legionärskrankheit in der Stadt Stoke-on-Trent in Großbritannien festgestellt.

24.07.2012: Das Nationale Referenz Labor für Legionellen (UK) erhielt 6 Sputum-Proben (Sekret-Auswurf) von erkrankten Personen mit Legionellose (Nachweis durch positiven Urin-Antigen-Test). Für fünf dieser Erkrankten wurde bis zum Abend eine Infektion mit *L. pneumophila* nach positivem PCR-Ergebnis bestätigt (kultivierungsunabhängig). Diese Proben wurden zur genaueren Untersuchung mittels Sequenz-basierter Typisierung an ein Speziallabor übermittelt.

25.7.2012: Die Typisierung ergab, dass 2 Erkrankte mit dem Sequenztyp ST1268 infiziert waren. Im Sputum der anderen drei Erkrankten war die Sequenztypisierung nur für manche Genabschnitte durchführbar, diese deuteten aber ebenfalls auf ST1268 hin.

27.7.2012: Umweltproben wurden in der Lebensumgebung der Erkrankten gezogen und auf dieselbe Art und Weise untersucht. In zwei Kühlturm-Proben wurde *L. pneumophila* mittels PCR entdeckt. Die Typisierung ergab allerdings keine Übereinstimmung mit dem Ausbruchsstamm, daher wurden die Kühltürme als mögliche Infektionsquelle ausgeschlossen. Schließlich wurde aus einer Abstrich-Probe aus einem Wellness-Becken der gleiche ST1268 wie in den Proben der Erkrankten nachgewiesen.

In Summe wurden 11 Proben von insgesamt 21 Erkrankungsfällen analysiert, wovon neun PCR-positiv waren und sechs davon eindeutig mit dem ST1268 infiziert. Mittels Kultivierung war *L. pneumophila* ST1268 nur in 6 Proben nachweisbar. Der verdächtige Stamm aus dem Wellness-Pool konnte trotz verstärkter Bemühungen (Hitze- und Säurebehandlung der Probe) aufgrund der hohen Konzentration an anderen Bakterien nicht kultiviert werden und wäre bei ausschließlicher Verwendung von Kultur-basierten Detektionsmethoden unerkannt geblieben. Mit der hier verwendeten direkten (kultivierungsunabhängigen) und schnellen Nachweismethode von *L. pneumophila* in Kombination mit einer Sequenz-basierter Typisierung konnte innerhalb von sieben Tagen ein Ausbruch identifiziert und die Ursache des Ausbruchs gefunden und eingedämmt werden.

8.3.2 Fallstudie 2: Der Ausbruch von Warstein, Deutschland, August 2013 (Petzold et al. 2017; Maisa et al. 2015)

Zwischen dem 01.08. und dem 06.09.2013 wurden in der Stadt Warstein und in der Umgebung der Stadt (Nordrhein-Westfalen, Deutschland) 159 verdächtige Fälle mit atypischer Pneumonie registriert. Alle Erkrankten waren wohnhaft in und rund um Warstein. Bei 78 Erkrankten wurde im Labor eine Infektion mit *L. pneumophila* bestätigt (Urin-Antigen-Test).

14.08.2013: Ein Patient verstarb an einer atypischen Lungenentzündung, eine gesteigerte Aufnahme von Patientinnen und Patienten mit atypischer Lungenentzündung wurde im Krankenhaus festgestellt. Aufgrund des vermuteten Ausbruchs wurden vermehrt Erkrankte auf Legionärskrankheit getestet.

21.08.2013: Die fieberhafte Suche nach dem Ausbruchsherd der Legionellen-Infektion startete: Am Ende waren es 880 Umweltproben und 26 Trinkwasserproben, die von der Universität Bonn und dem Konsiliarlabor für Legionellen in Dresden analysiert wurden. 68 Kühlsysteme und potenziell kontaminierte industrielle Anlagen wurden inspiziert, beprobt und desinfiziert. Der epidemiologisch relevante Legionellen-Stamm wurde aus Proben von 10 Erkrankten isoliert und als *L. pneumophila* identifiziert. Die Typisierung mittels serologischem Test, monoklonaler Antikörper (mAb) und Sequenz-basiertem Verfahren ergab die Zuordnung als Serogruppe 1, mAb-Subtyp Knoxville und Sequenztyp 345.

Die Identifikation der Quelle stellte sich als äußerst schwierig heraus, in der Mehrheit der vielen analysierten Umweltproben fanden sich eine enorme Anzahl an Legionellen-Kolonien (> 10⁶ KBE/100 ml) mit einer Vielfalt unterschiedlichster mAb-Subtypen und Sequenztypen. Außerdem war in vielen Proben in hoher Dichte ein zweiter Legionellen Stamm des gleichen mAb-Subtyps (Knoxville), aber eines anderen Sequenz-Typs (ST 600) präsent, dessen Kolonien das gleiche morphologische Erscheinungsbild zeigten und nicht mit mAb-Subtypisierung zu unterscheiden waren.

Zur Differenzierung wurde daher auf eine kostengünstige und schnelle Methode zurückgegriffen, mit der in hohen Durchsatzraten möglichst viele Legionellen-Isolate getestet und verglichen werden können. Ein neu entwickelter DNA-Microarray (Biochip) kam im Konsiliarlabor für Legionellen dafür zum Einsatz.

26.08.2013: Mittels DNA-Microarray wurde bestätigt, dass ein Kühlturm mit mehreren Sub-Typen an Legionellen, darunter auch der relevante Stamm ST345, kontaminiert war. Des Weiteren wurde eine geringe Konzentration an Legionellen in einem Kühlturm einer anderen Fabrik und im Flusswasser entdeckt. Es stellte sich heraus, dass in dieser Fabrik die Vorreinigungsstufe der Kläranlage mit dem epidemiologisch relevanten Stamm hoch belastet war. Vermutlich wurde von der privaten Betriebs-Kläranlage, in der sich Bakterien durch das hohe Nährstoffangebot stark vermehren konnten, die Legionellen über einen direkten Kanal in die öffentliche Kläranlage und weiter in das Flusswasser eingebracht, das wiederum zum Betrieb des kontaminierten Kühlturms in der Stadt und stromabwärts verwendet wurde.

8.4 Schlussfolgerungen aus den Fallbeispielen

- Mittels molekularbiologischer Methoden (PCR) lässt sich im spezialisierten Labor Legionellen-DNA direkt innerhalb weniger Stunden aus klinischen und Umweltproben isolieren und identifizieren. In Stoke-on-Trent beispielsweise konnte der Infektionsstamm in der Umweltprobe nicht kultiviert werden, sondern wurde erst mithilfe von molekularbiologischen Methoden entdeckt.
- Die Sequenz-basierte Typisierung ermöglicht die Zuordnung des Erregerstamms zur Infektionsquelle, falls es sich um einen selten vorkommenden Sequenzstamm handelt.
- Im Ausbruch von Warstein war es aufgrund der riesigen Zahl an *L. pneumophila*-Kolonien und dem gleichzeitigen Wachstum verschiedener *L. pneumophila*-Stämme in den Wasserproben notwendig, mithilfe einer effizienten Methode die Infektionsquelle zu finden. Mit einem Biochip konnte man schnell und ohne große Anstrengungen in der Datenauswertung über ein optisches Muster vergleichende Analysen der Stämme durchführen.

- Die bisher übliche Typisierung von Legionellen-Kolonien mithilfe von serologischen Tests und Antikörper-Typisierungs-Schema (Dresden-Panel) kommt schnell an ihre Grenzen in der feinen Unterscheidung von nah verwandten Legionellen-Stämmen. Mittels Techniken, die die DNA-Sequenz eines Organismus oder bestimmte Teile davon zur vergleichenden Analyse verwenden, lassen sich momentan die genauesten Erreger-Ursachen-Nachweise erbringen. Je größer der betrachtete Genomabschnitt ist, desto genauer können Erregerstämme ursächlichen Quellen zugeordnet werden.

8.5 Detailmethodik

8.5.1 Fallbeispiel 1

Der direkte Nachweis von Legionellen erfolgte mittels real-time PCR (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1, Seite 18) vom mip-Gen (spezifisch für alle Arten von Legionella) und vom wzm-Gen (spezifisch für *L.-pneumophila*-Serogruppe 1). Die Typisierung (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1, Seite 19) wurde mit einer sequenzbasierten Typisierung (SBT), basierend auf PCR (ndSBT), durchgeführt (Coetzee et al. 2012; Mentasti et al. 2016).

8.5.2 Fallbeispiel 2

Für die Typisierung wurden die Produkte einer multiplexen PCR (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1, Seite 18), bei der mehrere ausgewählte Genabschnitte der verdächtigen Legionellen-Isolate gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß vervielfältigt werden, auf den Biochip aufgebracht. Wenn die Gensequenz eines Legionellen-Isolats einem DNA-Abschnitt auf dem Chip (= Probe) entspricht, bindet sie an den Chip (Hybridisierung, siehe Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) und ein lokales Farbsignal entsteht. Der Biochip besteht aus 97 unterschiedlichen, kurzen Genabschnitten (Probes) entsprechend der Legionellen-DNA, die in vierfacher Ausführung aufgebracht sind. Diese kurzen Genabschnitte sind derart gewählt, dass eine Unterscheidung von sehr nah verwandten *L.-pneumophila*-SG1-Stämmen durch ein charakteristisches Bindungsmuster, das sich am Chip ergibt, möglich ist. Die Kolonien der zwei nah verwandten Sequenztypen ST 345 und ST 600 konnten so sehr rasch und effizient eindeutig voneinander unterschieden werden (Petzold et al. 2017; Maisa et al. 2015).

8.6 Referenzarbeiten

Coetzee N, Duggal H, Hawker J, Ibbotson S, Harrison TG, Phin N, Laza-Stanca V, Johnston R, Iqbal Z, Rehmaan Y, Knapper E, Robinson S, Aigbogun N (2012): An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom. *Euro Surveill* 17:20271.

Maisa A, Brockmann A, Renken F, Lück C, Pleischl S, Exner M, Daniels-Haardt I, Jurke A (2015): Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013. *Euro Surveill* 20(46):30064.

Mentasti M, Afshar B, Collins S, Walker J, Harrison T G, Chalker V (2016): Rapid investigation of cases and clusters of Legionnaires' disease in England and Wales using direct molecular typing. *J Med Microbiol* 65:484–493.

Petzold M, Ehrlich R, Slickers P, Pleischl P, Brockmann A, Exner M, Monecke S, Lück C (2017): Rapid genotyping of Legionella pneumophila serogroup 1 strains by a novel DNA microarraybased assay during the outbreak investigation in Warstein, Germany 2013. *Int J Hyg Environ Health* 220:673-678.

9 MIKROBIELL BEEINFLUSSTE KORROSION IN NATÜRLICHEN WÄSSERN: MECHANISMEN UND EXPERIMENTELLER ANSATZ ZUR RISIKOABSCHÄTZUNG

Paul Linhardt¹

¹ Technische Universität Wien, Institut für chemische Technologien und Analytik

In natürlichen Süßwässern können vornehmlich aerobe Mikroorganismen wie Manganoxidierer oder Peroxidbildner durch den Effekt des Ennoblements die Korrosionsbelastung für metallische Werkstoffe drastisch erhöhen und so zu Schäden führen, die als mikrobiell beeinflusste Korrosion (MIC) klassifiziert werden. Durch Auslagerung von Proben und Registrierung des freien Korrosionspotenzials mittels geeigneter Sonden lässt sich das Risiko für mikrobielles Ennoblement in einem Gewässer erfassen.

9.1 Einleitung

Natürliche Wässer stellen den Lebensraum einer schier unendlichen Vielfalt an Mikroorganismen dar, die teils planktonisch (im Wasser schwebend), teils sessil im Biofilm existieren und ihre Stoffwechselprozesse haben mehr oder weniger großen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung des Wassers. Schon diese recht simple Betrachtung lässt vermuten, dass Korrosionsvorgänge, definiert als die Wechselwirkung zwischen Werkstoff und umgebendem Medium, in natürlichen Wässern durch mikrobielle Vorgänge beeinflusst werden können. Speziell wenn Biofilm an der Werkstoffoberfläche anhaftet (siehe ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 1, Kapitel 1.2 – Technische Aspekte), ist es naheliegend, dass Korrosion dann vornehmlich durch den Chemismus des Biofilms an der Grenzfläche beeinflusst wird und nur wenig durch das freie Wasser selbst. Somit ergibt sich recht zwanglos, dass in natürlichen Wässern mikrobiell beeinflusste Korrosion (microbially influenced corrosion, MIC) eher die Regel als die Ausnahme sein sollte. Inwieweit die derzeit bei Verantwortlichen für das Planen, Errichten und den Betrieb von technischen Systemen, die in oder mit natürlichem Wasser operieren, noch immer vielfach angetroffene Ansicht zutrifft, dass Schadensfälle durch MIC „besonders unglückliche Umstände“ darstellen, mag also dahingestellt sein. Jedenfalls aber sind solche Schadensfälle an nahezu allen metallischen Werkstoffen hinreichend bekannt, von Meer-, Fluss- und Grundwasser bis hin zu Trinkwasser. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf Süßwässer.

Aus korrosionschemischer Sicht ist für einen MIC-Mechanismus der für die Korrosivität verantwortliche Stoffwechseltypus und nicht der Organismen-typus relevant. Deshalb kann trotz der großen Organismen-vielfalt eine überschaubare Anzahl an MIC-Mechanismen identifiziert werden. Nach über 25 Jahren Bearbeitung von MIC-Schadensfällen in Süßwassersystemen (Trink-, offene Kühl- und Prozesswasser-Systeme und speziell Wasserkraftanlagen) durch den Autor lässt sich aber sagen, dass praktisch ausschließlich aerobe Systeme angetroffen wurden, in denen durch mikrobielle Manganoxidation [84, 85] oder Peroxidbildung [86, 87] die überwiegend eingesetzte Werkstoffgruppe der Nichtrostenden Stähle von den Schäden betroffen waren oder diese indirekt Schäden mitverursacht haben. Schäden durch die anderen bekannten Gruppen wie sulfatreduzierende Bakterien, Eisenoxidierer, Säurebildner wurden dagegen nicht beobachtet.

Die korrosive Wirkung der Manganoxidierer liegt in ihrer Fähigkeit, auch nur Spurengehalte (wenige µg/L) an Mn(II)-Ionen zu Mn(III/IV) zu oxidieren und als feste Mn(III/IV)hydroxioxide (Braunstein) im Biofilm abzulagern. Diese Substanz wirkt korrosionschemisch deutlich stärker als der normalerweise dominante Sauerstoff. Die Peroxidbildner reichern das Stoffwechselprodukt (Wasserstoff-)Peroxid im Biofilm an und auch hier stellt dessen stark oxidierende Wirkung den korrosiven Effekt dar.

Speziell in der Wasserkraftindustrie ist daher der Wunsch nach einer Methode entstanden, das Risiko für solche Schadensszenarien in einem Projekt bereits durch Voruntersuchungen abschätzen zu können.

9.2 Fragestellung

- Wie kann das Risiko für MIC in natürlichen Wässern abgeschätzt werden?

9.3 Methodenbeschreibung

Da MIC in natürlichen Wässern praktisch immer mit Biofilm in Zusammenhang steht, ist es wenig aussichtsreich, eine Risikoabschätzung durch Analysen von Wasserproben vornehmen zu wollen. Einerseits erlauben chemische Analysen kaum Rückschlüsse darauf, welche Substanzen irgendwo in Biofilmen angereichert vorkommen könnten, andererseits lassen mikrobiologische Untersuchungen der notwendigerweise planktonischen Mikrobiota (z. B. durch DNA-Sequenzierung, siehe ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) keine Rückschlüsse auf die mögliche Qualität von Biofilmen zu. Darüber hinaus sind die infrage kommenden Analyten, sowohl chemisch wie auch mikrobiologisch, erst bestenfalls ansatzweise bekannt.

Es wurde daher ein anderer Ansatz (Linhardt 2017) verfolgt, der die elektrochemische Natur der Korrosion metallischer Werkstoffe im wässrigen Milieu zur Grundlage hat, wie im Folgenden kurz dargestellt wird. Kurz gesagt kann durch Messung elektrochemischer Größen eines Metalls eine korrosionsrelevante, chemische Veränderung seiner Umgebung festgestellt werden, wie sie etwa durch Biofilmbildung erfolgen kann. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass keine Kenntnis der verantwortlichen chemischen Substanzen oder der Organismen erforderlich ist, da unmittelbar die relevante Wirkung detektiert wird.

9.3.1 Das elektrochemische Korrosionspotenzial E_{corr}

Ein Korrosionssystem entsteht spontan, wenn Metall von Elektrolyt (Wasser) umgeben ist und ein Oxidationsmittel (normalerweise der gelöste Sauerstoff) Zutritt zur Metalloberfläche hat. Das Oxidationsmittel versucht zu reagieren, indem es dem Metall Elektronen entzieht (sog. kathodische Reaktion) und somit tendenziell das elektrochemische Potenzial des Metalls erhöht. Darauf kann das Metall durch Freisetzung von positiv geladenen Metallionen reagieren (sog. anodische Reaktion), was tendenziell das Potenzial absenkt.

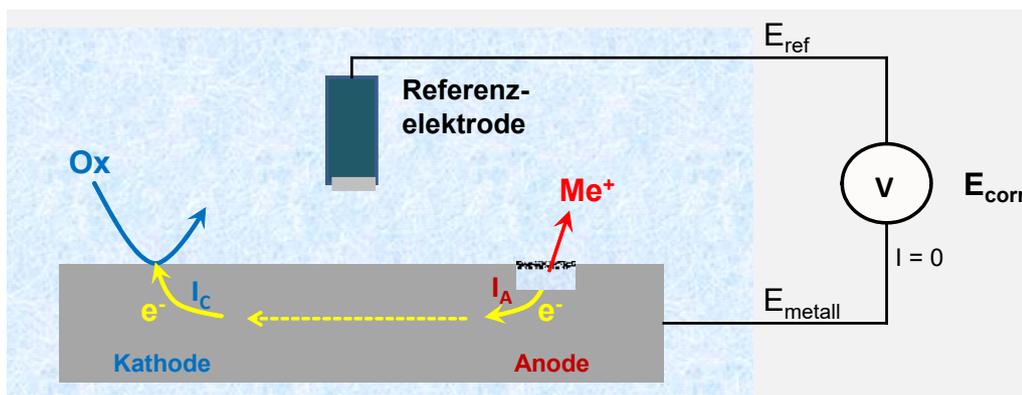


Abb. 21 Schema zur Messung des Korrosionspotenzials

Wie in Abb. 21 schematisch dargestellt, bildet sich durch dieses Wechselspiel der Reaktionen ein mittleres Potenzial für das Metall aus (E_{metall}). Durch einfache Spannungsmessung gegen eine sog. Referenzelektrode, die ein konstantes Potenzial (E_{ref}) zur Verfügung stellt, kann das sog. Korrosionspotenzial (E_{corr}) bestimmt werden. Da es verschiedene Typen von Referenzelektroden gibt, müssen solche Potenzialangaben mit der Information über den Elektrodentyp versehen werden. Im Folgenden werden daher Potenzialangaben in „mV SCE“ angeführt, womit die gesättigte Kalomelektrode (saturated calomel electrode, SCE) ausgewiesen wird, die in der Korrosionschemie eine der meistverwendeten Referenzelektroden darstellt.

Durch Beobachtung von E_{corr} ist es nun möglich, Veränderungen der kathodischen Reaktion (z. B. das Auftreten eines neuen Oxidationsmittels) oder der anodischen Reaktion (z. B. das Einsetzen von Metallauflösung) zu erkennen.

9.3.2 Der Effekt des „Ennoblements“

Wenn die anodische Reaktion an einem Metall stark behindert ist, was bei Nichtrostenden Stählen im passiven Zustand der Fall ist, so reagiert E_{corr} besonders empfindlich auf Veränderungen der kathodischen Reaktion. Kommt es nun zu Biofilmbildung, bei der z. B. Manganoxidierer oder Peroxidbildner signifikant beteiligt sind, dann bewirken diese stärkeren Oxidationsmittel einen deutlichen Anstieg von E_{corr} . Dieser Effekt ist schon lange bekannt und wird in der Literatur als Ennoblement bezeichnet. Die zugrundeliegenden chemischen Mechanismen sind aber erst in den vergangenen Jahren aufgeklärt worden und es gibt Annahmen über weitere mikrobielle Mechanismen, die Ennoblement verursachen können, die aber in der Praxis noch nicht identifiziert worden sind.

9.3.3 Das Projekt MICRA-buoy

Um nun der Wasserkrafttechnologie ein Werkzeug zur Risikoabschätzung für MIC in die Hand geben zu können, wurde MICRA-buoy entwickelt (MICRA = microbially influenced corrosion risk assessment). Also eine Art Boje, die im interessierenden Wasserkörper einige Zeit exponiert wird und durch oben beschriebene Potenzialmessungen an Werkstoffproben Rückschlüsse auf korrosionsrelevante Effekte und das Ennoblement durch Biofilm erlaubt.

Diese Sonde besteht aus einer gekapselten Datenerfassungseinheit, einem Probenhalter für Werkstoffproben, einer Referenzelektrode und einem Temperatursensor. Der Probenhalter ist von einem Schutzrohr aus Kunststoff umgeben, um mechanische Beschädigungen zu vermeiden. Die Sonde wird im Labor einsatzfertig gemacht, an Ort und Stelle muss sie dann nur aktiviert und an geeigneter Position frei hängend im Wasserkörper versenkt werden, wozu oft Schwimmkörper Anwendung finden. Nach der Expositionszeit von typischerweise 3 Wochen und Rücktransport ins Labor werden die Daten ausgewertet, die Proben begutachtet und ggf. Analysen gemacht. In der Regel wird auch eine Wasserprobe gezogen und chemisch analysiert.



Abb. 22 Von links: Drei Bauformen von MICRA-buoy; Probenhalter mit Werkstoffproben und Referenzelektrode bestückt; MICRA-1 an einem Schwimmkörper, kurz vor der Exposition in einem Gewässer (mit Genehmigung)

Mittlerweile sind 3 derartige Sonden (Abb. 22) im Einsatz, sie wurden in einigen Wasserkraftprojekten, aber auch in Schadensfällen und versuchsweise auch in Meerwasser eingesetzt.

