

Untersuchung ausgewählter pathogener und fakultativ pathogener Bakterien in der Ruhr

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Marina Horstkott
geboren in Bottrop

Fakultät für Chemie - Biofilm Centre
der
Universität Duisburg-Essen

2022

Die vorliegende Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert und von Februar 2012 bis März 2015 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans-Curt Flemming am Biofilm Centre der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Datum der Disputation: 17.05.2022
Gutachter: Prof. Dr. Hans-Curt Flemming
PD. Dr. Georg-Joachim Tuschewitzki
Vorsitzender: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN
Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76879
URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221125-104611-2

Alle Rechte vorbehalten.

Highlights

- Das Vorkommen unterschiedlicher **wasserassoziierter, bakterieller** Krankheitserreger wurde in der Ruhr nachgewiesen:
 - **Aeromonaden** konnten **zu jedem Zeitpunkt in hohen Konzentrationen** ($> 10^3$ KBE/100 mL) nachgewiesen werden. Es war eine Saisonalität mit tendenziell höheren Konzentrationen in den warmen Monaten zu beobachten.
 - ***Pseudomonas aeruginosa*** wurde in der **Mehrzahl** der untersuchten Wasserproben in **geringen bis mäßig hohen Konzentrationen** ($< 10^2$ KBE/100 mL) gefunden.
 - ***Campylobacter spp.*** und ***Salmonella spp.*** wurden sporadisch in meist geringen Konzentrationen nachgewiesen. Es war eine Saisonalität mit höheren Nachweisraten und Gehalten im Herbst bzw. Winter zu beobachten.
 - ***Legionella spp.*** konnte lediglich in einer von 60 Proben kulturell nachgewiesen werden. Mit molekularbiologischen Methoden konnten wesentlich höhere Konzentrationen mit einem stark schwankenden Anteil vitaler Zellen ermittelt werden.
- Der **Vergleich mit epidemiologischen Studien** zeigt, dass bei einer Exposition von Haut -und Schleimhäuten sowie Aspiration das **Risiko einer Infektion durch *Aeromonas spp.*** vor allem bei hohen Konzentrationen gegeben ist.
- Die Exposition gegenüber ***P. aeruginosa*** in Konzentrationen, die mit denen der Ruhr vergleichbar sind, konnte in der Vergangenheit mit **Ausbruchsfällen von Ohrinfektionen** (Otitis externa) in Verbindung gebracht werden.
- Mittels quantitativer mikrobiologischer Risikobewertung (QMRA) wurde **das Risiko einer Gastroenteritis von 0,9 % (Erwachsene) bzw. 1,8 % (Kinder) durch *Campylobacter spp.*** Und **$\geq 0,08$ % (Erwachsene) bzw. $\geq 0,2$ % (Kinder) durch *Salmonella spp.*** pro 45 min Badezeit zum Zeitpunkt **der höchsten Konzentration** kalkuliert.
- Es war eine **Anreicherung** der fakultativen Pathogene *Aeromonas spp.* und *P. aeruginosa* in **Sedimenten und Biofilmen** zu beobachten. Bei einer Mobilisierung kann es daher zu einer schlagartigen Freisetzung hoher Dosen kommen, die bei den gängigen Monitoringstrategien der Wasserphase nicht erfasst werden.
- Die Badegewässerrichtlinie sieht bei sehr hohen Konzentrationen der Indikatorbakterien ein **zeitweiliges Badeverbot** vor. Während dieser zeitweiligen Verbote gab es eine **Tendenz höherer Gehalte** der untersuchten Pathogene. Jedoch konnten, **auch wenn diese Kriterien nicht erfüllt waren, vereinzelt hohe Spitzenwerte** einiger bakterieller Erreger verzeichnet werden.
- Bei Nutzung der Ruhr als Rohwasser konnten die ausgewählten Bakterien innerhalb des anschließenden **Trinkwasseraufbereitungsprozesses** bereits nach den **ersten Reinigungsstufen kulturell nicht mehr nachgewiesen** werden. Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft, ist von einer ausreichenden Elimination durch die Kombination der unterschiedlichen Verfahren auszugehen.

Zusammenfassung

In der Ruhr war das Baden für lange Zeit verboten, mittlerweile gibt es ein verstärktes Interesse, diesen Fluss zum Baden und für andere Freizeitaktivitäten zu nutzen. Hieraus ergibt sich ein potenzielles Gesundheitsrisiko, da mikrobiologische Pathogene in der Ruhr vorkommen und beim Baden zu Infektionen führen können. Eine Beurteilung der hygienischen Qualität erfolgt nach aktuell gültigen gesetzlichen Vorgaben anhand der Gehalte der Indikatororganismen *E. coli* und intestinalen Enterokokken über mehrere Badesaisons. Das Verbundprojekt „Sichere Ruhr“ befasst sich mit mikrobiologischen Risiken, die durch die Nutzung der Ruhr als Freizeit- und Badegewässer sowie als Trinkwasserreservoir entstehen. Diese Arbeit ist Teil dieses Verbundprojektes.

Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung bestimmter bakterieller Pathogene über einen repräsentativen Zeitraum, die Abschätzung von Erkrankungsrisiken mittels Daten aus epidemiologischen Untersuchungen und die Einordnung der Ergebnisse in Bezug auf das aktuelle Beurteilungskonzept der hygienischen Wasserqualität.

Über einen Zeitraum von 18 Monaten wurden in 14-tägigen Abstand Ruhrwasserproben entnommen und mit kulturellen Verfahren hinsichtlich der Zielorganismen *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. untersucht. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben hinsichtlich des Vorkommens von *Legionella* spp. überprüft, hierbei wurden kulturelle und molekularbiologische Verfahren angewandt.

Es wurden drei Proben von Flusssediment und epilithischen Biofilmen entnommen und ebenfalls mittels kultureller Verfahren hinsichtlich der Zielorganismen untersucht. Außerdem wurden Proben aus den Aufbereitungsstufen eines Ruhr-abhängigen Wasserwerks entnommen und mittels kultureller Verfahren die Reduktionsleistung der Zielorganismen bestimmt.

Anhand einer Literaturrecherche wurden Anhaltspunkte für eine gesundheitliche Risikoabschätzung für die einzelnen Zielorganismen gesammelt und auf die gemessenen Konzentrationen übertragen. Mittels dieser Risikoabschätzung wurde das Konzept der Nutzung von Indikatororganismen zur Abschätzung des Gesundheitsrisikos evaluiert.

Alle ausgewählten bakteriellen Pathogene konnten im Ruhrwasser nachgewiesen werden.