9.4 Ergebnisse von MICRA-buoy Anwendungen

Die überwiegende Anzahl der bisherigen Auslagerungen von MICRA-Sonden hat im Rahmen von Wasserkraftprojekten in Flüssen außerhalb Europas stattgefunden. In Abb. 23 sind die Resultate zweier solcher Anwendungen gegenübergestellt, die den Effekt des Ennoblement verdeutlichen. In beiden Fällen wurden Proben aus Nichtrostendem Stahl (NIRO, Werkst.-Nr. 1.4301) und einem Kupferwerkstoff (Nickel-Aluminium-Bronze, NAB, $\text{CuAl}_{10}\text{Fe}_5\text{Ni}_5$) eingesetzt. Ohne Ennoblement liegt das Korrosionspotenzial von NIRO erfahrungsgemäß im typischen Bereich von ± 100 mV_{SCE}. Die Potenzialverschiebung durch Ennoblement beträgt etwa +200 bis über +400 mV und hängt einerseits von der verursachenden Substanz, aber auch vom pH des Wassers bzw. im Biofilm ab. Wie die Daten zeigen, ist es am NIRO-Stahl Nr. 1.4301 im Fall (a) nicht zu Ennoblement gekommen, im Fall (b) dagegen schon. NAB ist als Kupferwerkstoff nur von kupfertoleranten Organismen besiedelbar, was das Ausbleiben von Ennoblement erklärt. In Abb. 23b sind auch (zur besseren Übersicht verkürzt) die Daten für den NIRO-Stahl Nr. 1.4006 dargestellt, der mit 13 % Chromgehalt deutlich niedriger legiert ist als Nr. 1.4301 (18 % Cr) und daher auch korrosionsempfindlicher ist. Er setzt wiederholt zum Potenzialanstieg an, unterliegt dadurch aber Korrosion und das Potenzial sinkt wieder ab. Der mit dem Korrosionsprozess einhergehende Werkstoffverlust wurde in der nachfolgenden Untersuchung des Probenmaterials verifiziert und es konnte durch chemische Analysen biomineralisierter Braunstein als Ursache für das Ennoblement identifiziert werden.

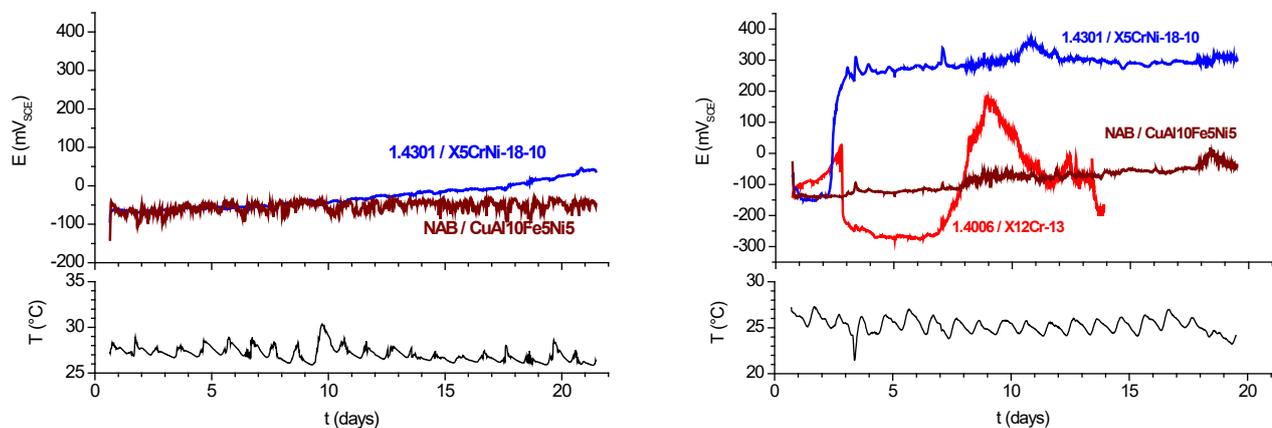


Abb. 23 Ergebnisse von MICRA-Auslagerungen in zwei Flüssen: (a) Kein Ennoblement an NIRO 1.4301 und NAB. (b) Sprunghaftes Ennoblement nach 2 Tagen am NIRO aber nicht an NAB. NIRO 1.4006 tendiert zu Ennoblement, reagiert darauf aber mit Korrosion

Ein anderer Anwendungsbereich von MICRA-buoy liegt in der MIC-Schadensanalyse. Während durch Analysen von Schadensteilen oft nur Indizien für einen MIC-Mechanismus gewonnen werden können, kann mit MICRA-buoy eine MIC-Belastung unmittelbar nachgewiesen werden. Abb. 24 gibt dazu ein Beispiel:

An Schweißnähten von Brunnenwasser-Rohrleitungen aus NIRO-Stahl Nr. 1.4571 ist es zu korrosionsbedingten Leckagen gekommen. Es war unklar, ob die Qualität der Schweißnähte alleine die Ursache war, oder ob eine Zusatzbelastung durch Ennoblement geherrscht hat. Es wurde MICRA-buoy mit 4 redundanten Proben des Werkstoffs bestückt und in den Brunnen abgesenkt. Nach rund 3 Wochen war das Ergebnis eindeutig, es kommt in dem Brunnenwasser tatsächlich zu Ennoblement, wie der Potenzialanstieg deutlich anzeigt.

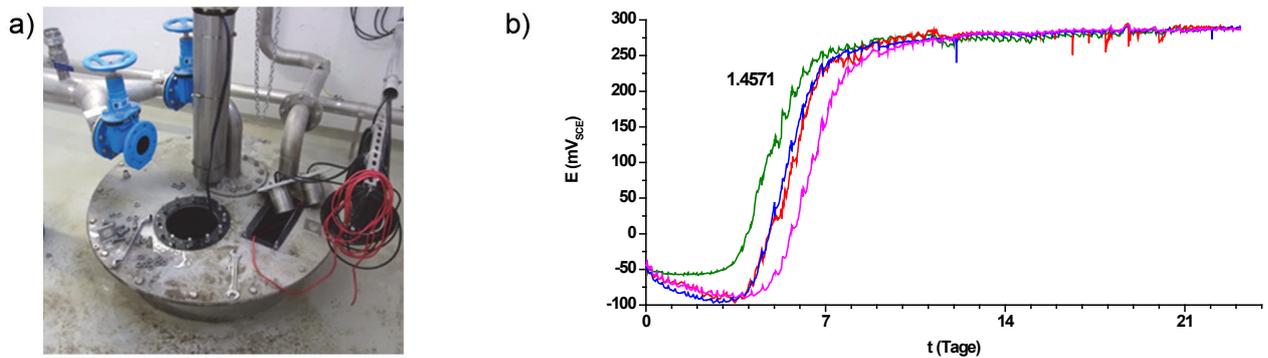


Abb. 24 (a) Brunnenöffnung zum Einbringen von MICRA-buoy, (b) Potenzialverlauf der 4 Proben aus NIRO 1.4571

9.5 Schlussfolgerungen

- Mittels Registrierung des Korrosionspotenzials kann Information über das Auftreten von korrosionsrelevanten mikrobiellen Vorgängen in einem Gewässer gewonnen werden.
- Eine geeignete Sonde dafür wurde entwickelt und als MICRA-buoy vorgestellt.
- Ein MICRA-buoy-Einsatz ist kein Korrosionsversuch! Es kann lediglich die Bildung von möglicherweise korrosionsrelevantem Biofilm an unterschiedlichen Werkstoffproben verfolgt werden. Eventuell auftretende Korrosionsvorgänge bieten aber wertvolle Zusatzinformation zum Korrosionsrisiko.
- Durch zukünftige messtechnische Erweiterungen (Messung galvanischer Ströme, Potenziostatenfunktion, Lichtmessung) wird es möglich sein, weitere Informationen zu Art, Qualität und Korrosivität von Biofilmen zu erhalten.
- Derartige In-situ-Experimente erschließen neue Einsichten in die Dynamik der auf metallische Werkstoffe einwirkenden, mikrobiell stark mitbeeinflussten Korrosionsbelastung in natürlichen Gewässern.

9.6 Detailmethodik

Quasikontinuierliche Messung des Korrosionspotenzials von Werkstoffproben während der Biofilmbildung direkt im Wasserkörper durch eine geeignete Sonde (MICRA-buoy).

9.7 Referenzarbeiten

Linhardt P (2017): Direct assessment of microbial ennoblement in natural waters. In: Proceedings of EU-ROCORR Curran Associates Inc., NY (Prague/CZ, Sept. 3-7 2017), pp 2309-1216.

10 ANALYSE VON SARS-COV-2 IM ABWASSER ALS ERGÄNZENDE INFORMATIONSQUELLE FÜR DAS PANDEMIE-MANAGEMENT – EIN BEISPIEL FÜR DIE ANWENDUNG DES ABWASSEREPIDEMIOLOGISCHEN ANSATZES

Julia Vierheilig^{1,2}, Jörg Krampe¹, Norbert Kreuzinger¹

¹ Technische Universität Wien, Institut für Wassergüte und Ressourcenmanagement

² Interuniversitäres Kooperationszentrum Wasser und gesundheit (ICC Water&Health), www.waterandhealth.at

Die COVID-19 -Pandemie stellte sich als massiver „Booster“ für die abwasserbasierte Epidemiologie dar. In der hier beispielhaft dargestellten Studie wurde auf molekularbiologischen Methoden basierend neben der Quantifizierung von SARS-CoV-2 im Abwasser durch die Technik der RTqPCR auch die Überwachung besorgniserregender Virusvarianten mithilfe des Nachweises von Schlüsselmutationen durch dPCR und Genomsequenzierung durchgeführt. Zur Normalisierung der RT-qPCR-Ergebnisse wurde die Berechnung der Virenfracht verwendet, welche neben dem Ansatz über den Gesamtstickstoff (Einwohnerwert $EW_{1,1}$) national und international häufig in der Auswertung der Daten zum Einsatz kommt. Die beobachtete zeitliche Entwicklung der SARS-CoV-2-Konzentration und des Anteils der Omikron-Variante im Abwasser veranschaulicht eindrucksvoll, dass die abwasserbasierte Epidemiologie ergänzend zu klinischen Testungen einen entscheidenden Beitrag zur Verfolgung des Pandemiegeschehens in der Bevölkerung leisten kann. Zudem erwies sie sich als wirksames Instrument zur Früherkennung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten. Eine weitere Stärke der abwasserbasierten Epidemiologie ist außerdem, dass sie Informationen für ein ganzes Einzugsgebiet liefern kann und somit die Überwachung großer Bevölkerungszahlen erlaubt. Dadurch stellt sie im Vergleich zur klinischen Testung von einzelnen Personen eine kostengünstige, schnelle und verlässliche Informationsquelle über die Verbreitung eines Virus und seiner Varianten dar. Die abwasserbasierte Epidemiologie bietet somit ein geeignetes Konzept zur ergänzenden Überwachung der gegenwärtigen Pandemie sowie ein vielversprechendes Frühwarnsystem bei zukünftigen Krisensituationen im Bereich der öffentlichen Gesundheit.

10.1 Einleitung

Der Zusammenhang zwischen fäkalbürtigen Krankheitserregern im Abwasser und der menschlichen Gesundheit ist spätestens seit der Cholera-Epidemie 1854 in London-Soho und den Erkenntnissen von John Snow etabliert. Ausgehend vom Themenfeld der Wasserhygiene, das sich insbesondere durch Robert Koch massiv weiterentwickelt hat und in weiterer Folge von Bakterien auf Viren und Protozoen erweitert wurde, erfolgten die ersten gezielten Untersuchungen von Abwasser auf Viren 1940 in New York City und anderen Städten auf Poliovirus [88]. Insbesondere das Aufkommen und die kontinuierliche Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden haben die Möglichkeiten und damit auch die Anwendungsbereiche seit den 1980ern massiv erweitert [89]. Dies ermöglichte auch systematische Untersuchungen von Abwasser als integrativen und repräsentativen Ansatz zur Erhebung des Infektionsgeschehens in der an das Kanalnetz angeschlossenen Bevölkerung und wurde auch durch die WHO im Rahmen der „Global Polio Eradication Initiative“ eingesetzt. Im Zuge dessen wurde der Begriff „Wastewater-based Epidemiology – WBE“ (abwasserbasierte Epidemiologie) geprägt. Während in der Wasserqualitätsanalyse die Gefährdung durch die Wassernutzung im Mittelpunkt steht, geht es bei der abwasserbasierten Epidemiologie darum, den Status der öffentlichen Gesundheit zu überwachen und daraus mögliche Maßnahmen zu deren Schutz abzuleiten. Jüngst wurde WBE bereits sehr zeitig in der COVID-19-Pandemie (engl.: Corona Virus Disease 2019) als Möglichkeit gesehen, Informationen zur Entwicklung des Infektionsgeschehens als ergänzende Datenbasis für die Darstellung des Pandemieverlaufs zu erhalten [90, 91], zumal insbesondere zu Beginn der Pandemie keinerlei humane Testsysteme für die breite Bevölkerung zur Verfügung standen und erhobene Infektionszahlen generell von der Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Tests, der Teststrategie und anderen Faktoren beeinflusst sind. Weiters erlaubt der abwasserepidemiologische Ansatz sehr rasche und kostengünstige Aussagen über die Verbreitung von Virusvarianten und Trends im Pandemiegeschehen. SARS-CoV-2 (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2) stellte

sich hier als massiver „Booster“ für die abwasserbasierte Epidemiologie dar und sowohl die wissenschaftliche Gemeinschaft als auch die Hersteller molekularbiologischer Lösungen haben hier in kurzer Zeit die methodischen Entwicklungen und Möglichkeiten stark weitergetrieben. Dabei ist zu erwähnen, dass die Methodik auf dem Nachweis von viraler RNA beruht, die kein Infektionsrisiko darstellt. Infektiöses Material des SARS-CoV-2-Virus konnte im Abwasser bisher nicht detektiert werden, weshalb das Infektionsrisiko durch Abwasser nach derzeitigem Wissensstand als sehr gering eingeschätzt wird [92–94].

10.2 Fragestellung

- Welche Informationen können aus dem abwasserepidemiologischen Ansatz zur Untersuchung von SARS-CoV-2 abgeleitet werden?
- Stellt die abwasserbasierte Epidemiologie ein geeignetes Konzept zur Überwachung der gegenwärtigen Pandemie sowie als Frühwarnsystem bei zukünftigen Krisensituationen im Bereich der öffentlichen Gesundheit dar?

10.3 Darstellung

Die Basis für alle abwasserepidemiologischen Untersuchungen stellt eine repräsentative Probe des Abwassers dar. Hierfür liegt in Österreich eine international hervorragende Ausgangssituation vor, da Kläranlagen hierzulande für die Überwachung der Reinigungsleistung routinemäßig 24 Std. volumenproportionale Tagesmischproben (C.V.V.T – constant volume variable time) ziehen. Diese in gekühlten automatischen Probenehmern gesammelten Proben stellen die Basis für die weitergehende molekularbiologische Analytik dar, wobei für die Erhebung z. B. in Kanalteileinzugsgebieten oder speziellen „Points of Interest“ im Kanaleinzugsgebiet (Spitäler, Flughäfen, Kasernen, Altersheime etc.) auch zeitproportionale Proben (C.T.C.V – constant time constant volume) geeignet sind. Die weitere Probenaufbereitung kann im analysierenden Labor oder auch dezentral auf den Kläranlagen bzw. in zwischengeschalteten Einheiten (z. B. Labore der Bundesländer) erfolgen, von wo der Weiterversand zur molekularbiologischen Analyse erfolgt. Eine Darstellung der grundsätzlichen Arbeitsschritte ist in Abb. 25 zusammengefasst.

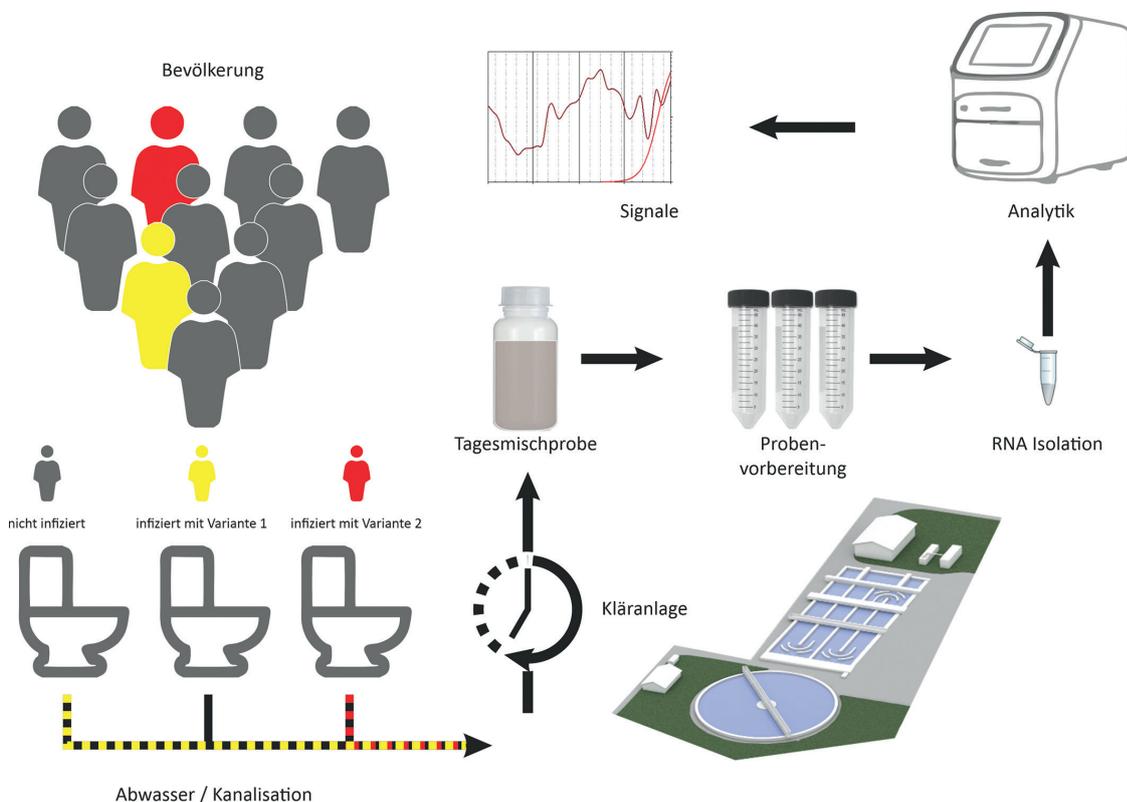


Abb. 25 Ablauf der SARS-CoV-2-Untersuchungen im Abwasser (Zulauf von Kläranlagen) als Beispiel für die Anwendung des abwasserepidemiologischen Ansatzes

Neben der Quantifizierung von SARS-CoV-2, bei der das virale Erbgut (die Ribonukleinsäure, RNA) detektiert wird, werden auch besorgniserregende Virusvarianten (engl.: Variants of Concern, VOC) überwacht (Amman et al. 2022; Radu et al. 2022). Für eine entsprechende zeitliche Auflösung der Entwicklung des Signals im Abwasser werden die quantitativen Messungen üblicherweise zwei oder dreimal in der Woche durchgeführt, die Untersuchungen der VOCs einmal wöchentlich. Um die Fluktuationen im Abwasseranfall sowie die Dynamik bei den Ausscheidern zu berücksichtigen, werden die erhaltenen Signale auf unterschiedliche Art normalisiert. Neben dem Ansatz über den Gesamtstickstoff kommt häufig auch die Berechnung der Virenfracht zum Einsatz, bei der die Gesamtabwassermenge am Messtag einbezogen wird (ausführlichere Darstellung: s. Detailmethodik). Als Ergebnis der Normalisierung über den Gesamtstickstoff ergibt sich die Einheit „Genkopien pro EW_{11} (Einwohnerwert₁₁)“. Steigt die Zahl der infizierten Personen an, so erhöhen sich der Zahlenwert der Genkopien bezogen auf die einwohnerspezifisch immer gleichbleibende Stickstoffmenge. Dadurch, dass diese Größe auf die durchschnittliche Stickstoff-Ausscheidemenge einer Person bezogen ist und nicht auf die absolute Menge, können auch Kläranlagen unterschiedlicher Größe gut miteinander verglichen werden, sodass sich die Normalisierung auf EW_{11} schlussendlich gut für einen flächendeckenden Vergleich größerer räumlicher Einheiten eignet und sowohl national als auch international Verwendung findet. Bei der Berechnung der Virenfracht hingegen handelt es sich um die Errechnung von Absolutwerten, die vom Abwasseranfall und damit von der Größe der Kläranlage abhängig sind und somit keinen Vergleich unterschiedlicher Kläranlagen erlauben. Dafür eignet sich die Frachtbetrachtung besser für die Trendverfolgung einer einzelnen Kläranlage. Aufgrund des unterschiedlichen Infektionsverlaufs unterschiedlicher Infizierter und der daraus resultierenden Variabilität der Ausscheidung viraler Partikel ist jedoch eine Umrechnung der Anzahl der Infizierten Ausscheider in einem Kanaleinzugsgebiet aus dem Abwassersignal nicht durchführbar. Außerdem stellt der dynamische Abwasseranfall infolge Ein- bzw. Auspendler:innen sowie im Zusammenhang mit Urlaubsreisen (Tourist:innen sowie räumliche Abwesenheiten) eine gewisse intrinsische Limitierung der Abwasseranalytik dar, der sich insbesondere auf kleineren Kläranlagen (< 10.000 EW) und ausgeprägten Tourismusanlagen bemerkbar macht, während dieser Aspekt bei größeren Anlagen weniger relevant ist. Zudem gibt es für die SARS-CoV-2-Abwasserüberwachung bisher noch keine standardisierten Protokolle oder harmonisierte Verfahren zur Qualitätssicherung und -kontrolle [95].

In Abb. 26 ist beispielhaft eine Visualisierung der zeitlichen Entwicklung der mit RT-qPCR (Verweis auf Teil 1, Kapitel 2.3.2.1) gemessenen SARS-CoV-2-Konzentration im Abwasser sowie des mittels dPCR erhobenen Anteils der Omikron-Variante (Linie B.1.1.529, Sublinie BA.1) auf einer „typischen“ kommunalen österreichischen Kläranlage (Ausbaugröße 55.000 EW) dargestellt. Dem Verlauf sind die von der AGES (Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) auf das Einzugsgebiet der Kläranlage aggregierten Infektionszahlen für die einzelnen Tage der Periode hinterlegt.

Der Zeitraum September 2021 bis Jänner 2022 wurde bewusst gewählt, um mehrere Ergebnisse der abwasserepidemiologischen Ergebnisse darzustellen. Einerseits ist deutlich der parallele, jedoch etwas zeitverschobene Verlauf des Abwassersignals mit der Anzahl der Infizierten zu erkennen, der im Beispiel jedoch von zwei Peaks (rote Kästchen) unterbrochen wird und vom erwarteten Signalverlauf (strichlierte, die Zusatzpeaks abkürzende Gerade) abweicht. Hier handelt es sich um zwei lokale Infektions-Cluster (1: „Heurigencluster“; 2: „Partycluster“), die unmittelbar beim Auftreten im Abwasser detektiert wurden, sich jedoch in den Infektionszahlen nicht widerspiegeln, da z. B. die Infizierten anderen räumlichen Einheiten zugeordnet sind. Eine weitere interessante Beobachtung ist der Abfall der Frachten nach dem 25.12.2021, der damit erklärt wird, dass infizierte Personen nach den Weihnachtstagen das Einzugsgebiet der Kläranlage verlassen, was sich auch im deutlich geringeren Abwasseranfall ab diesem Tag zeigt. Parallel lässt sich erkennen, dass sich ab etwa Anfang/Mitte Dezember die Omikron-Variante beginnt durchzusetzen und um Weihnachten die 50%-Marke durchbricht.

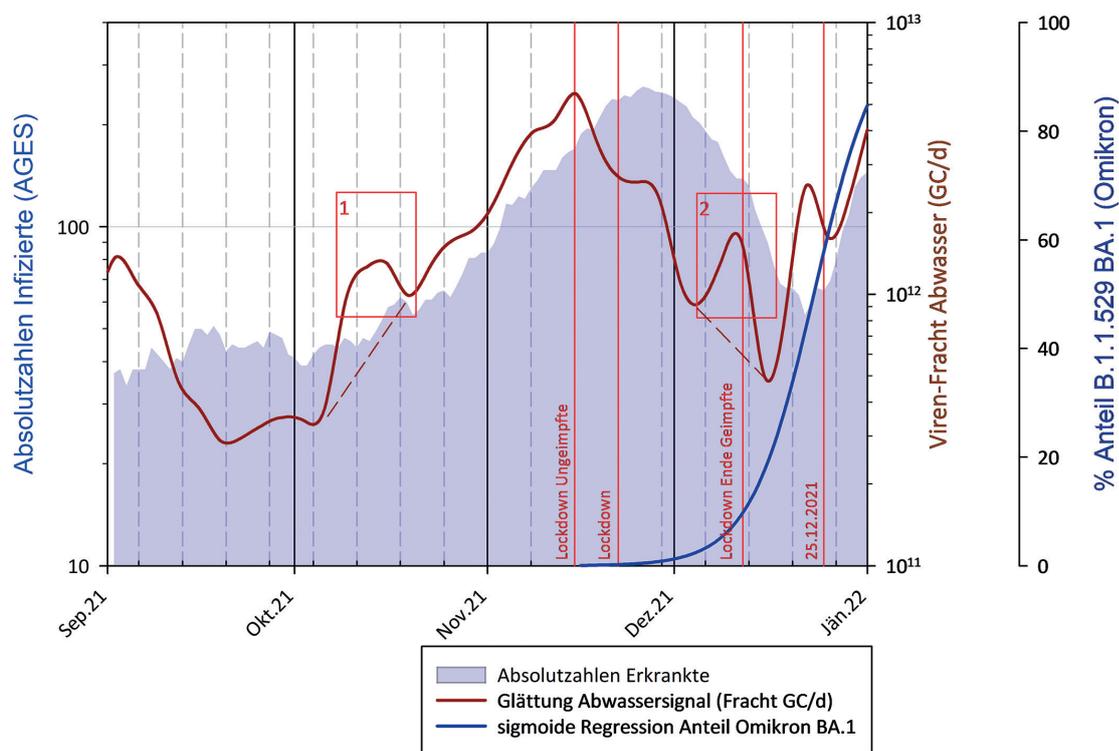


Abb. 26 Beispiel des (geglätteten) longitudinalen Verlaufs des quantitativen SARS-CoV-2-Signals im Zulauf einer typischen österreichischen Kläranlage sowie dem prozentuellen Anteil der Omikron-Variante (Linie B.1.1.529, Sublinie BA.1) am Gesamtsignal und der Anzahl der infizierten Personen im Einzugsgebiet der Kläranlage. Sowohl die von den RT-qPCR-Messungen abgeleiteten Viren-Frachten im Abwasser (Genkopien/Tag; engl.: gene copies/day, GC/d) als auch der mittels dPCR bestimmte Anteil der Omikron-Variante basiert auf je drei Messwerten pro Woche. 100 % – % Omikron = % Delta (Linie B.1.617.2).

10.4 Schlussfolgerungen

- Die Überwachung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten im Abwasser kann ergänzend zu klinischen Testungen einen entscheidenden Beitrag zur Verfolgung seiner Ausbreitung in der Bevölkerung leisten und dabei helfen, einen möglichen Ausbruch regional zu erkennen, um umgehend entsprechende Maßnahmen einleiten zu können.
- Generell zeigen die Ergebnisse der abwasserbasierten Epidemiologie eine sehr gute Korrelation mit den klinischen Daten – bezogen auf die Verbreitung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten.
- Die Abwasserüberwachung erweist sich als wirksames Instrument zur Früherkennung von SARS-CoV-2 und seiner Varianten.
- Die Untersuchung des Abwassers kann Informationen zu Infektionsdynamik und zirkulierenden Varianten von SARS-CoV-2 für ein ganzes Einzugsgebiet liefern und erlaubt somit die Überwachung großer Bevölkerungszahlen (Spiegel der Gesellschaft). Dadurch stellt sie im Vergleich zur klinischen Testung von einzelnen Personen eine kostengünstige, schnelle und verlässliche Informationsquelle über die Verbreitung des Virus und seiner Varianten dar, bei der zudem alle Infizierten gleichermaßen erfasst werden, unabhängig davon ob symptomatisch, präsymptomatisch oder asymptomatisch.

10.5 Detailmethodik

Wenngleich es mehrere methodische Ansätze zur Aufkonzentrierung von Viren aus Abwasser gibt, hat sich in Österreich bei den SARS-CoV-2 Untersuchungen die Fällung mit PEG (Polyethylenglykol) durchgesetzt, die eine Zentrifugation von 50 bis 150 mL Abwasser bei $12.000 \times g$ zur Einengung des Probenmaterials involviert. Nach der Isolation des genetischen Materials aus diesem Konzentrat erfolgt die molekularbiologische Analytik. Neben der Quantifizierung von SARSCoV-2, bei der das virale Erbgut (die

RNA) mit der Technik der Reversen-Transkriptase-quantitativen-Polymerase-Ketten- (engl.: Chain) -Reaktion (RT-qPCR) gemessen wird (als Anzahl der Genkopien pro mL), werden mittels spezifischer, auf einzelne Schlüsselmutationen in VOCs (z. B. Alpha, Delta, Omikron) ausgerichtete digitale PCR-/dPCR-Ansätze rasch Hinweise und mittels Genomsequenzierung Nachweise für das Auftreten von Virusvarianten auch auf quantitativer Ebene erhalten werden (Amman et al. 2022; Radu et al. 2022).

Zur Normalisierung der RT-qPCR-Ergebnisse wird häufig der Ansatz über den Gesamtstickstoff oder auch die Berechnung der Virenfracht verwendet. Der in der Siedlungswasserwirtschaft etablierte Zahlenwert für die Ausscheidung an gesamtem Stickstoff pro Person und Tag liegt bei 11 g (= Einwohnerwert EW_{11}). Durch Messung der tatsächlichen Stickstoffmenge im Zulauf der Kläranlage und dem Vergleich mit dem Erwartungswert lässt sich die Dynamik der Ausscheider im Einzugsgebiet sowie die unterschiedliche Abwassermenge auf unterschiedlichen Kläranlagen (bis zu einem gewissen Ausmaß) rechnerisch kompensieren und dadurch auch das Virensignal normalisieren. Bei der Berechnung der Virenfrachten wird das Rohsignal im Zulauf der Kläranlagen (in Genkopien pro mL) mit der Gesamtabwassermenge am Messtag multipliziert, sodass sich ein Zahlenwert für die gesamte Anzahl an Viren ergibt, die an einem Tag der Kläranlage zugeflossen ist (= Fracht in Genkopien pro Tag). Kommt es infolge von Regenereignissen zu einer Verdünnung der Virenkonzentration im Rohsignal und damit Verminderung des Zahlenwerts, so wird im Frachtansatz jedoch durch Multiplikation der geringeren Konzentration mit einer höheren Wassermenge dieser Verdünnungseffekt rechnerisch beseitigt.

10.6 Referenzarbeiten

Amman F, Markt R, Endler L, Hupfauf S, Agerer B, Schedl A, Richter L, Zechmeister M, Bicher M, Heiler G, Triska P, Thornton M, Penz T, Senekowitsch M, Laine J, Keszei Z, Daleiden B, Steinlechner M, Niederstätter H, Scheffknecht C, Vogl G, Weichlinger G, Wagner A, Slipko K, Masseron A, Radu E, Allerberger F, Popper N, Bock C, Schmid D, Oberacher H, Kreuzinger N, Insam H, Bergthaler A (2022): National-scale surveillance of emerging SARS-CoV-2 variants in wastewater. MedRxiv 2022.01.14.21267633. <https://doi.org/10.1101/2022.01.14.21267633>.

Radu E, Masseron A, Slipko K, Amman F, Schedl A, Agerer B, Endler L, Penz T, Bock C, Bergthaler A, Vierheilig J, Hufnagl P, Korschineck I, Krampe J, Kreuzinger N (2022): Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage (Alpha variant) and its correlation with quantitative wastewater-based epidemiology data. Water Res (in revision).

11 BIOSTABILITÄT – WARUM TRETEN BEI MANCHEN TRINKWÄSSERN IM VERLAUF DER VERTEILUNG ERHÖHTE KOLONIEZAHLEN AUF?

Gerhard Lindner¹, Franziska K. Zibuschka

¹ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wasserhygiene

In einem Trinkwasserversorgungssystem treten an bestimmten Netzstellen immer wieder stark überhöhte Werte im Ausmaß von > 1.000 Kolonien pro Milliliter (KBE/ml, 22 °C) auf [155]. Nachdem ausgeschlossen werden kann, dass im gegenständlichen Fall ein Eintrag von Mikroorganismen von außen in das Leitungssystem (z. B. Reparaturmaßnahmen) vorliegt, wird das mikrobiologische Standarduntersuchungsprogramm [96, 97] auf die Ermittlung des biologischen Stabilitätszustands (Verkeimungspotenzial) des verteilten Trinkwassers ausgeweitet. Als Parameter wird der biologisch abbaubare Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs – BDOC (Biodegradable Dissolved Organic Carbon) – herangezogen. Wird ein Wert von 0,16 mg C/l im Wasser überschritten, liegt biologische Instabilität, d. h. Neigung zur Nachverkeimung [98] vor.

Während die im Rohwasser vorhandenen chemischen Inhaltsstoffe (Eisen, Mangan, Ammonium, Huminstoffe) im Zuge des Aufbereitungsprozesses auf das erforderliche Maß [96, 97] reduziert werden, gelingt es nicht, den BDOC-Wert abzusenken, wodurch es zu einer Einspeisung biologisch instabiler Trinkwassers in das Leitungsnetz kommt. Die beobachteten hohen Koloniezahlenwerte stehen damit in ursächlichem Zusammenhang.

11.1 Einleitung

Um die Mitte der 1980er-Jahre rückte das Thema Nachverkeimung in den Blickpunkt des Interesses der Wasserversorgung. Von Nachverkeimung (regrowth, aftergrowth) des Trinkwassers wird dann gesprochen, wenn es auf dem Transportweg im Leitungsnetz zu Erhöhungen der Koloniezahl (koloniebildende Einheiten pro Milliliter bei 22 °C Bebrütungstemperatur; KBE/ml, 22 °C) kommt. Die betreffenden Zunahmen können sich auf die unterschiedlichsten, darunter auch gesundheitlich relevante, Bakterienarten (Pseudomonaden, Legionellen) erstrecken und dadurch zu einer massiven Beeinträchtigung der Trinkwasserqualität führen. Bevor jedoch die Diagnose Nachverkeimung gestellt werden kann, ist abzuklären, ob nicht eine andere Ursache für die erhöhten Koloniezahlen verantwortlich ist. Infrage kommen das Eindringen von mikrobiell verwertbaren Substanzen im Zusammenhang mit Reinigungsarbeiten oder der als Rekontamination bezeichnete Eintrag von Mikroorganismen infolge von Rohrbrüchen bzw. Reparaturmaßnahmen. Eine weitere wichtige Rolle kommt dem Stabilitätszustand der im Verteilungsnetz vorhandenen Biofilme zu [99]. Weitere Einflussfaktoren sind Temperatur, Verweilzeit sowie jahreszyklische Schwankungen im Grundwasser.

Mikroorganismen sind befähigt, geringste Mengen gelöster organischer Wasserinhaltsstoffe zu verwerten. Diese werden als „primary-electron-donor-substrates“ bezeichnet und liegen zumeist unter der chemisch-analytischen Nachweisgrenze [100]. Wässer, bei denen aufgrund von Zusammensetzung und Konzentration der Wasserinhaltsstoffe Nachverkeimungen auszuschließen sind, werden als biologisch stabil bezeichnet. Wie hoch das Potenzial biologisch instabiler Wässer zur Nachverkeimung ausgeprägt ist, kann mittels unterschiedlicher Biotestverfahren (ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Teil 1: Mikrobiologie und Wasser: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse 2017) ermittelt werden.

11.2 Fragestellung

Warum kommt es bei manchen Trinkwässern im Laufe der Verteilung zu einer deutlichen Erhöhung der Koloniezahl?

11.3 Fallbeispiel

Bei der Trinkwasseraufbereitung werden mikrobiologische Abbauvorgänge gezielt genutzt. Die gleichen Prozesse spielen sich auch im Verteilungssystem ab, solange das aufbereitete Wasser noch ausreichend biologisch abbaubare Stoffe enthält. Ein deutliches Signal für Handlungsbedarf ist dann gegeben, wenn die Koloniezahlen im Verlauf der Verteilung des Trinkwassers anzusteigen beginnen, wobei Werte von weit über 1 000 KBE/ml erreicht werden können. Sprechen Dukan et al. [101] noch davon, dass erhöhte Koloniezahlen nicht gleich ein Gesundheitsrisiko bedeuten, bieten heute molekularbiologische Untersuchungsmethoden die Möglichkeit, die „black box“ Koloniezahl aufzuschlüsseln und mögliche Risiken zu erkennen [102–104].

Nachstehend ist das Ergebnis eines Untersuchungsdurchgangs exemplarisch dargestellt. Im gegenständlichen Fall handelt es sich um eine Wasserversorgungsanlage, in der die im Rohwasser in zu hohen Konzentrationen enthaltenen chemischen Inhaltsstoffe (Eisen, Mangan, Ammonium, Huminstoffe) im Zuge mehrerer Aufbereitungsschritte auf das erforderliche Maß [96, 97] reduziert werden. Wesentliche Komponenten des Verfahrens sind Ozonung, Mehrschicht- und Aktivkohlefilter sowie abschließende Desinfektion mittels Chlordioxid.

Die bakteriologischen Befunde der laufenden Kontrolluntersuchungen des aufbereiteten Wassers entsprechen stets den gesetzlichen Vorgaben. Mit zunehmender Entfernung von der Einspeisungsstelle in das Versorgungsnetz lässt sich jedoch eine deutliche Verschlechterung der Trinkwasserqualität in Form von stark erhöhten Koloniezahlen (> 1.000 KBE/ml; 22 °C) beobachten.

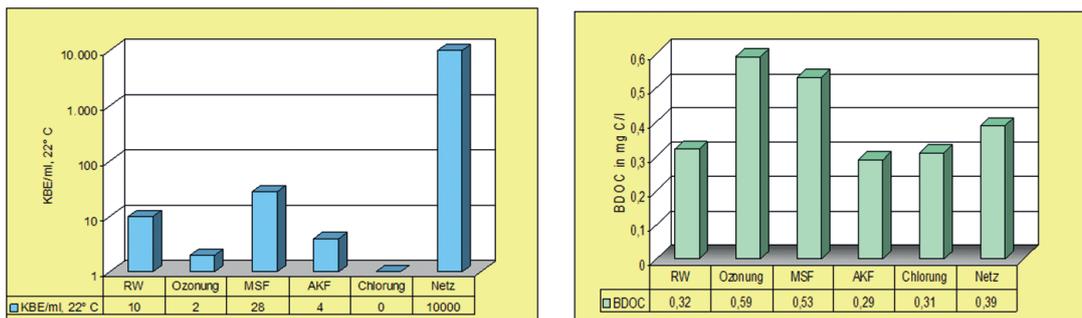


Abb. 27 Darstellung eines Untersuchungsdurchgangs, Erhebung von Koloniezahl (KBE/ml, 22 °C) und BDOC-Wert (BDOC in mg C/l). RW ... Rohwasser, Ozonung ... nach Ozonbehandlung, MSF ... Mehrschichtfilter, AKF ... Aktivkohlefilter, Chlorung ... nach Chlorbehandlung, Netz ... Netzprobe (Quelle: ÖWAV-Seminar „Mikrobiologie und Wasser. Von der kultivierungsbasierten Standardmethode bis zur Online-Messung“, 23. März 2017, Wien)

Da an der untersuchten, entfernt liegenden Netzstelle von keinem Eintrag von Mikroorganismen von Außerhalb (z. B. Reparaturmaßnahmen) auszugehen ist, kommt als Ursache für die hohe Koloniezahl nur das Vorhandensein ausreichender Mengen biologisch abbaubarer Wasserinhaltsstoffe in Frage. Die begrenzte Möglichkeit, diese Stoffe chemisch nachzuweisen, erfordert den Einsatz sogenannter Bioassays (biologische Nachweisverfahren). Während die ermittelten Koloniezahlen unmittelbar nach der Desinfektion (0 KBE/ml) und in der Nähe der Einspeisungsstelle in weniger als 10 km Entfernung (KBE-Wert im niedrigen Zehnerbereich, in der Grafik nicht dargestellt) auf eine gute Trinkwasserqualität hinweisen, zeigen die Ergebnisse der parallel dazu durchgeführten BDOC-Untersuchungen, dass es nicht gelungen ist, das Ausmaß des im Rohwasser vorhandenen Nachverkeimungspotenzials durch den Aufbereitungsprozess zu verringern. Die bei den bakteriologischen Kontrolluntersuchungen innerhalb des Leitungsnetzes auftretenden hohen Koloniezahlen mit Werten von > 1.000 KBE/ml (22 °C) sind dadurch erklärbar.

Durch die Wirkungsweise des Ozons (Aufspaltung größerer organischer Moleküle durch Oxidation) werden die im Rohwasser vorhandenen bioverfügbaren Wasserinhaltsstoffe erhöht. Der BDOC-Wert liegt nach der Ozonstufe bei $0,59$ mg C/l. Mittels der nachgeschalteten Filter gelingt es nicht, deren Konzentration zielführend zu reduzieren. Daraus ergibt sich, dass der im Rohwasser vorhandene Zustand der

biologischen Instabilität – der BDOC-Wert liegt bei 0,32 mg C/l – trotz mehrerer Aufbereitungsschritte nicht beseitigt wird. An der Einspeisungsstelle in das Trinkwasserleitungsnetz wird ein BDOC-Wert von 0,31 mg C/l gemessen. Der Wert für biologische Stabilität des Parameters BDOC liegt bei 0,16 mg C/l [98, 105].

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass der im Verlauf der Aufbereitung vorhandene Ozonschritt im gegenständlichen Fall (Vorhandensein von Huminstoffen, Ammonium, Eisen, Mangan im Rohwasser) eine sinnvolle Maßnahme ist. In Hinblick auf die angestrebte Stabilisierung der bakteriologischen Trinkwasserqualität, d. h. keine überhöhten Koloniezahlwerte innerhalb des Verteilungsnetzes, kann eine Verbesserung nur durch eine Optimierung sämtlicher, der Ozonstufe nachgeschalteter Filter und der Primärdesinfektion erreicht werden. Eine Überprüfung der Zielerreichung setzt zusätzlich zu den gängigen mikrobiologischen Standarduntersuchungen eine Erweiterung des methodischen Spektrums auf sogenannte „Nachverkeimungsparameter“ voraus.

11.4 Schlussfolgerungen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bereitstellung einwandfreien Trinkwassers ist die Sicherung von mikrobiologisch stabilen Verhältnissen im Verlauf der Verteilung und Lagerung. Dazu zählen neben einer regelmäßigen Netz- und Behälterpflege, der Einhaltung eines hohen Hygienestandards bei der Durchführung von Bau- und Reparaturmaßnahmen, dem ausschließlichen Einsatz von Materialien, die nicht biologisch abbaubar sind bzw. keine organischen Nährstoffe an das Wasser abgeben, vor allem die Einspeisung von Wasser mit möglichst geringem Nachverkeimungspotenzial. Für jene Wässer, bei denen im Verlauf der Verteilung keine überhöhten Koloniezahlen (KBE/ml, 22 ° C) auftreten, wurde der operationale Begriff „biologisch stabil“ geprägt. Kenntnis über das Ausmaß der Biostabilität des zu verteilenden Wassers zu haben ist die Grundlage für ein zielgerichtetes Vorgehen im Zusammenhang mit der Gewinnung, der Aufbereitung und der Verteilung von Trinkwasser. Für die Ermittlung des Nachverkeimungspotenzials steht eine Reihe von Biotestverfahren (ÖWAV-Arbeitsbehelf 52, Mikrobiologie und Wasser, Teil 1: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse, 2017; [104]) zur Verfügung.

11.5 Methodenübersicht

- Bestimmung des assimilierbaren organischen Kohlenstoffs (AOC) nach Van der Kooij [106, 107].
- Bestimmung des assimilierbaren organischen Kohlenstoffs (AOC) mittels Durchflussszytometrie nach Hammes und Egli [108].
- Bestimmung des biologisch abbaubaren Anteils des gelösten organischen Kohlenstoffs (BDOC) nach Servais et al. [105, 109], Joret et al. [110], Allgeier et al. [111].
- Bestimmung des Bakterienvermehrungspotenzials (BVP) nach Werner und Hamsch [112–114].
- Bestimmung des Wachstumspotenzials der koloniebildenden Bakterien (WP) nach Wricke et al. [115].
- Bestimmung des Vermehrungspotenzials (VP) nach Lindner et al. [116, 117].
- Bestimmung des bakteriellen Wachstumspotenzials mittels Durchflussszytometrie nach Farhat et al. [118], Hammes et al. [134], Prest et al. [119].

11.6 Referenzarbeiten

Zibuschka F, Lindner G (2006): Studie über den Qualitätszustand der Trinkwassergüte in den Leitungsnetzen, Studie A und Studie B, Auftraggeber: NÖ Wasserwirtschaftsfonds, mit der Durchführung beauftragt durch das Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Gruppe Wasser, Abteilung Siedlungswasserwirtschaft.