Aeromonas spp. konnten in jeder Wasserprobe in Konzentrationen von $2,3 \times 10^3$ KBE/100 mL bis $7,7 \times 10^5$ KBE/100 mL mit einem Median von $2,1 \times 10^4$ KBE/100 mL nachgewiesen werden. In den warmen Monaten zeigten sich tendenziell höhere Konzentrationen. Zum Nachweis von *Aeromonas* spp. erwies sich eine Membranfiltrationsmethode unter Verwendung von Ampicillin-Dextrin-Agar als geeignet. Innerhalb von epilithischen Biofilmen und im Sediment wurde eine deutliche Anreicherung von *Aeromonas* spp. beobachtet

P. aeruginosa konnte nicht in allen Proben nachgewiesen werden. Die Konzentration betrug im Median 1,6 MPN/100 mL, einige Proben zeigten Konzentrationen oberhalb der Quantifizierungsgrenze von 360 MPN/100 mL. Eine Membranfiltration auf CN-Agar nach DIN EN ISO 16266:2008 und eine Flüssiganreicherungsmethode nach DIN 38411-8:1982 lieferten hierbei vergleichbare Ergebnisse. Alternative Verfahren mittels MPN-Methode (Pseudalert®-System) oder mittels Membranfiltration unter Verwendung von RAPID*P.aeruginosa*-Agar sollen die Untersuchungszeit auf einen Tag verkürzen, zeigten sich bei der Anwendung mit Oberflächenwasser mit starker Begleitflora als nicht geeignet. Eine Anreicherung dieses Bakteriums in Sedimenten und epilithischen Biofilmen war nachweisbar.

Campylobacter spp. und *Salmonella* spp. wurden sporadisch in Konzentrationen bis zu 15 MPN/100 mL (*Campylobacter*) bzw. ≥ 37 MPN/100 mL (Salmonellen) gefunden. Es war eine Saisonalität mit höheren Nachweisraten und Gehalten im Herbst bzw. Winter zu beobachten. Beide Gattungen waren in Biofilmen nicht oberhalb der Nachweisgrenze 310 MPN/100 g FG messbar.

Legionella spp. konnte kulturell in einer von 60 Oberflächenwasserproben mit 83 KBE/100 mL nachgewiesen werden, mittels qPCR gelang der Nachweis von *Legionella* spp. in allen Proben. Die mittels qPCR ermittelten Konzentrationen lagen zwischen 700 GU/100 mL und 140.000 GU/100 mL mit einem Median von 36.000 GU/100 mL. Die Spezies *Legionella pneumophila* war in 26 von 60 untersuchten Proben in Konzentrationen bis zu 18.000 GU/100 mL nachweisbar. Der ermittelte Anteil vitaler Zellen von *Legionella* spp. lag im Untersuchungszeitraum zwischen 3 % und 89 % (Median 18 %). Von der Spezies *L. pneumophila* konnten keine vitalen Zellen nachgewiesen werden.

Innerhalb des Prozesses der Trinkwasseraufbereitung konnten *P. aeruginosa*, *Campylobacter* spp. und Salmonellen bereits nach der ersten Stufe (Langsamsandfiltration) nicht mehr nachgewiesen werden, für *Aeromonas* spp. zeigte sich nach dieser Aufbereitungsstufe eine Reduktion der Keimzahlen um 2 bis 3 log-Stufen. Nach Abschluss der Trinkwasseraufbereitung waren alle Zielorganismen nicht mehr nachweisbar.

Für *Aeromonas* spp. sind in der Literatur Infektionen durch Wasserkontakt mit Haut und Schleimhäuten oder durch Aspiration von belastetem Wasser beschrieben. Eine quantitative Abschätzung des Risikos einer Infektion ist anhand der Literatur nicht möglich.

In der Literatur wurden Infektionen durch *P. aeruginosa* bei Konzentrationen, die auch in der Ruhr gemessen wurden, beschrieben. Ursächlich ist das Eindringen des Bakteriums in aufgeweichte oder verletzte Haut, dieser Mechanismus ist bei Entzündungen des äußeren Gehörgangs von Bedeutung.

Für *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. wurde anhand der Literatur eine quantitative Risikoabschätzung vorgenommen. Das Erkrankungsrisiko am Tag der höchsten im Untersuchungszeitraum gemessenen Konzentration an *Campylobacter* spp. beträgt 0,9 % für Erwachsene und 1,8 % für Kinder bei einer Badezeit von 45 min. Mit der gleichen Berechnungsgrundlage konnten bei *Salmonella* spp. Erkrankungsrisiken von $\geq 0,08$ % für Erwachsene und $\geq 0,2$ % für Kinder ermittelt werden.

Tendenziell waren die Konzentrationen der untersuchten Zielorganismen insbesondere in den Zeiten erhöht, in denen auch erhöhte Konzentrationen der Indikatororganismen *E. coli* und intestinale Enterokokken nachweisbar waren, die ein zeitweiliges Badeverbot bedingt hätten. Einige hohe Spitzenwerte bei den Zielorganismen traten aber auch bei geringeren Konzentrationen der Indikatoren auf.

Bei *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas* spp. bewirkt die Anreicherung innerhalb von Biofilmen, dass auch bei niedrigen Konzentrationen im Oberflächenwasser erhöhte Expositionen gegenüber diesen Organismen bei Kontakt mit diesen Biofilmen möglich sind. Zwar konnten *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. nicht in Biofilmen nachgewiesen werden, dennoch kann aufgrund der hohen Nachweisgrenzen der Organismen in dieser Matrix deren Vorkommen nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Trinkwasseraufbereitung ist von einer ausreichenden Eliminierung der untersuchten Pathogene auszugehen.

Insgesamt zeigte sich, dass ein Frühwarnsystem bezogen auf hohe Gehalte von Indikatorbakterien auch das Risiko einer hohen Exposition gegenüber anderen Pathogenen im Oberflächenwasser verringern kann. Die Exposition gegenüber Pathogenen in Biofilmen kann nicht ausreichend über die Messung von Indikatororganismen im Oberflächenwasser abgeschätzt werden.

Die Erprobung eines semikontinuierlichen Messverfahrens und einer PCR-basierten Schnelltestmethode zeigte, dass diese die Konzentrationen der Indikatorbakterien nicht zuverlässig abbilden konnten. Innerhalb des Verbundprojektes wurde jedoch ein Frühwarnsystem zur Vorhersage einer schlechten Wasserqualität auf Basis von Niederschlagsdaten entwickelt.