12 QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER EFFIZIENZ VON DESINFEKTIONSVERFAHREN AM BEISPIEL DER UV-BESTRAHLUNG VON TRINKWASSER

Regina Sommer¹, Georg Hirschmann¹, Gerhard Lindner¹, Michael Reiter¹, Elisabeth Holzhammer¹, Sonja Knetsch¹, Andrea Lettl¹, Angelika Schmidhuber¹, Alois Schmalwieser²

¹ Medizinische Universität Wien, Institut für Hygiene und Angewandte Immunologie – Wasserhygiene

² Veterinärmedizinische Universität Wien, Abteilung für Molekulare Physiologie und Biophysik

12.1 Einleitung

Die Desinfektion von Trinkwasser stellt neben dem Schutz von Trinkwasserressourcen vor dem Eintrag von Krankheitserregern die wichtigste Maßnahme zum Infektionsschutz dar. Unter Trinkwasserdesinfektion im Sinne des Österreichischen Lebensmittelbuches (ÖLMB) Kapitel B1 „Trinkwasser“ [96] versteht man die irreversible Inaktivierung von Krankheitserregern, die durch orale Aufnahme oder Verwendung des damit verunreinigten Wassers Infektionen beim Menschen verursachen können. Die Desinfektionsverfahren und -bedingungen müssen so gewählt werden, dass eine Reduktion dieser Krankheitserreger von zumindest 4 Log-Stufen (Faktor 10.000 oder 99,99 %) erreicht wird. Der Schwerpunkt der Trinkwasserdesinfektion liegt auf Krankheitserregern mit fäkal-oralem Infektionsmodus. Die im ÖLMB Kapitel B1 angeführten, verfahrensspezifischen Desinfektionsbedingungen gelten für Wasser, das chemisch und physikalisch den Anforderungen an Trinkwasser der TWV und dem ÖLMB entspricht. Die Rückhaltung und Reduzierung durch mechanische Abtrennung von Krankheitserregern stellt keine Desinfektion dar, da keine Inaktivierung erfolgt.

Der mikrobizide Verfahrensschritt, der notwendig ist, um in mikrobiologischer Hinsicht die Eignung eines Wassers als Trinkwasser zu erreichen, wird primäre Desinfektion genannt. Hierfür sind gemäß ÖLMB Kapitel B 1 die Verfahren der Chlorung, die Ozonung und die UV-Bestrahlung vorgesehen.

Die Kontrolle der einwandfreien Funktionsweise von Trinkwasserdesinfektionsanlagen ist durch eine direkte mikrobiologische Untersuchung nicht möglich. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Indikatorbakterien *Escherichia coli*, Enterokokken oder *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Desinfektionsverfahren ist die Abwesenheit dieser Bakterien in einer nach einer Desinfektionsmaßnahme entnommenen Probe (Volumen z. B. 250 ml) kein geeignetes Kriterium. Für einen wirksamen Infektionsschutz sind Desinfektionsbedingungen erforderlich, die eine ausreichende Inaktivierung von Krankheitserregern, wie z. B. von humanpathogenen Viren oder Dauerformen von Protozoen gewährleisten. Eine alleinige Reduktion von fäkalen Standard-Indikatorbakterien allein bietet keine Sicherheit.

Die in Österreich am häufigsten angewendete Methode zur Trinkwasserdesinfektion ist die UV-Bestrahlung mit Strahlung einer Wellenlänge von 254 nm. Sie wird bereits seit den 1960er-Jahren in öffentlichen Wasserversorgungsanlagen eingesetzt, wobei jedoch Möglichkeiten zur Prüfung der Wirksamkeit und Überwachung der UV-Bestrahlung fehlten. Weiters war keine Vorgangsweise zur objektiven Vergleichbarkeit der Desinfektionsleistung von UV-Geräten vorhanden.

Umfangreiche Untersuchungen von UV-Geräten mit der in der ÖNORM M 5873-1 [120] implementierten Methode der Biodosimetrie haben gezeigt, dass die von den Herstellern berechneten Fluenzen meist nicht korrekt waren. Vielfach stellte sich bei der biodosimetrischen Prüfung heraus, dass die tatsächlichen Leistungen wesentlich geringer als die angenommenen waren und die für eine zuverlässige Trinkwasserdesinfektion erforderliche Fluenz von 400 J/m² nicht erreicht wurde. Für die Überwachung der UV-Desinfektion wurden daher in der Trinkwasserverordnung die bei der biodosimetrischen Prüfung ermittelten technisch-physikalischen Parameter Durchfluss (m³/h), Bestrahlungsstärke (W/m²) und UV-Transmission implementiert [97].

12.2 Fragestellung

- Wie kann die mikrobizide Leistung eines bestimmten Typs eines UV-Geräts gemessen werden?
- Worauf beruht die Biosimetrie und wie misst man die Reduktionsäquivalente Fluenz, REF (J/m^2)?
- Welchen Einfluss haben die UV-Transmission (%) und der Durchfluss des Wassers (m^3/h) sowie die Bestrahlungsstärke (W/m^2) auf die REF?
- Welche Betriebsbedingungen müssen eingehalten werden, um eine Reduktionsäquivalente Fluenz von zumindest $400 J/m^2$ zu gewährleisten, wie sie für die Trinkwasserdesinfektion gemäß ÖLMB Kapitel B1 [96] erforderlich ist?

12.3 Methodenbeschreibung

12.3.1 Messprinzip der Biosimetrie bei der UV-Bestrahlung von Wasser

Das Biosimeter stellt die Basis und den Bezugspunkt für die Biosimetrie dar. Darunter versteht man einen Mikroorganismus, dessen UV-Inaktivierung unter strikt kontrollierten Messbedingungen in einer Laborbestrahlungsanlage bestimmt wird [121–123]. Es hat sich gezeigt, dass die technische Ausführung der Laborbestrahlungsanlage und die Durchführung der Messung einen wesentlichen Einfluss haben und zu falschen Ergebnissen führen können. Dies wurde in einem internationalen Ringversuch anhand von drei Laboratorien gezeigt (Sommer et al. 1995). Es war erforderlich, einen als Biosimeter geeigneten Mikroorganismus auszuwählen und eine Methode zu dessen Herstellung zu entwickeln (Sommer 1991). Weiters musste abgesichert werden, dass der Inaktivierungseffekt bei der jeweiligen Fluenz von der Bestrahlungszeit unabhängig ist (Sommer et al. 1998).

In Abb. 28 ist eine Laborbestrahlungsanlage mit der Messeinrichtung zur Bestimmung der Fluenz zu sehen. Die dargestellte Kalibrierkurve zeigt die UV-Inaktivierung des Biosimeters (Sporen von *Bacillus subtilis*). Diese Daten bilden die Kalibrierkurve, die zur Umrechnung der bei der UV-Bestrahlung erzielten log-Reduktionen des Biosimeters unter Verwendung der Kurvenparameter k und d dient (Tab. 3). Die mit dieser Methode berechnete Raumbestrahlung wurde als Reduktionsäquivalente Fluenz, REF (J/m^2) etabliert (Cabaj et al. 1996).

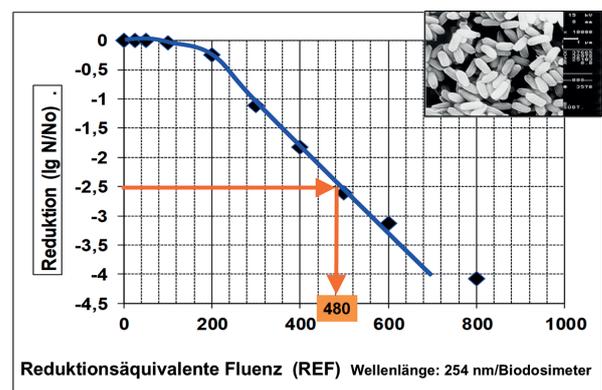
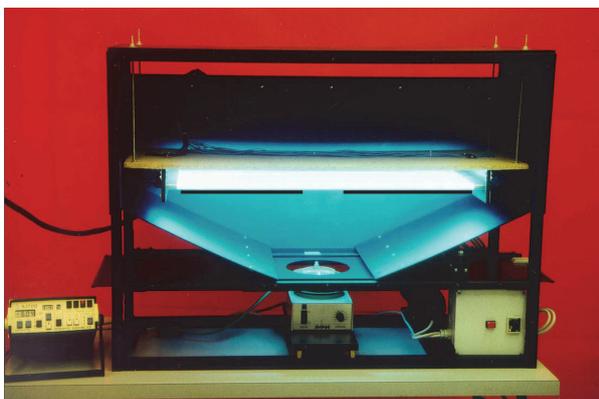


Abb. 28 Laborbestrahlungsanlage zur Kalibrierung des Biosimeters. Die Kalibrierkurve mit den Parametern k und d (siehe Tab. 3) wird für die Berechnung der Reduktionsäquivalenten Fluenz, REF (J/m^2) eingesetzt (Sommer et al. 2008)

Für die UV-Inaktivierungseigenschaften des Biosimeters wurden Kriterien festgelegt, die gewährleisten, dass bei der Prüfung von UV-Geräten vergleichbare biosimetrische Ergebnisse erzielt werden. Diese sind in Tab. 3 dargestellt [124].

Tab. 3 Kriterien für die UV-Empfindlichkeit der als Biodosimeter eingesetzten Sporen von *B. subtilis* [124]

Parameter	Zulässiger Bereich
k (Steigung der Regressionsgerade), m ² /J	-0,010 bis 0,0052
d (Abstand des Schnittpunkts der Geraden mit der Ordinate vom Ursprung in dekadischer Darstellung), dimensionslos	0,35 bis 1,05
r ² (Bestimmtheitsmaß)	≥ 0,98
Reduktion (log(N/No)) bei 400 J/m ²	-1,5 bis - 2,5

Sporen von *Bacillus subtilis* haben sich im Vergleich zu anderen Biodosimetern, wie z. B. dem Bakteriophagen MS2, als besonders gut geeignet und robust erwiesen. Der Standard-Messbereich für diese Anwendung liegt im Bereich einer REF von 200 und 700 J/m² (Mamane-Gravetz et al. 2005; Sommer and Cabaj 1993; Sommer et al. 2004, 2008).

Für die biodosimetrische Prüfung, die im Vollmaßstab durchgeführt wird, ist das UV-Gerät an einem Prüfstand zu installieren, der über die notwendigen technischen Messeinrichtungen für Durchfluss, Druck, Leistungsaufnahme, Transmissionsmessung des Wassers verfügt [124]. Die biodosimetrische Messung erfolgt bei Prüfpunkten, die durch Durchfluss, UV-Transmission des Wassers und Bestrahlungsstärke definiert sind. Sobald konstante Betriebsbedingungen herrschen, werden die als Biodosimeter verwendeten Bakteriensporen mengenproportional in die Zulaufleitung des zu prüfenden UV-Gerätes zudosiert, sodass im Testwasser eine Ausgangskonzentration von 1×10⁶ bis 1×10⁷ Sporen/Liter erreicht wird. Statistische Mischer sorgen für eine homogene Verteilung. Pro Prüfpunkt erfolgen je 5 Probenentnahmen, jeweils an den Probenahmestellen „vor UVGerät“ und „nach UV-Gerät“, die im 3-fach-Ansatz analysiert werden (Plattengussverfahren mit Hefeextrakt-Agar nach ISO 6222 [125], Inkubation 36 ± 2 °C, 44 ± 4 h). Man erhält auf diese Weise für jeden Prüfpunkt jeweils 15 Messergebnisse für die log-Konzentration vor (No) und nach UV-Bestrahlung (N). Die Standardabweichung der jeweiligen 5 Parallelproben darf dabei ±0,2 log nicht überschreiten, da sonst von nicht konstanten Prüfbedingungen (Hydraulik, Zudosierung, Mischung) ausgegangen werden muss. Durch die Berechnung von log N – log No erhält man die Reduktion für den Prüfpunkt. Die Berechnung der REF aus der Reduktion erfolgt mit der Formel in Abb. 29.

$$REF = -\frac{1}{k} \cdot \lg \left[1 - \left(1 - 10^{\lg \frac{N}{N_0}} \right)^{10^{-d}} \right]$$

Abb. 29 Formel zur Berechnung der Reduktionsäquivalenten Fluenz, REF (J/m²) unter Verwendung der Kurvenparameter k und d (siehe auch Tab. 1) (Sommer et al. 2008)

Im Zuge der biodosimetrischen Prüfung ist einmalig für das UV-Gerät eine Systemkontrolle durchzuführen. Diese dient zur Qualitätskontrolle, um abzusichern, dass sich die Konzentration des Biodosimeters im bzw. durch den Prüfaufbau nicht verändert. Hierfür ist im Anschluss an die Testung eines Prüfpunktes nach Abschalten der UV-Lampe(n) und nach einem Durchfluss von mindestens dem 5-fachen Volumen der Bestrahlungskammer eine Probe an der Probenahmestelle „nach UV-Gerät“ zu entnehmen. Der Durchfluss des Wassers und die Zudosierung des Biodosimeters bleiben unverändert, und die Konzentration des Biodosimeters ist im 3-fach-Ansatz zu bestimmen. Der Mittelwert der Konzentration der Proben „nach UV-Gerät“ darf um nicht mehr als 0,2 log von der Konzentration der Probe „vor UV-Gerät“ abweichen.

Das beschriebene Verfahren hat sich als so zuverlässig erwiesen, dass es in nationale und internationale Standards zur Prüfung von UV-Geräten aufgenommen wurde [124, 126–128].

12.4 Darstellung

12.4.1 Anwendung der Biodosimetrie in der Praxis der Trinkwasseraufbereitung

Zur Festlegung der erforderlichen REF bei der Trinkwasserdesinfektion werden zahlreiche Daten über die UV-Empfindlichkeit der relevanten Krankheitserreger benötigt. Hierfür sind Inaktivierungsstudien von Krankheitserregern unter strikt kontrollierten Bestrahlungsbedingungen erforderlich, wie sie für die in Abb. 28 dargestellte Laborbestrahlungsanlage gegeben sind. In den letzten Jahrzehnten wurden viele dieser grundlegenden Daten vor allem auch für virale Krankheitserreger erarbeitet, wie z. B. für Poliovirus, Rotavirus, Parvovirus, Caliciviren (Noroviren), Hepatitis-E-Viren (Sommer et al. 1989; De Roda Husman et al 2004; Calgua et al. 2014; Guerrero-Latorre et al. 2016).

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen ergibt sich, dass zur Inaktivierung der relevanten viralen Krankheitserreger um zumindest 4 Log-Stufen eine REF von 400 J/m^2 erforderlich ist. Bei bakteriellen Krankheitserregern ist zu beachten, dass Reparaturmechanismen, wie die Photoreaktivierung, zu einer Wiedererlangung der Vermehrungsfähigkeit und der Infektiosität führen können. In umfassenden Untersuchungen konnte anhand pathogener *E.-coli*-Stämme belegt werden, dass eine UV-Fluenz von 400 J/m^2 ausreicht, um auch diese Reparaturvorgänge zu unterbinden (Sommer et al. 2000). Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde im ÖLMB Kapitel B1 „Trinkwasser“ für die Trinkwasserdesinfektion durch UV-Bestrahlung eine REF von zumindest 400 J/m^2 festgelegt [96], um eine ausreichende Inaktivierung von Viren zu erreichen und eine Photoreaktivierung von Bakterien zu verhindern.

Die Überwachung der REF von 400 J/m^2 im laufenden Betrieb erfolgt über die im Rahmen der biodosimetrischen Prüfung ermittelten technischen Betriebsparameter, diese sind:

- Bestrahlungsstärke (W/m^2), Ablesung an der Anzeige des Geräteradiometers (Sensor),
- Wasserdurchfluss (m^3/h),
- UV-Transmission des Wassers (254 nm; 100 mm Schichtdicke).

Hersteller von UV-Geräten, deren UV-Geräte über eine biodosimetrische Prüfung gemäß ÖNORM M 5873 [124] verfügen, können eine ÖVGW-Zertifizierung beantragen. Hierbei werden die Betriebsbedingungen in der ÖVGW-Qualitätsmarke als für jedes UV-Gerät individuelle Betriebstabelle ausgewiesen. Die Funktionskontrolle des UV-Geräts im praktischen Betrieb erfolgt durch Vergleich der Werte in der ÖVGW-Qualitätsmarke mit den vor Ort auftretenden Bedingungen. Diese Vorgangsweise ist im Österreichischen Lebensmittelbuch, Kapitel B1 „Trinkwasser“ als Voraussetzung für den Einsatz bei der Trinkwasserdesinfektion festgelegt [96]. Ein Beispiel für eine Betriebstabelle ist in Tab. 4 ersichtlich.

Tab. 4 Beispiel für eine Betriebstabelle eines UV-Desinfektionsgeräts für Trinkwasser auf Basis der biodosimetrischen Prüfung gemäß ÖNORM M 5873-1 [124]

UV-Transmission %T ₁₀₀ (254 nm; 100 mm) %	Minimale Bestrahlungsstärke E _{min} (Schaltpunkt) (= Ablesung Sensor) W/m ²	Maximaler Durchfluss Q _{max} m ³ /h
10	25,4	15
20	45,9	28
60	66,2	39
80	90,5	51

12.4.2 Biosimetrische Untersuchung eines UV-Geräts ohne Prüfung gemäß ÖNORM M 5873 [124]

Im Folgenden soll anhand eines Beispiels die Gefahr gezeigt werden, wenn eine UV-Gerät-Type keiner biosimetrischen Prüfung unterzogen wurde. Es handelte sich um ein UV-Gerät, das im Jahr 1994 in einem Wasserwerk installiert worden war. Da die Inbetriebnahme vor dem Inkrafttreten der ersten Ausgabe der ÖNORM M 5873-1:1996 stattgefunden hatte, war das UV-Gerät nicht biosimetrisch geprüft und verfügte infolge auch nicht über eine ÖVGW-Qualitätsmarke. Es stellte sich daher die Frage, ob das UV-Gerät eine ausreichende mikrobizide Leistung aufweist. Um dies zu klären, wurde beschlossen eine biosimetrische Prüfung durchzuführen.

Das UV-Gerät wurde im Wasserwerk gemäß den Angaben des Herstellers betrieben, der für die in Tab. 2 angeführten Betriebsbedingungen A1, A2 und A3 (Durchfluss und Transmission des Wassers) eine berechnete Fluenz von zumindest 400 J/m² garantierte. Das UV-Gerät wurde ausgebaut und am Prüfstand des Wasser-Technikums der Medizinischen Universität Wien (www.uvteam-Austria.at) in gleicher Weise wie im Wasserwerk installiert. Danach wurde eine biosimetrische Untersuchung mit Sporen von *B. subtilis* gemäß ÖNORM M 5873-1:2001 [120] durchgeführt. Zusätzlich wurden dem Testwasser mengenproportional Enterokokken zugesetzt (Ausgangskonzentration 1,0×10⁶/l), um die unter diesen Betriebsbedingungen erreichbaren Reduktionen zu bestimmen. Das Ergebnis ist in Tab. 5 dargestellt. Bei keiner der drei Betriebsbedingungen wurde eine REF von 400 J/m² erreicht, sie betrug lediglich 114, 160 und 99 J/m². Enterokokken hingegen als sehr UV-empfindliche Bakterien wurden in einem Ausmaß von > 6 Log-Stufen inaktiviert, sie konnten in einem Probevolumen von jeweils einem Liter nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis belegt eindrucksvoll, dass die für die Trinkwasserüberwachung eingesetzten Fäkalindikatoren viel zu empfindlich sind, um anzuzeigen, dass die für die Trinkwasserdesinfektion erforderliche REF von 400 J/m² nicht erreicht ist.

Tab. 5 Ergebnis der biosimetrischen Messung eines UV-Geräts (Baujahr 1994) mittels Sporen von *B. subtilis* als Biosimeter zur Bestimmung der REF (J/m²). Parallel zur Biosimetrie wurden dem Testwasser Enterokokken zugesetzt (Konzentration 1,0×10⁶/l)

Prüfpunkt	Durchfluss [m ³ /h]	Transmission des Wassers [%] 100 mm; 254 nm	Biosimeter Konz vor UV log (KBE/l) No	Biosimeter Konz nach UV log (KBE/l) N	Biosimeter Reduktion log [N/No]	Mittelwert REF [J/m ²]	Enterokokken log Reduktion
Systemkontrolle vor dem Test	12,45	86	< 1	< 1	–	–	
A1	58,48	86	7,09 ± 0,01	6,77 ± 0,03	–0,32	114	> 6
A2	43,16	87	7,15 ± 0,04	6,58 ± 0,07	–0,57	160	> 6
A3	43,12	45	7,14 ± 0,04	6,90 ± 0,03	–0,24	99	> 6
Ende ohne UV (Systemkontrolle)	43,12	44	–	6,96			

12.5 Schlussfolgerungen

- Eine zuverlässige Überwachung der Trinkwasserdesinfektion ist durch die alleinige Untersuchung der bei der Trinkwasseruntersuchung vorgesehenen mikrobiologischen Parameter nicht möglich. Die Indikatorbakterien, *E. coli*, Enterokokken oder *Pseudomonas aeruginosa*, sind zu empfindlich, um das Verhalten von Krankheitserregern, insbesondere von pathogenen Viren, widerzuspiegeln.
- Die biosimetrische Untersuchung hat sich als zuverlässige und sehr gut geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung der mikrobiziden Leistungsfähigkeit von UV-Geräten erwiesen. Das Ergebnis wird als Reduktionsäquivalente Fluenz, REF (J/m²) dargestellt.

- Für die Desinfektion von Trinkwasser ist im ÖLMB Kapitel B1 die irreversible Inaktivierung von Krankheitserregern um 4 Log-Stufen festgelegt [96]. Bei der UV-Bestrahlung wird dies durch eine REF von 400 J/m² erreicht. Bei dieser REF werden die wichtigsten bakteriellen, viralen und parasitären Krankheitserreger um zumindest 4 Log-Stufen inaktiviert und es wird verhindert, dass eine Photoreaktivierung von pathogenen Bakterien erfolgt.
- UV-Geräte, bei denen die UV-Fluenz lediglich auf einer Berechnung und nicht auf der Biodosimetrie gemäß ÖNORM M 5873/DIN 19294 [124] beruht, können nicht als sicher eingestuft werden.
- Durch das standardisierte Messverfahren der Biodosimetrie können unterschiedlichste Typen und Fabrikate von UV-Geräten zur Wasserdesinfektion objektiv miteinander verglichen werden.
- Das Konzept der Biodosimetrie wurde in nationalen und internationalen Standards implementiert (z. B. Österreich, Deutschland, Schweiz, Frankreich, UK, Norwegen). Im Jahr 2020 wurden die überarbeitete ÖNORM M 5873-1:2020 und die neu erstellte DIN 19294-1:2020 als idente Normen veröffentlicht [124].

12.6 Referenzarbeiten

Cabaj A, Sommer R, Schoenen D (1996): Biodosimetry. Model calculations for UV water disinfection devices with regard to dose distributions. *Water Res* 30:1003-1009.

Calgua B, Carratalà A, Guerrero-Latorre L, de Abreu Corrêa A, Kohn T, Sommer R, Girones R. (2014): UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCRBased Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity. *Food Environ Virol* 6:260-268.

De Roda Husman AM, Bijkerk P, Lodder W, Van Den Berg H, Pribil W, Cabaj A, Gehringer P, Sommer R, Duizer E (2004): Calicivirus Inactivation by Nonionizing (253.7-Nanometer-Wavelength [UV]) and Ionizing (Gamma) Radiation. *Appl Environ Microbiol* 70:5089-5093.

Guerrero-Latorre L, Gonzales-Gustavson E, Hundesa A, Sommer R, Girones R (2016): UV Disinfection and Flocculation-Chlorination Sachets to Reduce Hepatitis E Virus in Drinking Water. *Int J Hyg Environ Health* 219:405-411.

Mamane-Gravetz H, Linden KG, Cabaj A, Sommer R (2005): Spectral Sensitivity of *Bacillus Subtilis* Spores and MS2 Coliphage for Validation Testing of Ultraviolet Reactors for Water Disinfection. *Environ Sci Technol* 39:7845-7852.

Sommer R, Weber G, Cabaj A, Wekerle J, Keck G, Schaubberger G (1989): UV-Inactivation of Microorganisms in Water. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 189:214-224.

Sommer R (1991): Untersuchungen zur Trinkwasserdesinfektion durch UV-Strahlung. Dissertation. Universität für Bodenkultur, Wien, 64-65.

Sommer R, Cabaj A (1993): Evaluation of the efficiency of a UV plant for drinking water disinfection. *Water Sci Technol* 27:357-362.

Sommer R, Cabaj A, Schoenen D, Gebel J, Kolch A, Havelaar AH, Schets FM (1995): Comparison of three laboratory devices for UV-inactivation of microorganisms. *Water Sci Technol* 31:147- 156.

Sommer R, Haider T, Cabaj A, Pribil W, Lhotsky M (1998): Time dose reciprocity in UV disinfection of water. *Water Sci Technol* 38:145-150.

Sommer R, Lhotsky M, Haider Th, and Cabaj A (2000): UV Inactivation, Liquid-Holding Recovery, and Photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Water. *J Food Prot* 63:1015-1020.

Sommer R, Cabaj A, Haider Th, Hirschmann G (2004): UV Drinking Water Disinfection – Requirements, Testing and Surveillance: Exemplified by the Austrian National Standards M 5873-1 and M 5873-2. IUVA News 6:27-35.

Sommer R, Cabaj A, Hirschmann G, Haider T (2008): Disinfection of drinking water by UV irradiation: Basic principles – Specific requirements – International implementations. Ozone: Sci Engin 30:43-48.

13 ANWENDUNG DER ONLINE-DURCHFLUSSZYTOMETRIE FÜR DAS GRUNDWASSERMONITORING AM BEISPIEL EINES KARSTQUELLEINZUGSGEBIETS

Philipp Proksch¹, Christoph Schönher¹, Benedikt Schmid¹, David J. Kerschbaumer¹, Canan Keskinöz¹, Ernest Mayr¹, Marija Zunabovic-Pichler¹, Reinhard Perfler¹

¹ *Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Siedlungswasserbau, Industrierewasserwirtschaft und Gewässerschutz*

Die Durchflusszytometrie konnte in den letzten beiden Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung als mikrobiologische Untersuchungsmethode in der Wasserversorgung gewinnen. Diese Methode ermöglicht durch den Einsatz von unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen eine rasche und kultivierungsunabhängige Bestimmung von bakteriellen Zellzahlen. Seit einigen Jahren sind auch Online-Systeme verfügbar, die selbständig Proben ziehen und analysieren können. Ein solches Online-Durchflusszytometer wurde für das Monitoring in einem hochdynamischen Karsteinzugsquellgebiet eingerichtet und mit täglichen Untersuchungen im Labor verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die hohe zeitliche Auflösung des Online-Systems eine sehr detaillierte Erfassung der mikrobiellen Dynamik in diesem Einzugsgebiet erlaubt, und relevante mikrobiologische Ereignisse aufzeichnen kann, die durch tägliche Probenahmen verborgen geblieben sind. Die Einrichtung eines solchen Systems bedarf der Beachtung vielfältiger Faktoren wie z. B. der Wahl eines geeigneten Farbstoffs, oder der Frage nach fachgerechter Betreuung eines solchen Systems. Da die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen zwischen verschiedenen Ressourcenarten, aber auch bei Ressourcen derselben Art, oftmals stark voneinander abweichen, ist es schwierig, allgemein gültige Richtwerte zu definieren. Daher ist es notwendig, eine für jede Probenahmestelle individuelle Charakterisierung der durchflusszytometrischen Kennwerte wie z. B. Zellzahlen und Anteil sogenannter HNA-/LNA-Zellen durchzuführen. In weiterer Folge können daraus spezifische Schwellenwerte definiert werden, die den jeweiligen Gegebenheiten der Untersuchungsstelle Rechnung tragen.

13.1 Einleitung

Die Durchflusszytometrie ist seit vielen Jahrzehnten im wissenschaftlichen und klinischen Bereich für die Zählung und Untersuchung von Zellen aus z. B. Blutproben etabliert [129, 130]. Seit den späten 80er-Jahren wird die Durchflusszytometrie auch erfolgreich für die Zählung bakterieller Zellen in Wasserproben genutzt [131, 132]. Die ersten Untersuchungen für die Anwendung im Bereich der Wasserversorgung wurden im deutschsprachigen Raum unter der Leitung von Thomas Egli bzw. Frederik Hammes an der EAWAG durchgeführt [133, 134]. In Österreich wurden von 2015 bis 2017 im Auftrag des BMLRT einerseits die Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie für die Wasserversorgung untersucht, und andererseits eine durchflusszytometrische Charakterisierung österreichischer Wasserressourcen durchgeführt (Zunabovic-Pichler et al. 2018). Das Messprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung der zu untersuchenden Probe. Die Probe wird durch eine Hüllströmung in einen sehr dünnen Flüssigkeitsfaden fokussiert, welcher es erlaubt, dass einzelne Zellen nur mehr hintereinander aufgereiht durch die Detektionseinheit fließen können. Die Detektion erfolgt mittels eines Laserstrahls und der Auswertung des durch vorbeiströmende Zellen erzeugten Streulichts [135]. Durch das Anbringen optischer Filter ist es möglich, nur das Licht bestimmter Wellenlängen zu erfassen, was in Kombination mit passenden Lasern die Verwendung sehr spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht. Solche Farbstoffe zeichnen sich stets durch eine bestimmte Wellenlänge zur optischen Anregung, und eine Wellenlänge zur Detektion des emittierten Lichts aus [136].

Durch Anwendung unterschiedlicher Farbstoffe können vielfältige Eigenschaften der detektierten Zellen, wie z. B. die enzymatische Aktivität oder die Intaktheit der Zellmembran bestimmt werden [133, 137]. Eine häufige Farbstoffkombination zur Ermittlung von Gesamtzellzahlen (d. h. alle vorhandenen zellulären Einheiten) und Zellzahlen mit intakter Zellmembran ist die Verwendung von SYBR-Green-1 und Propidiumiodid [133]. Beide Farbstoffe erzeugen erst durch das Binden an DNA-Moleküle eine starke Fluoreszenz, während Propidiumiodid im Gegensatz zu SYBR-Green-1 intakte Zellmembranen nicht

durchdringen kann, und dadurch eine Differenzierung zwischen intakten und nicht-intakten Zellen erlaubt [133]. Da eine intakte Zellmembran als unabdingbar für lebendige Zellen gilt, wird diese oft einem Nachweis der Lebendigkeit gleichgesetzt. Das ist für viele Probentypen eine gute Annäherung, unter bestimmten Umständen – wie z. B. nach Einwirkung von UV-Strahlung – ist das jedoch nicht der Fall.

Bei dem Einsatz dieser Farbstoffe hat sich wiederum gezeigt, dass sich in Wasserproben oftmals zwei abgegrenzte Cluster im Streudiagramm der Fluoreszenzintensitäten bilden (Abb. 30). Diese Cluster wurden weitergehend untersucht und als HNA- (high nucleic acid content – hoher Anteil an Nukleinsäuren wie DNA und RNA) und LNA-Zellen (low nucleic acid content – niedriger Anteil an Nukleinsäuren) charakterisiert [138]. Diese beiden Gruppen scheinen sich in ihrer zellulären Aktivität [139], aber auch in ihrer Größe [140] und zum Teil in ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten bakteriellen Arten zu unterscheiden [141].

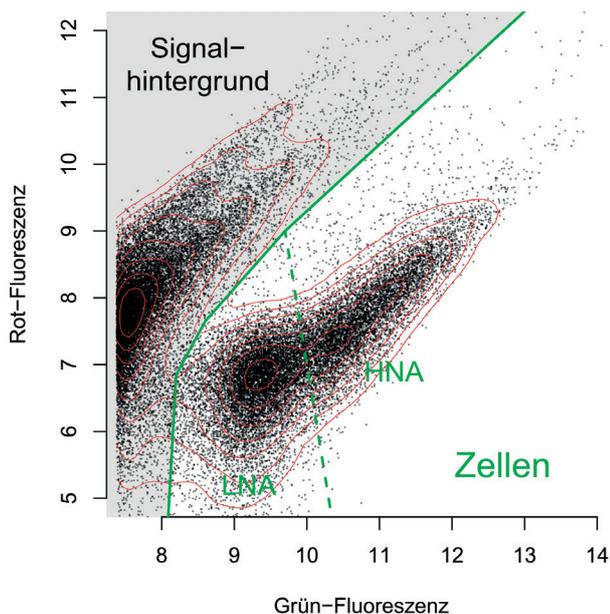


Abb. 30 Streudiagramm der Grün- und Rotfluoreszenz-Intensitäten einer durchflusszytometrischen Messung – jeder Punkt rechts unterhalb der grünen Linie stellt eine Zelle dar. Die Abgrenzung zwischen HNA- und LNA-Zellen erfolgt durch die strichlierte Linie (Zunabovic-Pichler et al. 2018)

Wässer unterschiedlicher Herkunft, also zum Beispiel Porengrundwässer, Karstgrundwässer oder auch Oberflächengewässer, unterscheiden sich sehr stark in ihrer Zellzahl, aber auch in ihrem Anteil an HNA- bzw. LNA-Zellen (Zunabovic-Pichler et al. 2018). Dadurch lassen sich Charakterisierungen dieser Wässer vornehmen, und durch wiederkehrende Messungen auffällige Änderungen in diesen Verhältnissen erkennen. Entsprechend dem Schweizerischen Lebensmittelbuch von 2012 wurde die Nachweisgrenze der Methode mit 100 Zellen pro Milliliter, und die Bestimmungsgrenze mit 1 000 Zellen pro Milliliter angegeben [142], wobei sich Zellzahlen z. B. für Porengrundwässer typischerweise im Bereich von 103 bis 105 Zellen pro Milliliter und für Oberflächengewässer im Bereich von 105 bis 107 Zellen pro Milliliter bewegen [143].

Auch wenn bestimmte bakterielle Arten zum Teil sehr scharf abgegrenzte Cluster im Streudiagramm bilden, ist eine artspezifische Detektion von z. B. Fäkalindikatoren wie *Escherichia coli* in der Durchflusszytometrie bisher nicht direkt, beziehungsweise nur mit größeren Aufwendungen möglich [144]. Es gibt Ansätze durch Anreicherungsschritte in der Probenvorbereitung das Aufkommen von z. B. Legionellen zu bestimmen [145], allerdings können diese Anwendungen klassische Kultivierungsmethoden bisher nicht ersetzen.

Ähnlich den koloniebildenden Einheiten (KBE) bei 22 °C bzw. 37 °C schafft die Durchflusszytometrie einen Überblick zum gesamtmikrobiellen Zustand des untersuchten Wassers. Im Gegensatz zu den KBE werden allerdings auch jene Mikroorganismen erfasst, die nicht in der Lage sind, auf einem stark nährstoffhalti-

gen Medium zu wachsen – es gibt Schätzungen, die davon ausgehen, dass weniger als 1 % der Bakterien auf gängigen Nährmedien kultivierbar sind [146]. Dadurch, dass keine Kultivierung für die Detektion der Zellen notwendig ist, verringert sich außerdem die Zeit bis zu einem Vorliegen des Untersuchungsergebnisses auf weniger als eine halbe Stunde. Aufgrund der kurzen Untersuchungszeit und der unkomplizierten Probenvorbereitung ist es in den vergangenen Jahren mehreren Herstellern möglich gewesen, selbstständig agierende Online-Systeme für durchflusszytometrische Messungen zu entwickeln. Diese Geräte sind in der Lage, ohne weiteres Zutun mehrere Wochen lang Proben zu ziehen, diese mit Fluoreszenzfarbstoffen zu versetzen und zu inkubieren und in weiterer Folge eine Messung durchzuführen. Besondere Bedeutung kommt dem sogenannten Gating zu, d. h. der Abgrenzung der Bakterienzellen von nicht durch Zellen erzeugten Hintergrundsignalen, bzw. die Abtrennung in HNA- und LNA-Zellen [147]. Nach erfolgter Abgrenzung dieser Signale ist eine direkte Übertragung der entsprechenden Messwerte und eine Einbindung in Leitsysteme möglich.

Solche Online-Systeme können sich in ihrer Bedienbarkeit und den Möglichkeiten, in die Analyse einzugreifen, stark unterscheiden. Das z. B. von der Firma Metanor angebotene System des „Online Bacteria Analyzer“ (OBA) bietet sehr viele Eingriffsmöglichkeiten in die Probenvorbereitung und den Messvorgang und erlaubt die Verwendung von eigenen Farbstoffgemischen, wodurch sich eine sehr große Flexibilität ergibt. Andererseits muss der Anwender auch entsprechendes Wissen für die Bedienung und Anwendung des Systems mitbringen. Andere Systeme, wie der von der Firma bNovate vertriebene BactoSense entsprechen mehr einem „Plug and Play“-Ansatz mit verhältnismäßig unkomplizierter Installation, geringerem Platzbedarf und einem vorgefertigtem Kartuschensystem. Allerdings sind bei diesem System die Eingriffsmöglichkeiten reduziert, und es können nur jene Farbstoffe genutzt werden, die vom Hersteller angeboten werden.

13.2 Problemstellung

Karstquellen stellen hochdynamische Systeme dar, deren Schüttmengen und Wasserqualitäten stark variieren können. Ursachen hierfür sind oftmals witterungsbedingte Einflüsse wie zum Beispiel Starkregenereignisse oder Schneeschmelze. Dadurch kann es innerhalb kurzer Zeit zu Änderungen in der Menge an transportierten Schwebstoffen, aber auch in der bakteriellen Belastung des Wassers kommen [148]. Zur unmittelbaren Erfassung dieser eben beschriebenen Ereignisse wird es notwendig, Messsysteme mit einer ausreichend hohen zeitlichen Auflösung zum Einsatz zu bringen [149].

Um die Dynamik in einem Karsteinzugsgebiet mit mehreren gefassten Quellen zu untersuchen, wurde ein Online-Durchflusszytometer (OBA – „Online Bacteria Analyzer“) der Firma Metanor für zwei Monate an einer Transportleitung eines österreichischen Wasserversorgers installiert. Dabei wurden am Online-Durchflusszytometer im Abstand von 30 Minuten Messungen der Totalzellzahl unter dem Einsatz von SYBR-Green-1 durchgeführt. Zusätzlich wurden sechs Monate lang alle ein bis zwei Tage Proben für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bei 22 °C (KBE 22), und Proben für eine durchflusszytometrische Referenzmessung an einem Labormessgerät genommen.

13.3 Fragestellungen

- Ist die Online-Durchflusszytometrie in der Lage, die mikrobielle Dynamik eines hochdynamischen Karstquelleinzugsgebiets angemessen darzustellen?
- Welche Voraussetzungen sind notwendig damit die Online-DFZ zuverlässige Ergebnisse liefern kann?
- Wie können die Ergebnisse der Online-DFZ in das betriebliche Qualitätsmonitoring eines wasserwirtschaftlichen Unternehmens eingebunden und genutzt werden?

13.4 Darstellung

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der täglichen Untersuchungen der KBE 22 und der täglichen durchflussszytometrischen Messungen der Gesamtzellzahl im Labor in einer Zeitreihe dargestellt. Da sich die Absolutwerte dieser beiden Methoden um Größenordnungen voneinander unterscheiden, wurden in dieser Darstellung alle Werte durch Heranziehen des Minimal- und des Maximalwerts zwischen 0 und 1 normiert. Dabei zeigt sich über die gesamte Untersuchungsperiode insgesamt eine gute Übereinstimmung in der Darstellung der zugrundeliegenden Dynamik. Eine Zu- bzw. Abnahme der KBE 22 wird auch mit den durchflussszytometrischen Messungen gut abgebildet (Korrelation nach Pearson: $r = 0,74$ und $p < 0,001$). Auffällig ist, dass es einzelne Ereignisse wie z. B. um den 1. bzw. 15. Juli gibt, in denen die KBE 22 deutlich stärker reagiert als die durchflussszytometrischen Messungen. Möglicherweise kommt es hier zu einem vermehrten Aufkommen kultivierbarer Bakterien in der Grundgesamtheit der in der untersuchten Wasserprobe vorkommenden Organismen. Auch wenn für die untersuchte Stelle eine sehr gute Übereinstimmung zwischen KBE 22 und durchflussszytometrischer Gesamtzellzahl besteht, gibt es Untersuchungen, die gezeigt haben, dass diese beiden Untersuchungsparameter nicht immer miteinander korrelieren [150]. Hier gibt es jedenfalls einen starken Zusammenhang mit der Kultivierbarkeit der jeweils in der betrachteten Probe vorkommenden Bakterien [151].

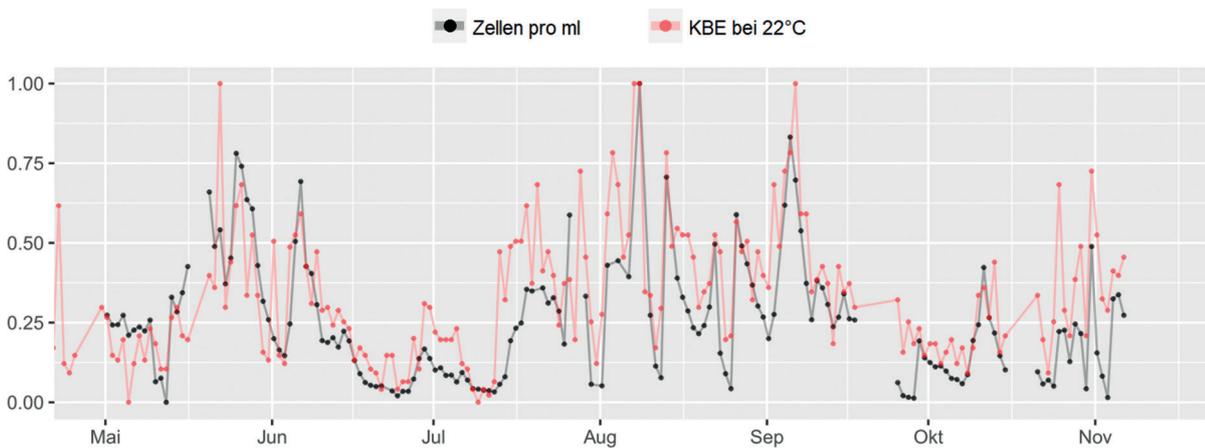


Abb. 31 Überlagerung der Gesamtzellzahlen (schwarz) mit KBE bei 22 °C (rot) für ein Karstquelleinzugsgebiet (normalisiert zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert)

Die Ergebnisse der mittels Online-Durchflussszytometrie ermittelten Totalzellzahlen sind in Abb. 32 dargestellt. Zusätzlich wurden die in diesem Zeitraum durchgeführten Referenzmessungen der Totalzellzahl im Labor in Rot abgebildet. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigen sich ausgesprochen gute Übereinstimmungen zwischen mittels Online-Durchflussszytometrie ermittelten und den im Labor am Referenzgerät erhaltenen Totalzellzahlen. Es zeigt sich also deutlich, dass das eingesetzte Online-System zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse in derselben Qualität wie das Laborgerät liefern kann.

Gleichzeitig ist zu erkennen, dass das Online-Durchflussszytometer durch die hohe zeitliche Auflösung der Messungen Veränderungen in der Zellzahl aufzeigen kann, die durch täglich bis zweitäglich gezogene Proben verborgen geblieben sind. Beispielsweise bleibt die Spitze um den 7. August verborgen, da an diesem Tag keine Probenahme möglich war – ebenso der Abfall der Zellzahlen um den 25. Juli. Außerdem kommt es zu einem Verpassen der Extremwerte durch die längeren Untersuchungsintervalle. So wird bei den täglichen Proben der Maximalwert am 3. September durch das Verpassen des Spitzenwertes um über 50 % unterschätzt.

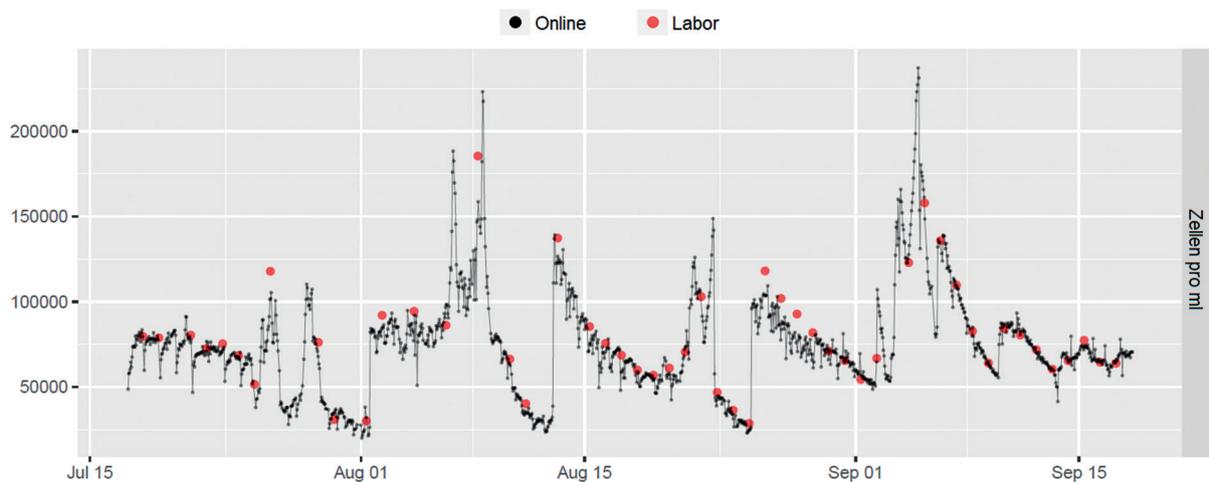


Abb. 32 Vergleich von DFZ-Messungen eines Karstquelleinzugsgebiets – durchgeführt im Labor (rot) und mit Online-Messungen (schwarz) (Schönher et al. 2021)

Bei dem hier untersuchten Karstsystem handelt es sich um ein sehr dynamisches Einzugsgebiet mit mehreren Quellen, die sehr kurzfristig ein- bzw. ausgeleitet werden können. Insbesondere die sehr steilen Sprünge, z. B. am 14. und 23. August, sind auf solche Wechsel zurückzuführen. Im Gegensatz zu der hohen Dynamik in Karstgrundwässern ist in ausgedehnten Porengrundwässern ohne Beeinflussung von Oberflächengewässern in der Regel eine geringere Dynamik zu erwarten [152]. Dementsprechend kann es sinnvoll sein, die Messintervalle von Online-Systemen (bzw. die Abstände von Probenahmen) den zu erwarteten zeitlichen Skalen der hydrologischen Gegebenheiten anzupassen. Für das hier abgebildete System ist eine möglichst hohe Messfrequenz als zielführend anzusehen.