Summary

While bathing was prohibited in the River Ruhr for an extended period, there is now a growing interest in use of the river for bathing and further water sports. This poses a potential risk to health because of infections due to microbial pathogens present within the River Ruhr. Assessment of hygienic quality conforming to current regulations is based on concentrations of indicator organisms *E. coli* and intestinal enterococci comprising multiple bathing seasons. The joint project “Sichere Ruhr/Safe Ruhr“ approaches microbiological risks as a result of the River Ruhr used for recreational and bathing activities as well as source for drinking water production. This thesis is associated to the joint project. Quantification of selected bacterial pathogens over a representative period as well as assessment of illness using epidemiologic data and evaluation of hygienic quality in reference to current concepts are aims of this thesis.

Water samples of the River Ruhr were collected bi-weekly for 18 months. The target organisms *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. were analysed via culture based methods. Part of the samples were additionally screened for *Legionella* spp. applying culture based and molecular methods

Also, three samples of the river sediment and epilithical biofilms were taken for analysis of target organisms via culture-based methods. Additionally, samples within the process of drinking water treatment were obtained from a plant at the River Ruhr. The reduction factors of the target organisms were also determined by means of cultural methods.

Based on a literature search, indications for a health risk assessment for the individual target organisms were established and transferred to the measured concentrations. The calculated health risks were used to evaluate the concept of indicator organisms for risk assessment.

All selected bacterial pathogens were found in the water of the River Ruhr.

Aeromonas spp. could be detected in each water sample in concentrations of 2.3×10^3 CFU/100 mL to 7.7×10^5 CFU/100 mL with a median of 2.1×10^4 CFU/100 mL. In the warm months, higher concentrations tended to appear. For analysis of *Aeromonas* spp., a membrane filtration method using ampicillin dextrin agar proved to be suitable. Within epilithic biofilms and in sediment, an accumulation of *Aeromonas* spp. was observed.

P. aeruginosa could not be detected in all samples. The median concentration was 1.6 MPN/100 ml, some samples showed concentrations above the limit of quantification (360 MPN/100 mL). Membrane filtration on CN agar according to DIN EN ISO 16266:2008 and a liquid enrichment method according to DIN 38411-8:1982 provided comparable results. Alternative methods by MPN technique (Pseudalert® system) or by membrane filtration using RAPID^{P.aeruginosa} agar are intended to shorten the examination time to one day but were not suitable when used with surface water with strong accompanying flora. An accumulation of this bacterium in sediments and epilithic biofilms was detectable.

Campylobacter spp. and *Salmonella* spp. were sporadically found in concentrations up to 15 MPN/100 mL (*Campylobacter*) and ≥ 37 MPN/100 mL respectively (*Salmonella*). A seasonality was observed with higher detection rates and levels in autumn and winter. Both genera were not measurable in biofilms above the limit of detection (310 MPN/100 g wet weight).

Legionella spp. could only be detected in one of 60 surface water samples by applying culture-based methods in a concentration of 83 CFU/100 mL. Via qPCR the detection of *Legionella* spp. was possible in all samples. The concentrations determined by qPCR ranged from 700 GU/100 mL to 140,000 GU/100 mL with a median of 36,000 GU/100 mL. The species *Legionella pneumophila* was found in 26 of the 60 samples examined in concentrations up to 18,000 GU/100 mL. The determined

proportion of vital cells of *Legionella* spp. varied between 3 % and 89 % (median 18 %). No vital cells of the species *L. pneumophila* could be detected.

Within drinking water treatment, *P. aeruginosa*, *Campylobacter* spp. and *Salmonella* could no longer be detected after the first stage (slow sand filtration), for *Aeromonas* spp. a reduction by 2 to 3 log levels was apparent. After completion of the drinking water treatment, none of the target organisms were detected.

Aeromonas spp. infections caused by water contact with the skin and mucous membranes or by aspiration of contaminated water have been described in literature. A quantitative assessment of the risk of infection is not possible based on literature.

Infections by *P. aeruginosa* have been described at concentrations that were also measured in the River Ruhr. They are caused by the penetration of the bacterium into softened or injured skin. This mechanism is also important in inflammation of the external auditory canal.

Regarding *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp., a quantitative risk assessment was carried out based on literature. The risk of illness on the day of the highest concentration of *Campylobacter* spp. measured during the study period was 0.9 % for adults and 1.8 % for children with a bathing time of 45 minutes. With the same calculation basis risks of illness of ≥ 0.08 % for adults and ≥ 0.2 % for children regarding *Salmonella* spp. was determined

The concentrations of the target organisms tended to be increased at elevated concentrations of the indicator organisms *E. coli* and enterococci, especially in periods requiring a temporary bathing ban. However, some high peaks in target organism concentrations also occurred at lower levels of the indicators.

Accumulation of A.spp and P.spp. in biofilms was detected. Increased exposures to these organisms by contact with biofilms are possible, despite concentrations in surface water may be low. Although *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. could not be detected in biofilms, their occurrence cannot be ruled out due to the high detection limits of the organisms in this matrix.

In drinking water treatment, sufficient elimination of the pathogens examined can be assumed.

Overall, it was found that an early warning system based on high levels of indicator bacteria can also reduce the risk of high exposure to other pathogens in surface water. However, exposure to pathogens in biofilms cannot be sufficiently estimated by measuring indicator organisms in surface water.

A semi-continuous measurement method and a PCR-based rapid test method could not map the concentrations of the indicator bacteria reliably. Within the joint project, however, an early warning system was developed to predict poor water quality based on precipitation data.

Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumenprozent	GVPC	Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide – (Agar)
°C	Grad Celsius		
µL	Mikroliter	h	Stunde(n)
µm	Mikrometer	ISO	Internationale Organisation für Normung
µM	mikromolar (Maßeinheit µmol/l)	IU	international unit
ADA	Ampicillin-Dextrin-Agar	KBE	koloniebildende Einheit
ATP	Adenosintriphosphat	kHz	Kilohertz
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract - (Agar)	L	Liter
Bek. v.	Bekanntmachung vom	LED	lichtemittierende Diode
bp	Basenpaare	M	Molar (Maßeinheit mol/l)
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot- Lactose-Saccharose-(Agar)	MALDI- ToF-MS	matrix-assisted desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
CASO	Casein-Soja-Pepton-(Agar)	Mbp	Megabasenpaar
d	Tag(e)	mg	Milligramm
DIN	Deutsches Institut für Normung	min	Minute(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mL	Milliliter
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	mm	Millimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/ Ethylendiamintetraacetat	MPN	Most Probable Number
EEA	European Environment Agency	mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay	nm	Nanometer
EMA	Ethidiummonoazid	NRW	Nordrhein-Westfalen
EN	Europäische Norm	OD	optische Dichte
EPA	United States Environmental Protection Agency	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>et al.</i>	und andere (Autoren)	PFGE	Pulsed-Field-Elektrophorese
EU	Europäische Union	PFU	Plaque Forming Unit
FG	Feuchtgewicht (Biofilm)	PMA	Propidiummonoazid
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	PMEU	Portable Microbe Enrichment Unit
g	g-Kraft	ppm	parts per million („Anteile pro Million“)
g	Gramm	QMRA	Quantitative microbiological risk assessment
GU	Genome Units	qPCR	quantitative Polymerase- Kettenreaktion
		RKI	Robert Koch-Institut
		RT(-PCR)	Reverse-Transkriptase(- Polymerase-Kettenreaktion)