Entscheidet man sich für die Einrichtung eines Online-Durchflussszytometers, gilt es neben der Auswahl der geeigneten Messintervalle auch die für die Fragestellung passenden Fluoreszenzfarbstoffe zu wählen. Aber auch eine Vielzahl weiterer Aspekte ist bei der Wahl des Systems und dessen Einrichtung zu beachten. Beispielsweise bedarf die Herstellung von Farbstoffgemischen entsprechend geschulten Laborpersonals und die Entsorgung der mit Farbstoffen versetzten Proben ist nicht im kommunalen Abwasser möglich, wodurch Kartuschensysteme schnell an Attraktivität gewinnen, da der Hersteller in der Regel auch die Entsorgung der Abfälle übernimmt. Die Zuleitung zum Gerät muss möglichst kurz gehalten werden und darf nicht aus wachstumsfördernden Materialien bestehen, um die Bildung von Biofilmen zu vermeiden, die die Messergebnisse verfälschen können.

Da die durchflussszytometrisch ermittelten Zellzahlen zwischen verschiedenen Ressourcenarten stark voneinander abweichen können, und selbst bei Ressourcen derselben Art große Unterschiede auftreten, ohne dass gesundheitsrelevante Bakterien involviert sind, ist es schwierig, allgemein gültige Richtwerte zu definieren, bei deren Überschreitung eine Ausleitung des Wassers erfolgt. Oftmals ist es weniger das Erreichen eines bestimmten Werts, das Aufmerksamkeit erregen sollte, sondern eine atypische Veränderung der Zellzahlen oder eine starke Verschiebung im Verhältnis zwischen HNA- und LNA-Zellen, da hiermit auch eine Veränderung in der mikrobiellen Zusammensetzung einhergehen kann [119]. Solche atypischen Änderungen können dann als Anlass für weiterführende mikrobiologische Untersuchungen dienen, um das Aufkommen oder Eindringen möglicher hygienisch relevanter Organismen frühzeitig zu erkennen.

Welche Veränderungen in den durchflussszytometrischen Ergebnissen als verdächtig anzusehen sind, lässt sich zurzeit nicht pauschal ableiten, und hängt stark von der Dynamik der untersuchten Stelle ab. Stattdessen ist es notwendig, die zu untersuchende Stelle über einen repräsentativen Zeitraum zu beobachten und die mögliche Schwankungsbreite festzustellen, um daraus Richtwerte für Zellzahlen und HNA-/LNA-Anteil im Normalbetrieb abzuleiten. Diese Ergebnisse können in weiterer Folge herangezogen werden, um daraus Schwellen- bzw. Alarmwerte für eine betriebsinterne mikrobiologische Online-

Überwachung zu definieren. Darauf aufbauend können dann mikrobiologische Proben entnommen werden, die nach den gesetzlichen Vorgaben auf das Vorhandensein hygienisch relevanter Mikroorganismen untersucht werden.

13.5 Schlussfolgerungen

- Online-Durchflusszytometrie ist in der Lage, hochdynamische Prozesse angemessen abzubilden, die mit täglichen Probenahmen nicht erfasst werden können.
- Die notwendige zeitliche Auflösung der Messungen hängt stark von den hydrologischen Gegebenheiten des jeweiligen Grundwassers ab, da z. B. Karstquellen eine sehr viel höhere Dynamik aufweisen als Porengrundwässer.
- Um ein geeignetes System zu wählen und einzurichten, müssen verschiedene Rahmenbedingungen wie z. B. die Wahl passender Farbstoffe oder die Sicherstellung von Wartung und Betrieb erfüllt sein.
- Die Interpretation durchflusszytometrischer Messungen anhand einzelner Grenzwerte ist oftmals nicht zweckmäßig. Insbesondere starke Änderungen der Zellzahlen oder Verschiebungen der HNA-/LNA-Anteile können wertvolle Informationen liefern.
- Um ortsspezifische Besonderheiten zu erfassen, ist eine Einlaufphase (und gegebenenfalls eine Korrelation mit kultivierungsabhängigen Methoden) sinnvoll, aus der Schwellen- und Alarmwerte für die Einbindung in Leitsysteme abgeleitet werden können.

13.6 Detailmethodik

Die in Abb. 32 dargestellten Messungen der Online-Durchflusszytometrie wurden mit einem „Online Bacteria Analyzer“ der Firma Metanor durchgeführt. Für die Messungen wurde alle 30 Minuten eine Probe aus einer PTFE-Zulaufleitung entnommen und mit SYBR-Green-1 als Farbstoff für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Referenzmessungen im Labor wurden an einem Accuri C6 der Firma BD durchgeführt. Die im Labor untersuchten Proben wurden ebenfalls mit SYBR-Green-1 versetzt und für 13 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Gating der Zellen erfolgte für beide Geräte mit geringfügigen Anpassungen nach Köttsch et al. [153]. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten bei 22 °C erfolgte entsprechend ISO 6222 [125].

13.7 Referenzarbeiten

Schönher C, Proksch P, Kerschbaumer D, Fiedler CJ, Schmidt BJ, Keskinöz C, Aguilar Gonzalez AE, Mayr E, Perfler R, Zunabovic-Pichler M (2021): „Every cell counts“ – experiences with flow cytometry for Austrian drinking water supply. Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft 11-12

Zunabovic-Pichler M, Mayr E, Schönher C, Fiedler C, Kerschbaumer D, Proksch P, Perfler R (2018): Durchflusszytometrie in der Wasserversorgung. Mikrobiologische Charakterisierung von Einflussfaktoren und Zustandsveränderungen bei der Wasserversorgung. Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus, Wien.

14 ALLGEMEINE LITERATUR

- [1] BgweV (2009): BGBl. II Nr. 349/2009 – Verordnung des Bundesministers für Gesundheit über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung (Badegewässerverordnung – BGewV) idgF.
- [2] Hirk S, Huhulescu S, Allerberger F, Lepuschitz S, Rehak S, Weil S, Gschwandtner E, Hermann M, Neuhold S, Zoufaly A, Indra A (2016): Necrotizing fasciitis due to *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 after exposure to Austrian bathing sites. *Wien Klin Wochenschr* 128:141-5.
- [3] Huhulescu S, Indra A, Feierl G, Stoeger A, Ruppitsch W, Sarkar B, Allerberger F (2007): Occurrence of *Vibrio cholerae* serogroups other than O1 and O139 in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 119:235-41.
- [4] Colwell RR (2004): Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. *Int Microbiol* 7:285-9.
- [5] Morris JG, Jr (1990): Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol Rev* 12:179-91.
- [6] Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Canonico C, Masini L, Pianetti A, Parlani C, Luzzi I, Caola I, Paternoster C, Carraturo A (2011): Unusual case of necrotizing fasciitis caused by *Vibrio cholerae* O137. *J Clin Microbiol* 49:757-9.
- [7] Wagner PD, Evans SD, Dunlap J, Ballon-Landa G (1995): Necrotizing fasciitis and septic shock caused by *Vibrio cholerae* acquired in San Diego, California. *West J Med* 163:375-7.
- [8] Baker-Austin C, Trinanet J, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J (2017): Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. *Trends Microbiol* 25:76-84.
- [9] ISO 21872-1:2017 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. – Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. International Organization for Standardization, Geneva Switzerland.
- [10] Chaiyanan S, Huq A, Mangel T, Colwell RR (2001): Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst Appl Microbiol* 24:331-41.
- [11] Stalder GL, Farnleitner AH, Sommer R, Beiglböck C, Walzer C (2011): Gefährdungs- und risikobasierende Konzepte zur Bewertung der mikrobiologischen Wasserqualität. Teil 2: Literaturübersicht zum Vorkommen und zur Ökologie potentiell wasserübertragbarer zoonotischer Krankheitserreger in Nutz- und Wildtierpopulationen mit spezieller Berücksichtigung des alpinen und voralpinen Raumes. *Vet Med Austria* 98:54-65.
- [12] Cohen MB, Giannella RA, Lososky GA, Lang DR, Parker S, Hawkins JA, Gunther C, Schiff GA (1999): Validation and characterization of a human volunteer challenge model for cholera by using frozen bacteria of the new *Vibrio cholerae* epidemic serotype, O139. *Infect Immun* 67:6346-9.
- [13] Sack DA, Tacket CO, Cohen MB, Sack RB, Lososky GA, Shimko J, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, Giannella RA, Schiff G, Lang D (1998): Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. *Infect Immun* 66:1968-72.
- [14] Farnleitner AH, Reischer GH, Savio DF, Frick C, Schuster N, Schilling K, Mach RL, Derx J, Kirschner AK, Blaschke AP, Sommer R (2014): Diagnostik mikrobiologischer Fäkalkontaminationen in Wasser und Gewässern: Status Quo und gegenwärtige Entwicklungen. *Wiener Mitteilungen* 230:157-184.
- [15] Stalder G, Sommer R, Walzer C, Mach RL, Beiglböck C, Blaschke AP, Farnleitner AH (2011): Gefährdungs- und risikobasierende Konzepte zur Bewertung der mikrobiologischen Wasserqualität – Teil 1. *Vet Med Austria* 98:9-24.
- [16] Ahmed W, Hughes B, Harwood VJ (2016): Current status of marker genes of bacteroides and related taxa for identifying sewage pollution in environmental waters. *Water (Switzerland)* 8:231.
- [17] Wuertz S, Wang D, Reischer GH, Farnleitner AH (2011): Microbial Source Tracking: Methods, Application, and Case Studies. Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ (eds), Springer – New York, pp 61-112.
- [18] EU-WRRL (2000): Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik.
- [19] EU-BGRL (2006): Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG.

- [20] Farnleitner AH, Reischer GH, Stadler H, Kollanur D, Sommer R, Zerobin W, Blöschl G, Barrella KM, Truesdale JA, Casarez EA, Di Giovanni GD (2011): Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies. Chapter 18 – Agricultural and Rural Watersheds. In: Hagedorn C, Haarwood J, Blanch A (eds), Springer – New York, pp 399-432.
- [21] Linke R, Stadler P, Reischer GH, Savio D, Kollanur D, Mayer R, Mach RL, Kirschner AKT, Sommer R, Derx J, Stadler H, Farnleitner AH (2019): Using genetic microbial source tracking (MST) markers to identify fecal pollution sources in spring water of a large alpine karst catchment. In: Rose JB, Jimenez-Cisneros (eds), Global Water Pathogen Project Michigan State University, E Lansing, MI, UNESCO.
- [22] Derx J, Schijven J, Sommer R, Zoufal-Hruza CM, van Driezum IH, Reischer G, Ixenmaier S, Kirschner A, Frick C, de Roda Husman AM, Farnleitner AH, Blaschke AP (2016): QMRacatch: Human-associated fecal pollution and infection risk modeling for a river/floodplain environment. *Journal of Environmental Quality* 45:1205-1214.
- [23] Schijven J, Derx J, de Roda Husman AM, Blaschke AP, Farnleitner AH (2015): QMRacatch: Microbial quality simulation of water resources including infection risk assessment. *Journal of Environmental Quality* 44:1491-1502.
- [24] Kildare BJ, Leutenegger CM, McSwain BS, Bambic DG, Rajal VB, Wuertz S (2007): 16S rRNA based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. *Water Res* 41:3701-15.
- [25] Green HC, Haugland RA, Varma M, Millen HT, Borchardt MA, Field KG, Walters WA, Knight R, Sivaganesan M, Kelty CA, Shanks OC (2014): Improved HF183 quantitative real-time PCR assay for characterization of human fecal pollution in ambient surface water samples. *Appl Environ Microbiol* 80:3086-94.
- [26] Mieszkin S, Furet JP, Corthier G, Gourmelon M (2009): Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 75:3045-54.
- [27] Berg JD, Fiksdal L (1988): Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-beta-D-galactoside. *Appl Environ Microbiol* 54:2118-22.
- [28] Fiksdal L, Pommepuy M, Caprais MP, Midttun I (1994): Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Appl Environ Microbiol* 60:1581-4.
- [29] Koschelnic J, Vogl W, Epp M, Lackner M (2015): Rapid analysis of beta-D-glucuronidase activity in water using fully automated technology. *Water Resources Management VIII*, Brebbia CA (ed), Wit Press, Southampton, pp 471-481.
- [30] Ryzinska-Paier G, Lendenfeld T, Correa K, Stadler P, Blaschke AP, Mach RL, Stadler H, Kirschner AK, Farnleitner AH (2014): A sensitive and robust method for automated on-line monitoring of enzymatic activities in water and water resources. *Water Sci Technol* 69:1349-58.
- [31] Stadler P, Blöschl G, Vogl W, Koschelnic J, Epp M, Lackner M, Oismüller M, Kumpan M, Nemeth L, Strauss P, Sommer R, Ryzinska-Paier G, Farnleitner AH, Zessner M (2016): Realtime monitoring of beta-d-glucuronidase activity in sediment laden streams: A comparison of prototypes. *Water Res* 101:252-261.
- [32] Burnet JB, Dinh QT, Imbeault S, Servais P, Dorner S, Prévost M (2019): Autonomous online measurement of β -D-glucuronidase activity in surface water: is it suitable for rapid E. coli monitoring? *Water Res* 152:241-250.
- [33] Burnet JB, Sylvestre É, Jalbert J, Imbeault S, Servais P, Prévost M, Dorner S (2019): Tracking the contribution of multiple raw and treated wastewater discharges at an urban drinking water supply using near real-time monitoring of β -d-glucuronidase activity. *Water Res* 164: 114869.
- [34] Ender A, Goeppert N, Grimmeisen F, Goldscheider N (2017): Evaluation of β -d-glucuronidase and particle-size distribution for microbiological water quality monitoring in Northern Vietnam. *Sci Total Environ* 580:996-1006.
- [35] Baudart J, Servais P, De Paoli H, Henry A, Lebaron P (2009): Rapid enumeration of *Escherichia coli* in marine bathing waters: potential interference of nontarget bacteria. *J Appl Microbiol* 107:2054-62.
- [36] Fiksdal L, Tryland I (2008): Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. *Curr Opin Biotechnol* 19:289-94.

- [37] Pollet RM, D'Agostino EH, Walton WG, Xu Y, Little MS, Biernat KA, Pellock SJ, Patterson LM, Creekmore BC, Isenberg HN, Bahethi RR, Bhatt AP, Liu J, Gharaibeh RZ, Redinbo MR (2017): An Atlas of β -Glucuronidases in the Human Intestinal Microbiome. *Structure* 25:967-977.
- [38] Cazals M, Stott R, Fleury C, Proulx F, Prévost M, Servais P, Dorner S, Burnet JB (2020): Near real-time notification of water quality impairments in recreational freshwaters using rapid online detection of β -D-glucuronidase activity as a surrogate for *Escherichia coli* monitoring. *Sci Total Environ* 720:13.
- [39] Stadler P, Blöschl G, Nemeth L, Oismüller M, Kumpan M, Krampe J, Farnleitner AH, Zessner M (2019): Event-transport of beta-d-glucuronidase in an agricultural headwater stream: Assessment of seasonal patterns by on-line enzymatic activity measurements and environmental isotopes. *Sci Total Environ* 662:236-245.
- [40] Fishman WH (1974): *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition). Bergmeyer HU (ed), Academic Press, pp 929-943.
- [41] Crawford JT, Loken LC, Casson NJ, Smith C, Stone AG, Winslow LA (2015): High-speed limnology: using advanced sensors to investigate spatial variability in biogeochemistry and hydrology. *Environ Sci Technol* 49:442-50.
- [42] ISO 9308-2:2012 – Wasserbeschaffenheit – Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien – Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl. International Organization for Standardization, Geneva Switzerland.
- [43] Gootz TD (2010): The global problem of antibiotic resistance. *Crit Rev Immunol* 30:79-93.
- [44] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N (2007): CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59:165-74.
- [45] Baquero F, Martínez JL, Cantón R (2008): Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260-5.
- [46] Hooban B, Joyce A, Fitzhenry K, Chique C, Morris D (2020): The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase encoding genes: A scoping review. *Water Res* 180:7.
- [47] Zhang XX, Zhang T, Fang HH (2009): Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:397-414.
- [48] Carattoli A (2008): Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 1:117-23.
- [49] Jamal W, Albert MJ, Rotimi VO (2014): Real-time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria. *BMC Microbiol* 14:014-0289.
- [50] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005): Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63:219-28.
- [51] Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, Feierl G, Leitner E, Masoud L, Hoenigl M, Raggam RB, Dosch V, Marth E (2010): Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect* 60:44-51.
- [52] Kühn I, Tullus K, Burman LG (1991): The use of the PhP-KE biochemical fingerprinting system in epidemiological studies of faecal *Enterobacter cloacae* strains from infants in Swedish neonatal wards. *Epidemiol Infect* 107:311-9.
- [53] ÖNORM M 6231:2001 – Richtlinie für die ökologische Untersuchung und Bewertung von stehenden Gewässern. Österreichisches Normungsinstitut, Wien.
- [54] Utermöhl H (1958): Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplanktonmethodik. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: *Mitteilungen* 9:1-38.
- [55] Achleitner D, Gassner H, Jagsch A (2008): Die limnologische Langzeitentwicklung des Mondsees und Irrsees. *Schriftenreihe BAW* 26:3-17.
- [56] Luger M, Kammerlander B, Blatterer H, Gassner H (2021): Von der Eutrophierung in die Klimaerwärmung—45 Jahre limnologisches Monitoring Mondsee. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft* 73:418-425.

- [57] Chorus I, Welker M (2021): Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. CRC Press, Oxon, Boca Raton, on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH.
- [58] Wolfram G, Donabaum K, Dokulil M (2015): Leitfaden zur Erhebung der biologischen Qualitätselemente. Teil B2 – Phytoplankton. BMLFUW, Wien.
- [59] Forsberg C, Ryding SO (1980): Eutrophication parameters and trophic state indices in 30 waste receiving Swedish lakes. Arch Hydrobiol 89:189–207.
- [60] Schafferer E, Pfister P (2018): Ergebnisbericht Qualitätselement Phytoplankton. Oberösterreich 2017. Amtliches Seen-Messnetz (ASM), Oberösterreichische Landesregierung, Linz.
- [61] Meriluoto J, Spoof L, Codd A (2017): Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Wiley & Sons Limited.
- [62] DIN ISO 20179:2007 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von Microcystinen – Verfahren mittels Festphasenextraktion (SPE) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC) mit ultravioletter (UV) Detektion. Deutsches Institut für Normung, Berlin.
- [63] Pacheco AB, Guedes IA, Azevedo SM (2016): Is qPCR a Reliable Indicator of Cyanotoxin Risk in Freshwater? Toxins 8.
- [64] Kurmayer R, Gumpenberger M (2006): Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. Mol Ecol 15:3849-61.
- [65] BMLRT (2021): Umweltziele – Qualitätszielverordnungen. Bundesministerium für Landwirtschaft, Regionen und Tourismus – Stubenring 1, 1010 Wien, Österreich.
- [66] ÖNORM M 6323:1997 – Richtlinien für die ökologische Untersuchung und Bewertung von Fließgewässern. Österreichisches Normungsinstitut, Wien.
- [67] Bálint M, Bahram M, Eren AM, Faust K, Fuhrman JA, Lindahl B, O'Hara RB, Öpik M, Sogin ML, Unterseher M, Tedersoo L (2016): Millions of reads, thousands of taxa: microbial community structure and associations analyzed via marker genes. FEMS Microbiol Rev 40:686-700.
- [68] Illumina (2013): 16S Metagenomic sequencing library preparation guide. <https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf> Part # 15044223 Rev. B
- [69] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, et al. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437:376-80.
- [70] Kirschner AK, Kavka GG, Velimirov B, Mach RL, Sommer R, Farnleitner AH (2009): Microbiological water quality along the Danube River: integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. Water Res 43:3673-84.
- [71] Reischer GH, Kavka GG, Kasper DC, Winter C, Mach RL, Farnleitner AH (2008): Applicability of DNA based quantitative microbial source tracking (QMST) evaluated on a large scale in the Danube River and its important tributaries. Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie 162(1-2):117.
- [72] Velimirov B, Milosevic N, Kavka GG, Farnleitner AH, Kirschner AK (2011): Development of the bacterial compartment along the Danube River: a continuum despite local influences. Microb Ecol 61:955-67.
- [73] Winter C, Hein T, Kavka G, Mach RL, Farnleitner AH (2007): Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. Appl Environ Microbiol 73:421-31.
- [74] Liska I, Wagner F, Slobodnik J (2008): Joint Danube Survey 2 – Final Scientific Report. ICPDR – International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna, Austria.
- [75] Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S. 2011. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 75:14-49.