RVS	Rappaport-Vassiliadis-Soja- (Bouillon)
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	<i>species pluralis</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TSI	Dreizucker-Eisen / Triple Sugar Iron (Agar)
UBA	Umweltbundesamt (Deutschland)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett(strahlung)
VBNC	Viable but nonculturable
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat- (Agar)
y	Jahre
z. B.	zum Beispiel
ZD	Zelldichte
SAK	Spektraler Absorptionskoeffizient
SSK	spektraler Schwächungskoeffizient
TOC	total organic carbon (gesamter organischer Kohlenstoff)
DOC	dissolved organic carbon (gelöster organischer Kohlenstoff)

Inhaltsverzeichnis

Highlights	3
Zusammenfassung	4
Summary	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	16
1.1. Ziele und Motivation	16
1.2. Untersuchungsanlass und geographische Einordnung.....	16
1.3. Hygienische Belastung von natürlichen Badegewässern.....	17
1.4. Häufig genutzte Indikatororganismen	21
1.5. Besonderheiten beim Nachweis hygienisch relevanter Bakterien in Oberflächengewässern ...	22
1.5.1. Heterogene Verteilung zwischen Wasser und Biofilmen.....	22
1.5.2. Übergang in einen VBNC-Zustand.....	22
1.6. Alternativen zu konventionellen kulturbasierten Nachweismethoden hygienisch relevanter Mikroorganismen	23
1.6.1. Coliguard.....	23
1.6.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	23
1.6.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	24
1.6.4. EMA/PMA qPCR	24
1.7. Ausgewählte bakterielle Pathogene mit Relevanz in Oberflächengewässern	24
1.7.1. <i>Aeromonas</i> spp.....	24
1.7.1.1. Vorkommen im Trinkwassersystem, Bildung von Biofilmen und Übergang in den VBNC-Zustand.....	25
1.7.1.2. Medizinische Bedeutung von <i>Aeromonas</i> spp.....	26
1.7.1.3. Nachweis von <i>Aeromonas</i> spp. in Wasser.....	27
1.7.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.7.2.1. Vorkommen im Trinkwassersystem, Bildung von Biofilmen und Übergang in den VBNC-Zustand.....	28
1.7.2.2. Medizinische Bedeutung von <i>P. aeruginosa</i>	28
1.7.2.3. Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> in Wasser.....	29
1.7.3. <i>Campylobacter</i> spp.	29
1.7.3.1. Physiologie und Taxonomie.....	29
1.7.3.2. Vorkommen in Oberflächengewässern und Umwelt	30
1.7.3.3. Überlebensstrategien, “Viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand und Vorkommen im Biofilm.....	31
1.7.3.4. Medizinische Bedeutung von <i>Campylobacter</i> spp.....	33
1.7.3.5. Risikofaktoren für eine Infektion.....	34

1.7.3.6.	Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. in Wasser	35
1.7.4.	<i>Salmonella</i> spp.....	36
1.7.4.1.	<i>Salmonella</i> spp. in der Umwelt und Gewässern	36
1.7.4.2.	VBNC-Zustand von <i>Salmonella</i> spp. und das Vorkommen in Biofilmen und Wasserinstallationen.....	37
1.7.4.3.	Medizinische Bedeutung von <i>S. enterica</i>	38
1.7.4.4.	Nachweis von <i>S. enterica</i> in Wasser.....	39
1.7.5.	<i>Legionella</i> spp.....	40
1.7.5.1.	Überleben und Wechselwirkung mit anderen Bakterien.....	41
1.7.5.2.	Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung und Verteilung	41
1.7.5.3.	Medizinische Bedeutung.....	42
1.7.5.4.	Nachweis von <i>Legionella</i> spp. in Wasser.....	43
2.	Material.....	45
2.1.	Verwendete Bakterienstämme.....	45
2.2.	Geräte.....	46
2.3.	Materialien	47
2.4.	Chemikalien	48
2.5.	Kommerzielle Testsysteme und Kits zur Probenaufbereitung	49
2.6.	Puffer und Lösungen	50
2.7.	Lösungen und Puffer für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	51
2.8.	Gensonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	52
2.8.1.	Hybridisierungspuffer	53
2.8.2.	Waschpuffer	54
2.9.	Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
2.9.1.	Intestinale Enterokokken.....	55
2.9.2.	<i>Aeromonas</i> spp.....	55
2.10.	Nährmedien.....	55
2.11.	Selektivmedien.....	56
2.11.1.	<i>Aeromonas</i> spp.....	56
2.11.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
2.11.3.	<i>Campylobacter</i> spp.....	58
2.11.4.	Salmonellen	59
2.11.5.	Leptospiren	59
2.11.6.	Legionellen.....	59
2.12.	Medien für die biochemische Identifizierung	60
2.13.	Software und Datenbanken	61
3.	Methoden.....	62

3.1. Untersuchungsbereich.....	62
3.2. Auswahl der Probenahmestellen Oberflächenwasser, Ruhr.....	62
3.3. Auswahl der Probenahmestellen Trinkwasseraufbereitung.....	63
3.4. Probenentnahme wässriger Proben nach DIN 19458:2006.....	63
3.5. Beprobung der Sedimente und epilithischer Biofilme.....	63
3.6. Beprobung des Uferbereichs „Planschzone“.....	64
3.7. Beprobung der Reinigungsstufen eines Ruhrwasserwerks.....	64
3.8. Bestimmung physikalisch chemischer Begleitparameter.....	64
3.9. Aufbereitung von Sedimentproben für mikrobiologische Untersuchungen.....	64
3.10. Aufbereitung von Proben des epilithischen Biofilms für mikrobiologische Untersuchungen..	64
3.11. Bestimmung des Trockenrückstandes/Wassergehaltes der Sediment- und Biofilmproben.....	64
3.12. Bestimmung des Glühverlustes der Sediment- und Biofilmproben.....	65
3.13. Bestimmung mikrobiologischer Begleitparameter.....	65
3.13.1. Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	65
3.13.2. Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C.....	65
3.13.3. Quantifizierung der ausgewählten hygienisch relevanten Bakterien.....	65
3.14. Kulturabhängige Methoden.....	65
3.14.1. <i>Escherichia coli</i> und intestinale Enterokokken sowie <i>Clostridium perfringens</i>	65
3.14.2. <i>Aeromonas</i> spp.....	66
3.14.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
3.14.3.1. Flüssiganreicherung nach DIN 38411-8:1982.....	67
3.14.3.2. Membranfiltrationsverfahren nach DIN EN ISO 16266:2008.....	68
3.14.3.3. Pseudalert®.....	69
3.14.3.4. Membranfiltrationsverfahren unter Verwendung von RAPID®P. aeruginosa-Agar (Bio-Rad).....	69
3.14.3.5. Biochemische Identifizierung mittels API® 20 NE Testsystem.....	69
3.14.4. Thermotolerante <i>Campylobacter</i> spp.....	69
3.14.5. Salmonellen (ohne <i>Salmonella Typhi</i>).....	71
3.14.5.1. Biochemische Identifizierung.....	72
3.14.6. Legionellen.....	73
3.14.7. Allgemeine Tests zur Identifizierung von Subkulturen.....	74
3.14.7.1. Oxidase-Test.....	74
3.14.7.2. Katalase-Test.....	74
3.15. Kulturunabhängige Methoden.....	75
3.15.1. Quantifizierungsmethoden basierend auf der Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	75
3.15.1.1. DNA-Extraktion aus Oberflächenwasser.....	75
3.15.1.2. Quantifizierung von intestinalen Enterokokken mittels qPCR.....	75

3.15.2.	Quantifizierung von <i>Legionella</i> spp. und <i>L. pneumophila</i> mittels (PMA-)qPCR.....	77
3.15.3.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	78
3.15.4.	Coliguard®	79
3.16.	Bestimmung des pathogenen Potentials und Populationsanalysen ausgewählter Isolate	80
3.16.1.	Erfassung ausgewählter Pathogenitätsfaktoren von <i>Aeromonas</i> spp. mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese	80
3.16.2.	Bestimmung der Hämolyseaktivität ausgewählter <i>Aeromonas</i> spp. Isolate	81
3.16.3.	Latex-Agglutinationsassay der <i>Campylobacter</i> spp. Isolate.....	81
3.16.4.	Identifizierung der <i>Campylobacter</i> spp. Isolate auf Speziesebene mittels API® Campy ..	81
3.17.	Risikobewertung.....	81
4.	Ergebnisse	83
4.1.	Optimierung und Evaluierung des Nachweises von hygienisch relevanten Bakterien im Oberflächenwasser	83
4.1.1.	Nachweis von <i>Aeromonas</i> spp.....	83
4.1.1.1.	Vorkommen und Identifizierung unterschiedlicher Kolonietypen	84
4.1.2.	Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Oberflächengewässern	90
4.1.2.1.	Eignung des Membranfiltrationsverfahrens DIN EN ISO 16266:2008 zum quantitativen Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> in Oberflächenwasser	93
4.1.2.2.	Eignung des MPN-Verfahrens DIN 38411-8:1982 zum quantitativen Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> in Oberflächenwasser	93
4.1.2.3.	Eignung des kommerziellen MPN-Systems Pseudalert® zum quantitativen Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> in Oberflächenwasser	94
4.1.2.4.	Eignung des Selektionsmediums RAPID' <i>P.aeruginosa</i> -Agar zum quantitativen Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> in Oberflächenwasser	97
4.1.3.	Nachweis von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. in Oberflächengewässern	99
4.1.4.	Nachweis von <i>Salmonella enterica</i> in Oberflächengewässern	102
4.1.5.	Nachweis von <i>Legionella</i> spp. in Oberflächengewässern	103
4.1.5.1.	Kulturabhängiger Nachweis von <i>Legionella</i> spp.....	103
4.1.5.2.	Kulturunabhängiger Nachweis von <i>Legionella</i> spp.....	103
4.2.	Bestandsaufnahme der hygienisch relevanten Zielorganismen im Fließgewässer Ruhr	105
4.2.1.	Physikalisch-chemische Begleitparameter	105
4.2.2.	Mikrobiologische Begleitparameter.....	106
4.2.3.	Vorkommen von <i>Aeromonas</i> spp. im Fließgewässer Ruhr	109
4.2.4.	Anreicherung von <i>Aeromonas</i> spp. im Flusssediment	111
4.2.5.	Pathogenität der Umweltisolate von <i>Aeromonas</i> spp.....	112
4.2.6.	Vorkommen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Fließgewässer Ruhr.....	113
4.2.7.	Anreicherung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Flusssediment	115
4.2.8.	Vorkommen von <i>Campylobacter</i> spp. im Fließgewässer Ruhr	116
4.2.9.	Anreicherung von <i>Campylobacter</i> spp. im Flusssediment	118

4.2.10.	Charakterisierung der Umweltisolate von <i>Campylobacter</i> spp.	119
4.2.11.	Risikobewertung von <i>Campylobacter</i> spp. im Fließgewässer	119
4.2.12.	Vorkommen von <i>Salmonella enterica</i> im Fließgewässer Ruhr	120
4.2.13.	Anreicherung von <i>Salmonella enterica</i> im Flusssediment	122
4.2.14.	Charakterisierung und Pathogenität der gewonnenen Umweltisolate von <i>Salmonella enterica</i>	123
4.2.15.	Risikobewertung von <i>Salmonella enterica</i> im Fließgewässer	123
4.2.16.	Vorkommen von <i>Legionella</i> spp. im Fließgewässer Ruhr	124
4.2.17.	Anreicherung von <i>Legionella</i> spp. im Flusssediment	127
4.2.18.	Beeinflussung der hygienisch-mikrobiologischen Wasserqualität durch Niederschläge	128
4.2.19.	Aussagekraft hygienisch relevanter Indikatorbakterien	130
4.2.20.	Elimination der Zielorganismen während der Trinkwasseraufbereitung	136
4.3.	Neue Monitoringstrategien für Oberflächengewässer	138
4.3.1.	Erfassung von Indikatorbakterien mittels quantitativer PCR	138
4.3.2.	Semikontinuierliche Messung von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien mit dem Coliguard® Messgerät	140
5.	Diskussion	142
5.1.	Nachweismethoden hygienisch relevanter Bakterien in Oberflächengewässern	142
5.1.1.	Nachweis von <i>Aeromonas</i> spp. in Oberflächenwasser.....	142
5.1.2.	Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Oberflächenwasser	143
5.1.3.	Nachweis von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. in Oberflächenwasser.....	144
5.1.4.	Nachweis von Salmonellen in Oberflächenwasser	146
5.1.5.	Nachweis von <i>Legionella</i> spp. im Oberflächenwasser.....	147
5.2.	Gewässerqualität	148
5.3.	Vorkommen von <i>Aeromonas</i> spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten	150
5.4.	Risikobewertung von <i>Aeromonas</i> spp. im Ruhrwasser	151
5.5.	Elimination von <i>Aeromonas</i> spp. während der Trinkwasseraufbereitung	152
5.6.	Vorkommen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten	156
5.7.	Risikobewertung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> im Ruhrwasser.....	156
5.8.	Elimination von <i>P. aeruginosa</i> während der Trinkwasseraufbereitung.....	160
5.9.	Vorkommen von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten.....	160
5.10.	Risikobewertung von thermotoleranten thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. im Ruhrwasser 162	
5.11.	Elimination von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. während der Trinkwasseraufbereitung 166	
5.12.	Nachweis von <i>Salmonella enterica</i> in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten	167
5.13.	Risikobewertung <i>Salmonella enterica</i> im Ruhrwasser.....	168