- [76] Lagkouvardos I, Joseph D, Kapfhammer M, Giritli S, Horn M, Haller D, Clavel T. 2016. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci Rep* 6:33721.
- [77] Sinclair L, Ijaz UZ, Jensen LJ, Coolen MJL, Gubry-Rangin C, Chroňáková A, Oulas A, Pavloudi C, Schnetzer J, Weimann A, Ijaz A, Eiler A, Quince C, Pafilis E. 2016. Seqenv: linking sequences to environments through text mining. *Peer J* 4: e2690.
- [78] ECDC. 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2015. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden.
- [79] BMASGK. 2019. Nationalen Referenzzentrale für Legionella-Infektionen – Jahresbericht 2018. Österreichische Agentur für Ernährungssicherheit, Wien.
- [80] Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, Mateu L, Sopena N, Pedro-Botet ML, Garcia-Nuñez M. 2019. Legionella SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. *Sci Rep* 9:018-36924.
- [81] Kirschner AKT. 2016. Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Res* 93:276-288.
- [82] Wüthrich D, Gautsch S, Spieler-Denz R, Dubuis O, Gaia V, Moran-Gilad J, Hinic V, Seth-Smith HM, Nickel CH, Tschudin-Sutter S, Bassetti S, Haenggi M, Brodmann P, Fuchs S, Egli A. 2019. Air-conditioner cooling towers as complex reservoirs and continuous source of Legionella pneumophila infection evidenced by a genomic analysis study in 2017, Switzerland. *Euro Surveill* 24:1560-7917.
- [83] Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 47:981-7.
- [84] Lee JS, Little BJ. 2019. A mechanistic approach to understanding microbiologically influenced corrosion by metal-depositing bacteria. *Corrosion* 75:6-11.
- [85] Linhardt P. 2010. Twenty years of experience with corrosion failures caused by manganese oxidizing microorganisms. *Materials and Corrosion* 61:1034-39.
- [86] Landoulsi J, Cooksey KE, Dupres V. 2011. Review--Interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion. *Biofouling* 27:1109-24.
- [87] Linhardt P. 2015. Unusual corrosion of nickel-aluminium bronze in a hydroelectric power plant. *Materials and Corrosion* 66:1536-41.
- [88] Paul JR, Trask JD, Gard S. 1940. II. Poliomyelitic virus in urban sewage. *Journal of Experimental Medicine* 71(6):765-78.
- [89] Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. 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* 49:461-87.
- [90] Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, Haramoto E, Rose JB. 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment* 739:139076.
- [91] Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environmental Science and Technology Letters* 7:511-516.
- [92] Ahmed W, Bibby K, D'Aoust PM, Delatolla R, Gerba CP, Haas CN, Hamilton KA, Hewitt J, Julian TR, Kaya D, Monis P, Moulin L, Naughton C, Noble RT, Shrestha A, Tiwari A, Simpson SL, Wurtzer S, Bivins A. 2021. Differentiating between the possibility and probability of SARS-CoV-2 transmission associated with wastewater: empirical evidence is needed to substantiate risk. *FEMS Microbes* 2:xtab007.
- [93] Chen C, Hayward K, Khan SJ, Örmeci B, Pillay S, Rose JB, Thanikal JV, Zhang T. 2021. Role of wastewater treatment in covid-19 control. *Water Quality Research Journal* 56:68-82.
- [94] Sobsey MD. 2022. Absence of virological and epidemiological evidence that SARS-CoV-2 poses COVID-19 risks from environmental fecal waste, wastewater and water exposures. *J Water Health* 20:126-138.
- [95] Ahmed W, Simpson SL, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Blackall LL, Bofill-Mas S, Bosch A, Brandão J, Choi PM, Ciesielski M, Donner E, D'Souza N, Farnleitner AH, Gerrity D, Gonzalez R, Griffith JF, Gya-wali P, Haas CN, Hamilton KA, Hapuarachchi HC, Harwood VJ, Haque R, Jackson G, Khan SJ, Khan W,

Kitajima M, Korajkic A, La Rosa G, Layton BA, Lipp E, McLellan SL, McMinn B, Medema G, Metcalfe S, Meijer WG, Mueller JF, Murphy H, Naughton CC, Noble RT, Payyappat S, Petterson S, Pitkänen T, Rajal VB, Reyneke B, Roman FA, Jr., Rose JB, Rusiñol M, Sadowsky MJ, Sala-Comorera L, et al. (2022): Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci Total Environ* 805:25.

- [96] ÖLMB (2007): Österreichisches Lebensmittelbuch, IV. Auflage, Codexkapitel/B1/Trinkwasser. BMGFJ-75210/0009-IV/B/7/2007 vom 15.06.2007 idgF.
- [97] TWV (2001): BGBl. II Nr. 304/2001 idgF. Verordnung des Bundesministers für soziale Sicherheit und Generationen über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TWV).
- [98] Servais P, Billen G, Laurent P, Levi Y, Randon G (1992): Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the northern Parisian suburbs. *Revue des Sciences de l'Eau* 5:69-89.
- [99] Flemming HC (1992): Biofilme und Wassertechnologie. Teil II: Unerwünschte Biofilme – Phänomene und Mechanismen. *gwf-Wasser/Abwasser* 133:119-130.
- [100] Werner P (1985): Eine Methode zur Bestimmung der Wiederverkeimung von Trinkwasser. *Vom Wasser* 65:257-270.
- [101] Dukan S, Levi Y, Piriou P, Guyon F, Villon P (1996): Dynamic modelling of bacterial growth in drinking water networks. *Water Research* 30:1991-2002.
- [102] Kirschner AKT, Lindner G, Jakwerth S, Vierheilig J, van Driezum IH, Derx J, Blaschke AP, Savio D, Farnleitner AH (2021): Assessing biological stability in a porous groundwater aquifer of a riverbank filtration system: combining traditional cultivation-based and emerging cultivation-independent in situ and predictive methods. *Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft* 11-12.
- [103] Savio D, Vierheilig J, Karl M, Houdek J, Jakwerth S, Fiedler F, Goll T, Brandl H, Kandler W, Sommer R, Kirschner AKT & Farnleitner AH (2019): Combining flow cytometric and taxonomic analysis of bacterial community dynamics to study the biostability of drinking water resources – Part 2: High-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM) 15-20 September 2019 Vienna, Austria.
- [104] Vierheilig J, Savio D, Jakwerth S, Karl M, Goll T, Fiedler F, Brandl H, Kandler W, Sommer R, Farnleitner AH, Kirschner AKT (2019): Combining flow cytometric and taxonomic analysis of bacterial community dynamics to study the biostability of drinking water resources – Part 1: Flow cytometric determination of microbial cell numbers. 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM) 15-20 September 2019 Vienna, Austria.
- [105] Servais P, Anzil A, Ventresque C (1989): Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2732-2734.
- [106] Van der Kooij D (1990): Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In: McFetters GA (ed). *Drinking water microbiology, Progress and recent development*. Springer Verlag, Michigan USA. pp 57-87.
- [107] Van der Kooij D (1992): Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *Journal / American Water Works Association* 84:57-65.
- [108] Hammes FA, Egli T (2005): New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. *Environmental Science and Technology* 39:3289-3294.
- [109] Servais P, Billen G, Hascoët MC (1987): Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Research* 21:445-450.
- [110] Joret JC, Levi Y, Gibert M (1989): Measurement of Biodegradable Organic Carbon – A Tool in Water Treatment. *Water Supply* 7:41.
- [111] Allgeier SS, Summers RS, Jacangelo J, Hatcher VA, Moll DM, Hooper S, Schwertfeger J, Green R (1996): A Simplified and Rapid Method for Biodegradable Dissolved Organic Carbon Measurement. *Proc 1996 AWWA WQTC*, Boston.
- [112] Hamsch B (1992): Untersuchungen zu mikrobiellen Abbauvorgängen bei der Uferfiltration. Dissertation, Universität Karlsruhe, 1992.

- [113] Hamsch B, Werner P, Frimmel FH (1992): Bakterienvermehrungsmessungen in aufbereiteten Wässern verschiedener Herkunft. *Acta hydrochim hydrobiol* 20:9-14.
- [114] Werner P (1994): Untersuchungen zur Substrateigenschaft organischer Wasserinhaltsstoffe bei der Trinkwasseraufbereitung. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B* 180:46-61.
- [115] Wricke B, Petzoldt H, Korth A, Krüger M, Andrusch T, Böhm U, Häusler H (2002): Minimierung der Desinfektionsnebenprodukte und der Wiederverkeimung im Verteilungsnetz von Fernwasser-Versorgungssystemen. Abschlussbericht zum BMBF-Vorhaben, Schriftenreihe des TZW 17.
- [116] Lindner G, Gemeiner E, Knetsch S, Lettl A, Holzhammer E, Farnleitner AH, Sommer R (2019): Proliferation potential – Drinking water: Standardization and quality assurance. 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM) 15-20 September 2019 Vienna, Austria.
- [117] Lindner G, Gemeiner E, Knetsch S, Lettl A, Holzhammer E, Kirschner A, Farnleitner A, Sommer R (2018): Vermehrungspotenzial – Trinkwasser: Standardisierung und Qualitätssicherung. *ÖGHMP*, 36. JAHRESTAGUNG, 4 – 7 Juni 2018, Messe Congress, Graz, Abstractbook, ISBN-Nr 978-3-9503828-2-2.
- [118] Farhat N, Hammes F, Prest E, Vrouwenvelder J (2018): A uniform bacterial growth potential assay for different water types. *Water Research* 142:227-35.
- [119] Prest EI, Hammes F, Kötzsch S, van Loosdrecht MCM, Vrouwenvelder JS (2013): Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research* 47:7131-42.
- [120] ÖNORM M 5873-1:2001 – Anlagen zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlen – Anforderungen und Prüfung – Anlagen mit Quecksilberdampf-Niederdruckstrahlern. Österreichisches Normungsinstitut, Wien.
- [121] Cabaj A, Sommer R, Pribil W, Haider T (2002): The spectral UV sensitivity of microorganisms used in biosimetry. *Water Science and Technology: Water Supply* 2:175-81.
- [122] Gehringer P, Eschweiler H, Leth H, Pribil W, Pflieger S, Cabaj A, Haider T, Sommer R (2003): Bacteriophages as viral indicators for radiation processing of water: A chemical approach. *Applied Radiation and Isotopes* 58:651-56.
- [123] Sommer R, Pribil W, Appelt S, Gehringer P, Eschweiler H, Leth H, Cabaj A, Haider T (2001): Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7nm) and ionizing (gamma) radiation: A comparative approach. *Water Research* 35:3109-16.
- [124] ÖNORM M5873-1:2020/DIN 19294-1:2020 – Geräte zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlung – Teil 1: Anforderungen und Prüfung von Geräten mit UVNiederdrucklampen. Austrian Standards International, Wien.
- [125] ISO 6222:1999. Wasserbeschaffenheit – Quantitative Bestimmung der kultivierbaren Mikroorganismen – Bestimmung der Koloniezahl durch Einimpfen in ein Nähragarmedium. Österreichisches Normungsinstitut, Wien.
- [126] ÖNORM M 5873-2:2003 – UV Anlagen zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlen – Anforderungen und Prüfung – Teil 2: Anlagen mit Quecksilberdampf-Mitteldruckstrahlern (Vornorm). Österreichisches Normungsinstitut, Wien.
- [127] ÖNORM M 5873-3:2020 – Geräte zur Desinfektion von Wasser mittels Ultraviolett-Strahlung – Teil 3: Anforderung an und Prüfung von Referenzradiometern. Austrian Standards International, Wien.
- [128] US-EPA (2006): Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule. United States Environmental Protection Agency.
- [129] Hoffman RA, Hansen WP (1981): Immunofluorescent analysis of blood cells by flow cytometry. *Int J Immunopharmacol* 3:249-54.
- [130] Michelson AD. 1996. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87:4925-36.
- [131] Porter J, Deere D, Hardman M, Edwards C, Pickup R (1997): Go with the flow – Use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiology Ecology* 24:93-101.
- [132] Robertson BR, Button DK (1989): Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* 10:70-76.
- [133] Berney M, Vital M, Hülshoff I, Weilenmann HU, Egli T, Hammes F (2008): Rapid, cultivationindependent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Research* 42:4010-4018.

- [134] Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res* 42:269-77.
- [135] Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64:109-30.
- [136] Haugland RP (1994): Spectra of Fluorescent Dyes Used in Flow Cytometry. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (eds). *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 42: 641-663.
- [137] Yamaguchi N, Nasu M (1997): Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology* 83:43-52.
- [138] Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, Hagström A (1999): Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:4475-83.
- [139] Lebaron P, Servais P, Agogué H, Courties C, Joux F (2001): Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Appl Environ Microbiol* 67:1775-82.
- [140] Wang Y, Hammes F, Boon N, Chami M, Egli T (2009): Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *ISME J* 3:889-902.
- [141] Proctor CR, Besmer MD, Langenegger T, Beck K, Walser JC, Ackermann M, Bürgmann H, Hammes F (2018): Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *ISME Journal* 12:1344-1359.
- [142] SLMB (2012): Methodenschrift 333.1: Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie. *Schweizerisches Lebensmittelbuch*. Schweizer Bundesamt für Gesundheit, Bern.
- [143] Kötzsch S, Sinreich M (2014): Zellzahlen zum Grundwasser – Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. *Aqua & Gas* 94:14-21.
- [144] Ho J, Nocker A, Bendinger B, West S, Tiehm A (2020): Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien. Band 94, DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe, ISSN: 1434-5765.
- [145] Fuchsli HP, Kötzsch S, Keserue HA, Egli T (2010): Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry A* 77:264-74.
- [146] Epstein SS (2013): The phenomenon of microbial uncultivability. *Current Opinion in Microbiology* 16:636-642.
- [147] Hammes F, Egli T (2010): Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Anal Bioanal Chem* 397:1083-95.
- [148] Pronk M, Goldscheider N, Zopfi J (2005): Dynamics and interaction of organic carbon, turbidity and bacteria in a karst aquifer system. *Hydrogeol J* 14:473-484.
- [149] Besmer MD, Hammes F, Sigrist JA, Ort C (2017): Evaluating monitoring strategies to detect precipitation-induced microbial contamination events in karstic springs used for drinking water. *Frontiers in Microbiology* 8:2229.
- [150] Siebel E, Wang Y, Egli T, Hammes F (2008): Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drinking Water Engineering and Science* 1:1-6.
- [151] Van Nevel S, Koetzsch S, Proctor CR, Besmer MD, Prest EI, Vrouwenvelder JS, Knezev A, Boon N, Hammes F (2017): Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research* 113:191-206.
- [152] Hunkeler D, Goldscheider N (2006): Biozönosen im Grundwasser – Grundlagen und Methoden der Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften. *Umwelt-Wissen Nr 0603*, Bundesamt für Umwelt, Bern, pp 113.
- [153] Kötzsch S, Alisch S, Egli T (2012): Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben. *Schweizerisches Bundesamt für Gesundheit*, Bern.
- [154] Kavka GG, Kasimir GD, Farnleitner AH (2006): Microbiological Water Quality of the River Danube (Km 2581 – Km 15): Longitudinal Variation of Pollution as Determined by Standard Parameters. *Austrian Committee Danube Research/ IAD*, Vienna, Austria, pp. 415-42.

[155] Zibuschka F, Lindner G (2006): Studie über den Qualitätszustand der Trinkwassergüte in den Leitungsnetzen, Studie A und Studie B, Auftraggeber: NÖ Wasserwirtschaftsfonds, mit der Durchführung beauftragt durch das Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Gruppe Wasser, Abteilung Siedlungswasserwirtschaft.

ÖWAV-REGELWERK

Nähere Informationen zu den **Preisgruppen** und **Bezugsmöglichkeiten** finden Sie am Ende der Publikationsliste.

A) ÖWAV-Regelblätter

Abwassertechnik und Gewässerschutz

ÖWAV-Regelblatt 1	Abwasserentsorgung im Gebirge. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2000. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	Preisgruppe 3
ÖWWV-Regelblatt 2	Das Fachpersonal auf Abwasserreinigungsanlagen – Merksätze für Gemeinden und Abwasserverbände. 1978.	vergriffen
ÖWWV-Regelblatt 3	Hinweise für das Ableiten von Abwasser aus Schlachthanlagen und fleischverarbeitenden Betrieben in eine öffentliche Abwasseranlage. Überarb. Neuausgabe 1992.	Preisgruppe 1
ÖWAV-Regelblatt 4	Hinweise für das Einleiten von Abwasser aus Betrieben in eine öffentliche Kanalisationsanlage. 2., vollständige überarbeitete Auflage. 2001.	Preisgruppe 4
ÖWWV-Regelblatt 5	Richtlinien für die hydraulische Berechnung von Abwasserkanälen. 1980.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 6	Fremdüberwachung von biologischen Abwasserreinigungsanlagen. Teil 1: Fremdüberwachung gemäß 1. AEV für kommunales Abwasser. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 1998.	Preisgruppe 1
	Teil 2: Gesamtprüfung. 2000.	Preisgruppe 2
ÖWAV-Regelblatt 7	Mindestausrüstung für die Eigen- und Betriebsüberwachung biologischer Abwasserreinigungsanlagen (inkl. Indirekteinleiterüberwachung). 4., vollständig überarbeitete Auflage. 2003.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 8	Hinweise für das Einleiten von Abwasser aus oberflächenbehandelnden Betrieben in eine öffentliche Abwasseranlage oder einen Vorfluter. Neuausgabe 1993.	Preisgruppe 2
ÖWAV-Regelblatt 9	Richtlinien für die Anwendung der Entwässerungsverfahren. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2008.	Preisgruppe 2
ÖWWV-Regelblatt 10	Richtlinien für die Ausführung von Abwassermeßschächten. 1981.	vergriffen
ÖWAV-Regelblatt 11	Richtlinien für die abwassertechnische Berechnung und Dimensionierung von Abwasserkanälen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2009.	Preisgruppe 4
ÖWWV-Regelblatt 12	Hinweise für das Einleiten von Abwasser aus milchbe- und -verarbeitenden Betrieben in eine Abwasseranlage. 1982.	vergriffen
ÖWAV-Regelblatt 13	Betriebsdaten von Abwasserreinigungsanlagen – Erfassung, Protokollierung und Auswertung. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2013.	Preisgruppe 1
ÖWAV-Regelblatt 14	Sicherheit auf Abwasserreinigungsanlagen (Kläranlagen) – Errichtung – Anforderungen an Bau und Ausrüstung. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2010.	Preisgruppe 2
ÖWAV-Regelblatt 15	Der Klärfacharbeiter – Berufsbild, Ausbildungsplan und Prüfungsordnung. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2013.	Preisgruppe 1
ÖWAV-Regelblatt 16	Einleitung von Abwasser aus der Betankung, Reparatur und Reinigung von Fahrzeugen in öffentliche Abwasseranlagen oder in Gewässer. 4., vollständig überarbeitete Auflage. 2010.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 17	Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2004. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 18	Sicherheit auf Abwasserreinigungsanlagen (Kläranlagen) – Betrieb. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2014.	Preisgruppe 1
ÖWAV-Regelblatt 19	Richtlinien für die Bemessung von Mischwasserentlastungen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2007.	Preisgruppe 3

ÖWWV-Regelblatt 20	Musterbetriebsordnung für Abwasserreinigungsanlagen. 1988.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 21	Kanalkataster. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 1998.	<i>ersetzt durch ÖWAV-RB 40</i>
ÖWAV-Regelblatt 22	Betrieb von Kanalisationsanlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2015.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 23	Geruchsemissionen aus Abwasseranlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2015.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Regelblatt 24	EDV-Einsatz auf Abwasseranlagen. Prozessleittechnik – Prozessdatenverarbeitung. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2008.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 25	Abwasserentsorgung in dünn besiedelten Gebieten. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2010.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 26	Hinweise für das Einleiten von Abwässern aus Weinbau- und Kellereibetrieben in eine Abwasseranlage. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2006.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 27	Möglichkeiten der Entsorgung von Senkgrubeninhalten und Schlämmen aus Kleinkläranlagen. 1992.	<i>vergriffen</i>
ÖWAV-Regelblatt 28	Unterirdische Kanalsanierung. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2007.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 29	Entsorgung von Räumgut aus kommunalen Abwasseranlagen. 1994.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 30	Sicherheitsrichtlinien für den Bau und Betrieb von Faulgasbehältern auf Abwasserreinigungsanlagen. 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2007.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 31	Deponiesickerwasser. Reaktordeponie. 2000.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 32	Sicherheit auf Abwasserableitungsanlagen (Kanalisationsanlagen), Teil A: Errichtung – Anforderungen an Bau und Ausrüstung, Teil B: Betrieb. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2016.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 33	Überwachung wasserrechtlich nicht bewilligungspflichtiger Indirekteinleiter. 2002.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 34	Hochdruckreinigung von Kanälen. 2003. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 35	Einleitung von Niederschlagswasser in Oberflächengewässer. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2019.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 36	Dienstanweisung für das Betriebspersonal von Abwasserbehandlungsanlagen. Inkl. CD-ROM. 2003.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 37	Umgang mit Löschwasser. 2019.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 38	Überprüfung stationärer Durchflussmessenrichtungen auf Abwasserreinigungsanlagen. 2007.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 39	Einleitung von fetthaltigen Betriebsabwässern aus Gastronomie, Küchen und Lebensmittelverarbeitung in öffentliche Abwasseranlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2021.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 40	Leitungsinformationssystem – Wasser und Abwasser (gemeinsam mit ÖVGW, = ÖVGW-Richtlinie W 104). 2010. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Regelblatt 42	Unterirdische Kanalsanierung – Hauskanäle. 2011.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 43	Optische Kanalinspektion. 2013.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 44	Der Kanalfacharbeiter – Berufsbild, Ausbildungsplan und Prüfungsordnung. 2012.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Regelblatt 45	Oberflächenentwässerung durch Versickerung in den Untergrund. 2015.	<i>Preisgruppe 2</i>

Wasserhaushalt und Wasservorsorge

ÖWAV-Regelblatt 201	Praktische Anleitung für die Nutzung und den Schutz von Karstwasservorkommen. 2., überarbeitete Auflage. 2007.	<i>Preisgruppe 4</i>
---------------------	--	----------------------

ÖWWV-Regelblatt 202	Tiefengrundwässer und Trinkwasserversorgung. 1986.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWWV-Regelblatt 203	Trinkwassernetversorgung. 1989 (ersetzt durch ÖVGW-Regelblatt W 74, 2006).	<i>zurückgezogen</i>
ÖWWV-Regelblatt 204	Richtlinien für die Wasserversorgung im alpinen Bereich. 1990.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 205	Nutzung und Schutz von Quellen in nicht verkarsteten Bereichen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2017.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Regelblatt 206	Klein- und Einzeltrinkwasserversorgungsanlagen (gemeinsam mit ÖVGW). 1993.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 207	Thermische Nutzung des Grundwassers und des Untergrunds – Heizen und Kühlen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2009.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 208	Bohrungen zur Grundwassererkundung. 1993.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 209	Entscheidungshilfen für Planung, Anlage, Bau und Betrieb von Golfplätzen aus wasserwirtschaftlicher Sicht. 1993.	<i>vergriffen</i>
ÖWAV-Regelblatt 210	Beschneigungsanlagen. 2., überarbeitete Auflage. 2007.	<i>ersetzt durch ÖWAV-RB 221</i>
ÖWAV-Regelblatt 211	Nutzung artesischer und gespannter Grundwässer. 2000.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 212	Skipisten. 1999.	<i>ersetzt durch ÖWAV-RB 221</i>
ÖWAV-Regelblatt 213	Tiefbohrungen zur Wassergewinnung. 2002.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Regelblatt 214	Markierungsversuche in der Hydrologie und Hydrogeologie. 2007.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Regelblatt 215	Nutzung und Schutz von Thermalwasservorkommen. 2010.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Regelblatt 216	Die Umweltverträglichkeitsprüfung (UVP) von Golfplätzen aus wasserwirtschaftlicher Sicht. 2009.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 217	Schutz des Grundwassers beim Abbau von Sand und Kies. 2014.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 218	Brunnen in gespannten Grundwässern – Neuerrichtung, Sanierung und Rückbau. 2015.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Regelblatt 219	Tiefengrundwasserbewirtschaftung zum Zweck der Trinkwasserversorgung. 2018.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Regelblatt 220	Niederschlag-Abfluss-Modellierung. 2019.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Regelblatt 221	Skipisten und Betrieb von Beschneigungsanlagen. Überarbeitete Neufassung der ÖWAV-Regelblätter 210 und 212. 2022.	<i>Preisgruppe 3</i>

Wasserbau, Ingenieurbioogie und Ökologie

ÖWWV-Regelblatt 301	Leitfaden für den natur- und landschaftsbezogenen Schutzwasserbau an Fließgewässern. 2. Auflage 1985.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 302	Expertenliste Biologie des ÖWAV. 2., überarbeitete Auflage 1999.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 303	Gewässerwärter/in – Gewässermeister/in. Berufsbild, Ausbildungsplan und Prüfungsordnung. 2017.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Regelblatt 305	Verwendung und Verwertung von Sedimenten aus Wildbacheinzugsgebieten. 2019.	<i>Preisgruppe 4</i>

Qualität und Hygiene

ÖWAV-Regelblatt 401	Grundwasseruntersuchungen zur Beurteilung von altlastenverdächtigen Altablagerungen. 1992.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 402	Einfache Analysenverfahren auf Abfallbehandlungsanlagen. Teil 2: Eingangs-, Verfahrens- und Endproduktkontrolle auf Kompostierungsanlagen. 1999.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Regelblatt 403	Nutzwasserverwendung. Mitteilung über die Verwendung von Nutzwasser in Gebäuden, ausgenommen Industrielle Anwendungen. 1998 (ersetzt durch ÖVGW-Mitteilung W 86, 2005).	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Regelblatt 404	Sicherheit, Gesundheitsschutz und Arbeitshygiene für Beschäftigte in der Abfallwirtschaft. 2001.	<i>zurückgezogen</i>

ÖWAV-Regelblatt 405	Arbeitshygienische und arbeitsmedizinische Richtlinien für Abwasseranlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2016.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 406	Begriffe der Membrantechnologie. 2002.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 407	Empfehlungen für die Bewässerung. Überarbeitete Neuauflage des ÖWAV-Arbeitshefts Nr. 11 (2003). 2016.	Preisgruppe 2

Abfallwirtschaft und Altlastensanierung

ÖWAV-Regelblatt 501	Ermittlung des Kapazitätsbedarfs für Kompostanlagen zur Verarbeitung getrennt erfaßter biogener Abfälle. 1996.	vergriffen
ÖWAV-Regelblatt 502	Entgasung von Deponiekörpern. 1997.	Preisgruppe 2
ÖWAV-Regelblatt 503	Allgemeine Ausführungsrichtlinien für stationäre Problemstoffsammelstellen. 1997.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 504	Deponieeingangskontrolle. Anforderungsprofil für Leiter der Eingangskontrolle und Kontrollpersonal, Ausbildungsplan. 1997.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 505	Einfache Analysenverfahren auf Abfallbehandlungsanlagen. Teil 1: Eingangskontrolle auf Deponien. 1997.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 506	Das Fachpersonal für Problemstoffsammelstellen. Anforderungsprofil und Ausbildungsplan. 1997.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 507	Fachkraft Abfallwirtschaft. Anforderungen an die Ausbildung des Betriebspersonals von Abfallbehandlungsanlagen. 1998.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 508	Musterbetriebsprotokoll für Bioabfallkompostierungsanlagen. 1998.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 509	Abfallminimierung. Begriffe – Evaluierung – Berechnungsbeispiele. 2000.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 510	Problemstoff-Ausbildungslehrgänge. Ausbildung zum Befugten für die Problemstoffsammlung bzw. zum Abfallrechtlichen Geschäftsführer für kommunale Problemstoffsammlung. 1999.	zurückgezogen
ÖWAV-Regelblatt 511	Durchführung der Eingangskontrolle auf Deponien. 3., überarbeitete Auflage. 2015. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 512	Abfallrechtlicher Geschäftsführer gemäß § 26 AWG 2002. Anforderungen und Ausbildungsinhalte für abfallrechtliche Geschäftsführer und Erlaubniswerber. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2008.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 513	Betrieb von Biofiltern. 2002.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 514	Die Anwendung der Stoffflussanalyse in der Abfallwirtschaft. 2003.	Gratisdownload
ÖWAV-Regelblatt 515	Anaerobe Abfallbehandlung. Anforderungen an den Betrieb von Biogasanlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2013.	Preisgruppe 4
ÖWAV-Regelblatt 516	Ausbildungskurs für das Betriebspersonal von Biogasanlagen. Anforderungen und Ausbildungsinhalte. 2., überarbeitete Auflage. 2022.	Gratisdownload
ÖWAV-Regelblatt 517	Anforderungen an die Ausstattung und den Betrieb von Abfallzwischenlagern erlaubnispflichtiger Abfallsammler gemäß § 24a AWG 2002. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2019.	Preisgruppe 4
ÖWAV-Regelblatt 518	Anforderungen an den Betrieb von Kompostierungsanlagen. 2009. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 519	Energetische Wirkungsgrade von Abfallverbrennungsanlagen. 2., überarbeitete Auflage. 2013.	Preisgruppe 3
ÖWAV-Regelblatt 520	Durchführung der Eingangskontrolle auf Bodenaushubdeponien. Auszug aus ÖWAV-Regelblatt 511 (3. Auflage, 2015). 2., überarbeitete Auflage. 2015.	Preisgruppe 2
ÖWAV-Regelblatt 521	Ausbildungsinhalte für die Qualifikation zur Sammlung und Behandlung nicht gefährlicher Abfälle. 2021.	Preisgruppe 2

B) ÖWAV-Arbeitsbehelfe

Abwassertechnik und Gewässerschutz

ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 1	Die Ausbildung von Klärwärtern auf Lehrkläranlagen. 1981.	<i>vergriffen</i>
ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 8	Kläranlagennachbarschaften in Österreich – Ein Beitrag zur Reinhaltung der Gewässer. 1991.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 9	Kennzahlen für Abwasserreinigungsanlagen. Teil 1: Ablaufqualität – Bewertung und Beurteilung. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2000.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 14	Eigen- und Betriebsüberwachung von biologischen Abwasserreinigungsanlagen (> 50 EW). 3., vollständig überarbeitete Auflage. 2010.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 22	Kläranlagenzustandsbericht. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2015.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 24	Evaluierung von Arbeitsplätzen in Abwasseranlagen und deren Dokumentation. 2000.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 25	Indirekteinleiterkataster. 1999.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 27	Praktikum auf Lehrkanalanlagen (Ausbildungskanalbetrieben). 2000.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 29	Öffentlichkeitsarbeit auf Kläranlagen (inkl. Arbeitsmaterialien für Pflichtschulen). 2004.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 31	Membrantechnologie – Verfahren zur Abwasserbehandlung. 2003.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 34	Leitfaden für die Ausschreibung der Hochdruckreinigung von Kanälen. 2005. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 36	Praxishilfe zum Erstellen des Explosionsschutzdokuments (ExSD) für Abwasseranlagen (Kanal- und Kläranlagen). 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2021.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 37	Überprüfung des Betriebszustandes von Abwasserreinigungsanlagen (> 50 EW) Teil A: Fremdüberprüfung. Teil B: Eigenüberprüfungen. 2010.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 45	Musterstellenbeschreibungen für das Personal von Kanalisations- und Abwasserreinigungsanlagen. 2014. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 50	Kanalsanierung – Vor Ort härtendes Schlauchlining. 2017. (<i>Printversion vergriffen, nur mehr digital erhältlich.</i>)	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 54	Kanalsanierung – Langrohr-Lining, Kurzrohr-Lining, Verformte Rohre. 2019.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 62	Leitfaden zur Umsetzung des ÖWAV-Regelblattes 19 „Richtlinien für die Bemessung von Mischwasserentlastungen“. 2020.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 65	Energetische Nutzung des thermischen Potenzials von Abwasser. 2021.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 67	Sicherheit von Informations-Kommunikationssystemen (IKT) in der Abwasserentsorgung. 2022	<i>Preisgruppe 3</i>

Wasserhaushalt und Wasservorsorge

ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 2	Grundwasser-Schongebiete. 1984.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 3	Wasserwirtschaftliche Gesichtspunkte für die Projektierung von Grundwasserwärmepumpenanlagen (GWPA). 1986.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 19	Leitfaden für die Bearbeitung von Grundwassersanierungsgebieten. 1996.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 43	Leitfaden zur Anwendung der Thermalfahnenformel des ÖWAV-Regelblatts 207. 2014.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 47	Bodenfunktionen für die Wasserwirtschaft. 2016.	<i>Preisgruppe 3</i>

Wasserbau, Ingenieurbiologie und Ökologie

ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 4	Grundsätze der Gewässerinstandhaltung. 1987.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 42	Mobiler Hochwasserschutz. 2013.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 46	Praktische Umsetzung und Beispiele des Fischaufstiegshilfen-Leitfadens. Teil 1: Vorschläge für zulässige Bautoleranzen bzw. zulässige Variation der technischen Parameter bei errichteten FAHs. 2016.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 49	Neophytenmanagement. Behandlung invasiver gebietsfremder Pflanzenarten. 2016.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 53	Zustandsermittlung von Hochwasserschutzdämmen als Grundlage für die Sanierung. 2017.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 56	Wartung von Fischaufstiegshilfen. 2020.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 63	Holz in und an Fließgewässern – Wildholzmanagement. 2021.	<i>Preisgruppe 4</i>

Qualität und Hygiene

ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 11	Empfehlungen für Bewässerungswasser. 2., überarbeitete Auflage. 2003. [ersetzt durch ÖWAV-Regelblatt 407]	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 30	Informationen zum Membranbelebungsverfahren. 2002.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 32	Anwendung von Membranverfahren in der Reinwassertechnologie. 2005.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 38	Bestimmung der Oberflächenspannung in gereinigten Abwässern. 2., überarbeitete Auflage. 2016.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 39	Korrosion im Wasser- und Abwasserfach. 2010.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 52	Mikrobiologie und Wasser. Teil 1: Übersicht zu den methodischen Möglichkeiten der Analyse. 2017. Teil 2: Fallstudien zur Illustration der neuen diagnostisch-analytischen Möglichkeiten. 2022.	<i>Preisgruppe 3</i> <i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 68	Ergänzungen zur ÖNORM EN ISO 9562:2004 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung adsorbierbarer organisch gebundener Halogene (AOX). 2021.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 69	Aufbereitungsmaßnahmen für Grund-, Quell- und Oberflächenwasser – Ein Überblick. 2022.	<i>Gratisdownload</i>

Recht und Wirtschaft

ÖWAV-Arbeitsbehelf 5	Mustersatzungen für Hochwasserschutzverbände. 4., überarbeitete Auflage. 2020.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWWV-Arbeitsbehelf Nr. 6	Grundlagen und Organisation des Rechnungswesens von Abwasserverbänden. 1988.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 7	Grundsätze für die Versicherungen von Abwasserentsorgungsanlagen. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2019.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 10	Interkommunale Zusammenarbeit – Betriebs- und Betreuungsgemeinschaften in der Abwasserentsorgung. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2011.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 12	Grundlagen und Organisation des Rechnungswesens von Wasserversorgungs- und Abfallverbänden. Ergänzungsband zum Arbeitsbehelf Nr. 6. 1993.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 13	Mustersatzungen für Wasserversorgungs- und Abwasser-/Reinhalungsverbände. 3., überarbeitete Auflage. 2016.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 15	Mustersatzungen für Abfallwirtschaftsverbände. 1996.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 16	Grundsätze der Gebührenkalkulation in der Siedlungswasser- und Abfallwirtschaft. 1996.	<i>zurückgezogen</i>

ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 18	Musterbetriebskostenrechnung am Beispiel der Abwasserentsorgung. 1996.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 20	Anwendung des UVP-Gesetzes. 1996.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 21	Abfallgebührenkalkulation und Abfallgebührenmodelle. Ein Arbeitsbehelf für Gemeinden. 1997.	<i>vergriffen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 23	Geschäftsbedingungen für die Indirekteinleitung in öffentliche Kanalisationsanlagen. 2., überarbeitete Auflage. 2002.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 28	Grundlagen und Organisation des Rechnungswesens von Ver- und Entsorgungsverbänden. 2000.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 33	Leitfaden für die Auftragsvergabe in der Wasser-, Abwasser- und Abfallwirtschaft. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2015.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 35	Aktuelle Finanzierungs- und Veranlagungsmöglichkeiten für die Wasser-, Abwasser- und Abfallwirtschaft. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2011.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 40	Grundlagen und Aufbau des Rechnungswesens in der Abwasserentsorgung. Buchführung und Jahresabschluss. 2010.	<i>ersetzt durch ÖWAV-AB 61 & 64</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 41	Grundlagen und Aufbau der Kosten- und Leistungsrechnung in der Abwasserentsorgung. 2013.	<i>ersetzt durch ÖWAV-AB 61 & 64</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 48	Grundlagen und Aufbau einer Gebührenkalkulation in der Abwasserentsorgung. 2016.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 59	Mustergeschäftsordnung für Wasser- und Abwasser-/Reinhaltsverbände. 2019.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 61	VRV in der Abwasser-, Abfall- und Schutzwasserwirtschaft. 2018.	<i>Preisgruppe 4</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 64	Kosten- und Leistungsrechnung in der Abwasser-, Abfall- und Schutzwasserwirtschaft. 2021.	<i>Preisgruppe 3</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 66	Gebührenkalkulation in der Abfallwirtschaft – Gebührenmodelle. 2021.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 70	Ökologische Beschaffung. 2022.	<i>Preisgruppe 3</i>

Abfallwirtschaft und Altlastensanierung

ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 17	Logistik in der Abfallwirtschaft. 1996.	<i>zurückgezogen</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 44	Herstellung von Komposterden (Mischungen aus Kompost und Bodenaushubmaterial). 2014.	<i>Preisgruppe 1</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 51	Leitfaden: Eingangskontrolle für Recycling-Betriebe zur Herstellung von Recycling-Baustoffen gemäß Recycling-Baustoffverordnung und Bundes-Abfallwirtschaftsplan 2017. 2019.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 57	Sammlung und Verwertung von Metallspänen, -schlämmen und -stäuben aus der mechanischen Bearbeitung. 2018.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 58	Verwertung von unbehandeltem Altholz – Abfall, Abfallende, Nebenprodukt. 2019.	<i>Preisgruppe 2</i>
ÖWAV-Arbeitsbehelf 60	Leitfaden zur Altholzsortierung. 2018.	<i>Gratisdownload</i>

Umweltschutz allgemein

ÖWAV-Arbeitsbehelf Nr. 26	Anwendung EDV-gestützter Modellrechnung im Umweltschutz. 2000.	<i>zurückgezogen</i>
---------------------------	--	----------------------

WEITERE ÖWAV-PUBLIKATIONEN

Informationsreihe Betriebspersonal Abwasseranlagen

Folge 1 (1992/93) bis Folge 25 (2017)		<i>vergriffen</i>
Folge 26	Kanal- und Kläranlagen-Nachbarschaften 2018. 2018.	<i>Preisgruppe 5</i>
ab Folge 27/2019	<i>nur mehr für KAN-Teilnehmer</i>	

ÖWAV-Merkblätter

ÖWAV-Merkblatt	Befahren (Ein- und Aussteigen) von Behältern, Schächten, Kanälen, Düchern und dgl. und Durchführen von Arbeiten in solchen Einrichtungen (§§ 59, 60 Allgemeine Arbeitnehmerschutzverordnung). 2019.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Herstellung von Recycling-Baustoffen gemäß Bundes-Abfallwirtschaftsplan 2017. 2021.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Hygiene-Merkblatt für das Betriebspersonal von Abwasseranlagen. 2017.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Mindestanforderung für die Sicherheitsausrüstung im Kanalbetrieb. 2016.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Nutzwassersysteme in Gebäuden mit Trinkwasserversorgung – Getrennte Leitungen. 2021.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	ÖPUL – Landwirtschaftliche Klärschlammverwertung. Merkblatt für Landwirte und Kläranlagenbetreiber. 2000.	<i>vergriffen</i>
ÖWAV-Merkblatt	Personalbedarf für den Betrieb kommunaler biologischer Kläranlagen. 3. Auflage. 2019.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Private Hallen- und Freischwimmbäder – Ableitung von Spül-, Reinigungs- und Beckenwasser. 2011.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Probenvorbereitung – Arbeitsanleitung zur Durchführung von Abwasseranalysen auf kommunalen Kläranlagen im Rahmen der Eigenüberwachung. 2020.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Rufbereitschaftsdienste für kommunale Abwasseranlagen (Kanalisations- und Kläranlagen). 2011.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Schadstoffausbreitung im Kanalnetz – Kooperation mit Einsatzkräften. 2015.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Merkblatt	Zivil-, verwaltungs- und justizstrafrechtliche Haftung und Verantwortung in Wasser- und Abfallverbänden. 2., vollständig überarbeitete Auflage. 2021.	<i>Gratisdownload</i>

ÖWAV-Umweltmerkkblätter

(zuvor als ÖWAV-WIFI-Umweltmerkkblätter erschienen)

ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Autobus-, Taxi- und Mietwagenunternehmen. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Autoverwertungsbetriebe. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Betreiber von Campingplätzen. 2005.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Frächter. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Gastronomie- und Beherbergungsbetriebe. 2009.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Holz bearbeitende Betriebe. 2005.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Kfz-Freiwashplätze und Waschanlagen. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Kfz-Werkstätten. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für kleine Molkereien und Käsereien. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für kleine Schlachtbetriebe und Fleischer. 2005.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für die Lagerung von Chemikalien in Betrieben. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Lkw-Washplätze. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Malerbetriebe. 2017.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Metall verarbeitende Betriebe. 2011.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkkblatt für Sägewerke. 2005.	<i>Gratisdownload</i>

ÖWAV-Umweltmerkblatt für Tankstellen. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkblatt für temporär betriebene Nassholzlager. 2016.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkblatt Umweltschutz im Bürobetrieb. 2010.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkblatt für Weinbau und Weinkellereien. 2004.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkblatt Vereinfachte bautechnische Verwertung von Kleinmengen an mineralischen Baurestmassen vor Ort. 2018.	<i>Gratisdownload</i>
ÖWAV-Umweltmerkblatt Wasserwirtschaft und Gewässerschutz auf Baustellen. 2008.	<i>Gratisdownload</i>

Übersicht über die Preisgruppen

Die angegebenen Preise verstehen sich netto zuzügl. USt. (+ Versand, nur bei Printpublikationen)
(Die Preisliste ist **gültig bis 31. Dezember 2022**. Preisänderungen und Irrtümer vorbehalten.)

Preisgruppen	Preis Download ÖWAV-Mitglied	Preis Download Nichtmitglied	Preis Print ÖWAV-Mitglied	Preis Print Nichtmitglied
Preisgruppe 1	16,00 Euro	27,00 Euro	21,00 Euro	32,00 Euro
Preisgruppe 2	21,00 Euro	32,00 Euro	26,00 Euro	37,00 Euro
Preisgruppe 3	26,00 Euro	37,00 Euro	31,00 Euro	42,00 Euro
Preisgruppe 4	31,00 Euro	42,00 Euro	36,00 Euro	47,00 Euro
Preisgruppe 5			51,00 Euro	62,00 Euro

Bezugsmöglichkeiten

Die genannten Publikationen sind erhältlich bei:

Österreichischer Wasser- und Abfallwirtschaftsverband (ÖWAV), Marc-Aurel-Straße 5, 1010 Wien, Tel. 01/535 57 20,
www.oewav.at/publikationen

Austrian Standards plus GmbH, 1020 Wien, Heinestraße 38, Tel. 01/21300-444, www.austrian-standards.at

NOTIZEN



zukunft
SEIT 1909
denken

Österreichischer Wasser- und Abfallwirtschaftsverband

Gegründet 1909

1010 Wien, Marc-Aurel-Straße 5

Tel. +43-1-535 57 20, Fax +43-1-535 40 64, buero@oewav.at, www.oewav.at

Das österreichische **Kompetenz-Zentrum**
für **Wasser-, Abwasser- und Abfallwirtschaft.**

Veranstaltungen

- Österreichische Abfallwirtschaftstagung
- Österreichische Wasserwirtschaftstagung
- Österreichische Umweltrechtstage
- Seminare und Fortbildungskurse zu aktuellen Themen der Wasser- und Abfallwirtschaft
- Erfahrungsaustausch für Betreiber von Abfallbehandlungsanlagen
- Kurse für das Betriebspersonal von Abwasseranlagen, Praktikum auf Lehrklär- und Lehrkanalanlagen, Kanal- und Kläranlagen-Nachbarschaften
- Kurse für das Betriebspersonal von Abfallbehandlungsanlagen
- Kurse in den Bereichen Gewässerpflege, kleine Stau- und Sperrenanlagen, Hochwasserschutz- und Beschneigungsanlagen, Wildbachaufsicht und Neophytenmanagement
- Kurse in den Bereichen Recht & Wirtschaft
- Gemeinsame Veranstaltungen mit in- und ausländischen Fachorganisationen
- Exkursionen

Fachgruppen und Arbeitsausschüsse

- Ausarbeitung von Regelblättern, Arbeitsbehelfen und Merkblättern
- Erarbeitung von ExpertInnen-, Positions- und Ausschusspapieren sowie Stellungnahmen zu Gesetzesvorhaben

Beratung und Information

- Auskünfte und individuelle Beratung
- Wasser- und abfallwirtschaftliche Informationsschriften und Beiträge, Öffentlichkeitsarbeit

Veröffentlichungen

- Fachzeitschrift „Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft“ (ÖWAW)
- ÖWAV-Homepage (www.oewav.at)
- ÖWAV-News (HTML-Newsletter)
- Tätigkeitsbericht des ÖWAV
- Veröffentlichungen zu Tagungen und Seminaren des ÖWAV
- Regelblätter^{*)}, Arbeitsbehelfe^{*)} und Merkblätter des ÖWAV, Positions- und Ausschusspapiere
- Informationsreihe Betriebspersonal Abwasseranlagen^{*)}
- ÖWAV-WKO-Umweltmerkblätter für Gewerbebetriebe
- KA-Betriebsinfo¹⁾
- Wiener Mitteilungen Wasser-Abwasser-Gewässer¹⁾

Verbindungsstelle (Nationalkomitee) der

- European Water Association – EWA

Mitglied der österreichischen Vertretung zur

- European Union of National Associations of Water Suppliers and Waste Water Services – EurEau (gem. mit ÖVGW)
- International Solid Waste Association – ISWA
- International Water Association – IWA (gem. mit ÖVGW)

^{*)} in Kommission bei Austrian Standards plus GmbH, Wien

¹⁾ Mitherausgeber