5.14. Elimination von <i>Salmonella enterica</i> während der Trinkwasseraufbereitung	172
5.15. Nachweis von <i>Legionella</i> spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten.....	172
5.16. Risikobewertung von <i>Legionella</i> spp. im Ruhrwasser	176
5.17. Elimination von <i>Legionella</i> spp. während der Trinkwasseraufbereitung	176
5.18. Weitere wichtige wasserbürtige Pathogene	177
5.19. Korrelation der untersuchten pathogenen Bakterien mit Indikatorbakterien	178
5.20. Schnelltests zur Bestimmung der Wasserqualität.....	179
5.20.1. Kommerzielle most probable number Methoden (IDEXX, Pseudalert®).....	179
5.20.2. Semikontinuierliches Monitoring von <i>E. coli</i> (Coliguard®, Fa. mbonline).....	180
5.20.3. qPCR und andere molekularbiologische Methoden.....	180
5.21. Abschließende Risikobewertung pathogener Bakterien im Ruhrwasser und Einflussfaktoren auf die Gewässerqualität.....	181
5.22. Regenereignisse.....	183
5.23. Planschzone und Aufwirbeln von Sedimenten.....	184
5.24. Eignung als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung.....	184
5.25. Fazit.....	185
5.26. Outlook	186
6. Literatur.....	188
7. Anhang.....	228
7.1. Optimierung und Evaluierung des Nachweises der hygienisch relevanten Zielorganismen im Oberflächenwasser	228
7.2. Bestandsaufnahme der hygienisch relevanten Zielorganismen im Fließgewässer Ruhr	237
7.3. Rohdaten der Bestandsaufnahme der bakteriellen Pathogene im urbanen Fluss Ruhr	238
7.3.1. Rohdaten <i>Aeromonas</i> spp.....	238
7.3.2. Rohdaten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bestimmt nach Flüssiganreicherung gemäß DIN 38411- 8:1982.....	240
7.3.3. Rohdaten thermotolerante <i>Campylobacter</i> spp.....	242
7.3.4. Rohdaten <i>Salmonella enterica</i>	244
Danksagung.....	246
Erklärung.....	247
Lebenslauf.....	248

1. Einleitung

1.1. Ziele und Motivation

Auch wenn Baden in der Ruhr lange Zeit aufgrund der unsicheren Wasserqualität verboten war, wird der Fluss dennoch häufig als Bade- und Freizeitgewässer genutzt (Kistemann und Flemming 2016). Aus diesem Grund soll durch den Nachweis und die Quantifizierung der untersuchten Bakterien eine Basis für eine quantitative Risikobewertung geschaffen werden. Durch eine hohe Probenanzahl, durch die Wahl von Probenahmestellen und durch einen ausgedehnten Untersuchungszeitraum wird eine Reihe von Einflussfaktoren auf die Wasserqualität eingeschlossen (Horstkott *et al.* 2014). Darunter zum Beispiel Niederschlagsereignisse, Einleitungen und Saisonalitäten. Ebenfalls wurde berücksichtigt, ob Sedimente und Biofilme im Kontakt mit der Wasserphase ein Reservoir für pathogene Bakterien darstellen können und ob es zu einer Freisetzung hoher Konzentrationen durch eine Mobilisierung kommen kann.

In vielen Untersuchungen wird das Hauptaugenmerk auf gastrointestinale Erreger gelegt. Es zeigt sich jedoch, dass die Expositionen durch Hautkontakt oder Inhalation bzw. Aspiration ebenfalls bedeutend sind. Bei dieser Arbeit werden deshalb pathogene Bakterien berücksichtigt, die Infektionen über unterschiedliche Expositionswege auslösen können. Durch Einbettung in das Verbundprojekt können Gefährdungspotentiale unterschiedlicher Organismengruppen zusammengefasst und gewichtet werden. Als Parameter für diese Arbeit im speziellen werden bakterielle Pathogene gewählt, die gewöhnlich nicht Bestandteil einer Routineüberwachung sind. Somit ist es möglich Indikatorfunktionen einzelner Parameter zu überprüfen, deren Messdaten ebenfalls vorliegen.

1.2. Untersuchungsanlass und geographische Einordnung

Wie sich schon aus dem Namen des Ruhrgebiets ableiten lässt, ist der Fluss ein wichtiger Bestandteil der Identität der gesamten Region. Historisch gesehen war dieser die „Lebensader“ für die wirtschaftliche Entwicklung und das „Wohlergehen“ der Bevölkerung und hält bis heute eine herausragende Stellung. Eine besondere Herausforderung ist dabei die unterschiedlichen Nutzungsarten miteinander zu vereinbaren: a) die Nutzung als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung, b) die Einleitungen aus unterschiedlichen Aufbereitungsanlagen und c) -von besonderem Interesse für diese Arbeit- die Nutzung als mögliches Badegewässer (Hygiene-Institut des Ruhrgebiets 1962). Die Ruhr hat sich in den letzten Jahrzehnten mit den fortschreitenden strukturellen Veränderungen ebenfalls in ihrem Erscheinungsbild gewandelt. So verwundert es nicht, dass die Nutzung für Freizeitaktivitäten wieder stärker in das Bewusstsein der Bevölkerung gerückt ist. Vor allem der Baldeneysee, der ursprünglich zur Reinigung des Flusses angelegt wurde, ist ein beliebtes Ausflugsziel (Ruhrverband 2013). Dieser Trend zeigt sich auch europaweit darin, dass die Anzahl der gemeldeten Badestellen im Inland in den letzten Jahren kontinuierlich auf 6.497 in 2015 angestiegen ist. Von diesen entfällt allerdings nur ein kleiner Anteil von etwas über 10 % auf Flüsse (EEA 2016).

Neben dem positiven Effekt auf Lebensqualität und Gesundheit, die sportliche Aktivitäten haben können, ist jedoch auch eine Analyse der damit verbundenen Risiken angebracht. Zum einen gehen in diese physische Gefahren wie ein mögliches Ertrinken durch starke Strömungen ein. Es sind jedoch auch mögliche gesundheitliche Beeinträchtigungen durch chemische und mikrobielle Kontaminationen zu berücksichtigen. Letztere werden in dieser Arbeit mit dem Schwerpunkt auf bakterielle Pathogene behandelt. Für ein umfassendes Risikomanagement sehen Leitlinien der World Health Organization (WHO) neben der Ermittlung der Eintrittswahrscheinlichkeit auch eine Priorisierung der Risiken vor, bei der zusätzlich das verursachte Schadensausmaß berücksichtigt wird (WHO 2003). Dieses Konzept ist in Abbildung 1 grafisch dargestellt.

Wie konkret ein Badebetrieb an der Ruhr umgesetzt werden könnte, ist durch Schoenemann und Jardin (2015) in einem Leitfaden zusammengefasst. Dieser befasst sich neben den behördlichen Anforderungen und Aspekten des Gesundheitsschutzes auch damit, wie die Öffentlichkeit optimal eingebunden werden kann.

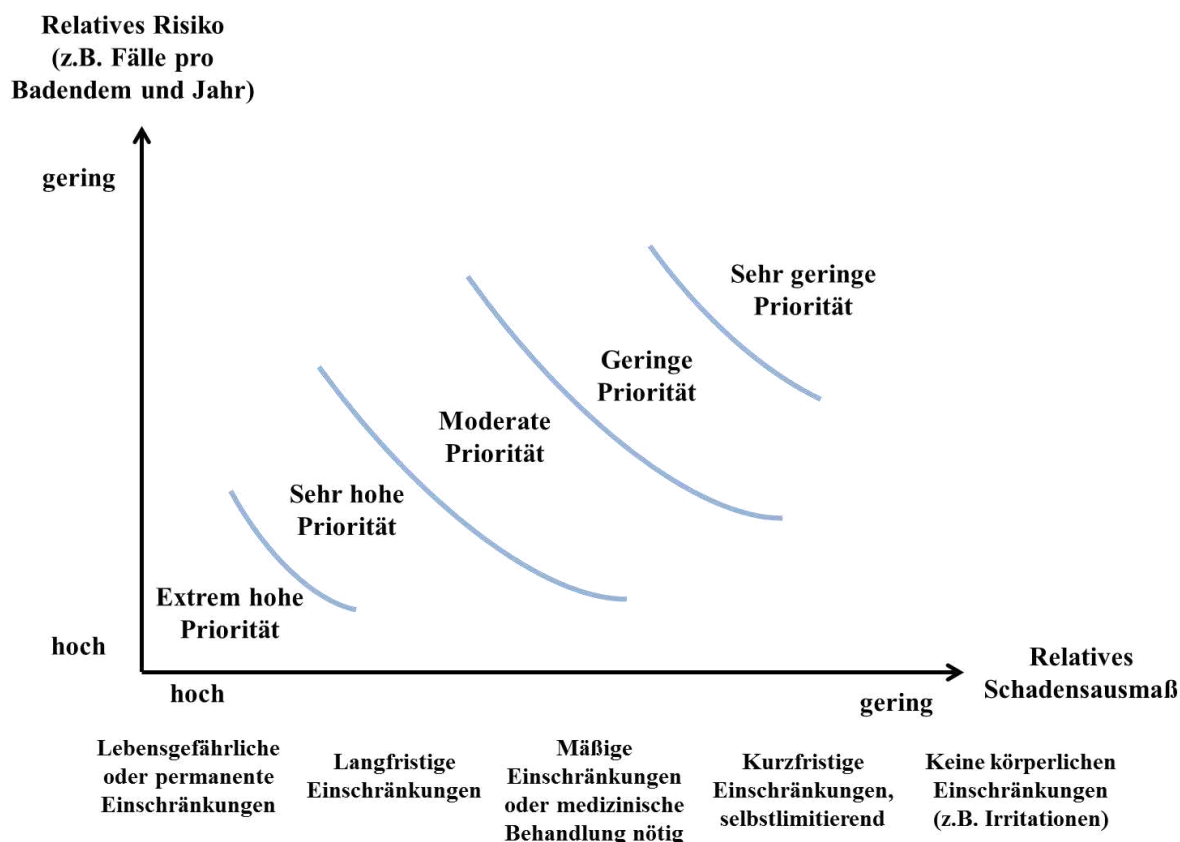


Abbildung 1: Priorisierungsschema der WHO (modifiziert) zum Vergleich unterschiedlicher Gefahren, die mit der Nutzung von Freizeitgewässern verbunden sind (WHO 2013).

Zusätzlich findet die Ruhr auch als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung Verwendung und sichert so die Versorgung einer dicht besiedelten Region. An das Endprodukt Trinkwasser bestehen hohe qualitative Ansprüche, um eine Gefährdung der Bevölkerung zu vermeiden. Der hohe Stellenwert, den die Hygiene in diesem Fall hat, ist bereits durch die folgende gesetzliche Verankerung in der Trinkwasserverordnung zu erkennen: „Trinkwasser muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist“ (TrinkwV 2001, Bek v. 10.03.2016). Da das Monitoring des Endproduktes durch ein limitiertes Probevolumen erschwert ist, werden eine Reihe unterschiedlicher Parameter bereits im Rohwasser überwacht.

1.3. Hygienische Belastung von natürlichen Badegewässern

Die Einstufung der hygienischen Qualität von Oberflächengewässern wie der Ruhr -in Bezug auf die Nutzung als Badegewässer- erfolgt in Europa auf Grundlage der Badegewässerrichtlinie (Richtlinie 2006/7/EG). Diese ist im Untersuchungsgebiet dieser Arbeit, das die Städte Essen und Mülheim a. d. Ruhr umfasst, durch das Land Nordrhein-Westfalen mit der NRW-Badegewässerverordnung (2007) in nationales Recht umgesetzt worden. Als Kriterien für eine Bewertung sind darin die Konzentrationen der Parameter intestinale Enterokokken und *Escherichia coli* verankert (Tabelle 1). Ein Nachweis dieser Organismen deutet auf eine hygienisch bedenkliche fäkale Verunreinigung hin, die bei *E. coli* kürzlich erfolgt ist oder bei intestinalen Enterokokken, abgeleitet aus der geringeren Abnahmerate in Gewässern, auch etwas länger zurück liegen kann (Kinzelman *et al.* 2003). Es werden hierbei keine

Einzelwerte betrachtet, sondern es erfolgt eine statistische Auswertung auf Grundlage einer 95- bzw. 90-Perzentil-Bewertung über einen Zeitraum von vier Jahren. Zusätzlich erfordert das Anlegen eines umfassenden Badegewässerprofils ein aktives Risikomanagement. Werden Badestellen als mangelhaft eingestuft und ein Badeverbot ausgesprochen, so muss die Bevölkerung einschließlich einer Begründung der Entscheidung informiert werden (Georgiou und Bateman 2005; Mansilha *et al.* 2009; Oliver *et al.* 2014). Ist damit zu rechnen, dass es zu definierten Zeiten zu einem vermehrten Eintrag dieser Organismen in das Gewässer kommt, besteht unter Umständen zusätzlich die Möglichkeit, "Zeiten erhöhten Risikos" festzulegen. In diesen muss ausgeschlossen werden, dass eine Exposition der Bevölkerung erfolgt, woraufhin die erhaltenen Daten aus diesen Zeiträumen nicht bei der Einstufung berücksichtigt werden müssen. Zusätzlich ist nach Badegewässerrichtlinie eine grundsätzliche Beurteilung nötig, ob geeignete Bedingungen für eine massenhafte Vermehrung von Cyanobakterien, die Toxine bilden können, gegeben ist. In diesem Fall muss eine Überwachung dieses Parameters zusätzlich geplant und umgesetzt werden (Dizer *et al.* 2005).

Tabelle 1: Mikrobiologische Grenzwerte zur Einstufung der Wasserqualität von Binnengewässern nach EU-Badegewässerrichtlinie (Richtlinie 2006/7/EG). Die Werte beziehen sich auf ein Untersuchungsvolumen von 100 mL.

Parameter	ausgezeichnete Qualität	gute Qualität	ausreichende Qualität	Referenzanalysemethoden
Intestinale Enterokokken	200*	400*	330**	ISO 7899-1 oder ISO 7899-2
<i>E. coli</i>	500*	1.000*	900**	ISO 9308-3 oder ISO 9308-1

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

Die meisten der in Europa als Badestelle gemeldeten Binnengewässer werden nach den Kriterien der Richtlinie als ausgezeichnet eingestuft. Eine genaue Verteilung ist in Abbildung 2 abzulesen. Dennoch besteht die Sorge, dass nach 2015 eine bedeutende Anzahl an Gewässern die neuen Auflagen nicht erfüllen können. Diese wären dann ab 2020 nicht mehr nutzbar, da die Richtlinie ab diesem Zeitpunkt eine Nutzung verbietet (Oliver *et al.* 2014).

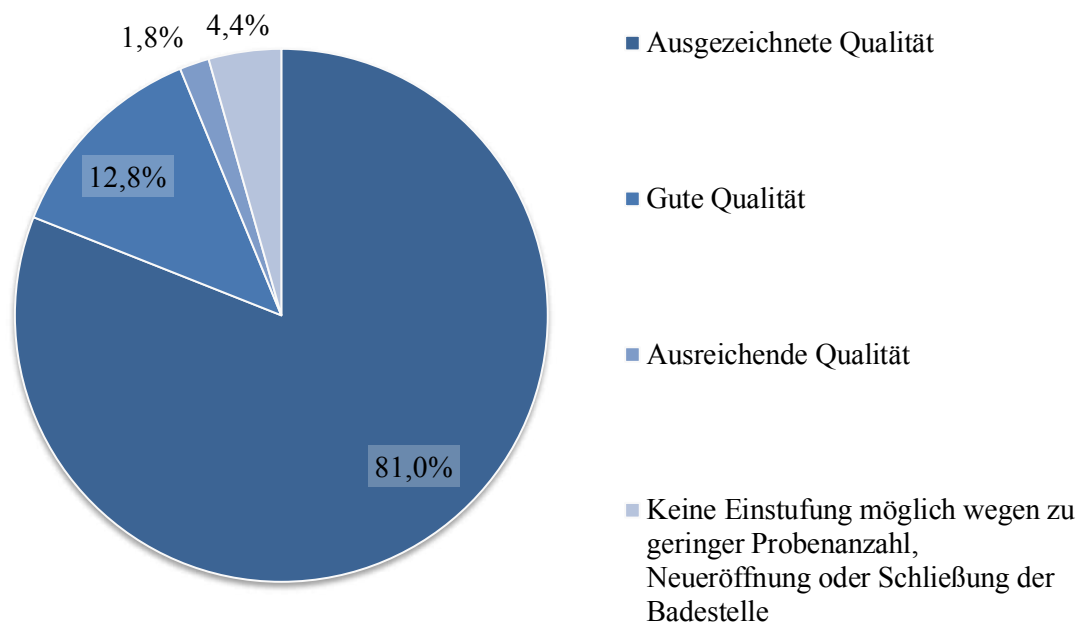


Abbildung 2: Einstufung der Badestellen an Binnengewässern in Europa nach Maßstäben der EU-Badegewässerverordnung im Jahr 2015 (EEA 2016)

Trotz der guten Bewertungen birgt eine Kontamination mit hygienisch relevanten Mikroorganismen grundsätzlich immer ein, wenn auch unter Umständen geringes, Erkrankungsrisiko. In einer groß angelegten Studie von Wiedenmann *et al.* (2006), die die Exposition von Badenden in unterschiedlichen Badegewässern untersuchte, wurde daher das reelle Erkrankungsrisiko ermittelt. Basierend auf den Ergebnissen schlugen die Autoren etwas geringere Grenzwerte von 100 KBE *E. coli*, 25 KBE Intestinalen Enterokokken, 10 PFU somatischen Coliphagen oder 10 KBE *Clostridium perfringens* in 100 mL Wasserprobe vor. Fewtrell und Kay (2015) stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Gewässern, die erhöhte Gehalte an Indikatororganismen aufwiesen, und negativen Auswirkungen auf die Gesundheit fest (Quilliam *et al.* 2015).

Die meisten Studien zum Erkrankungsrisiko bei der Nutzung von Badegewässern stellen die Gastroenteritis in den Fokus der epidemiologischen Betrachtung (Furtado *et al.* 1998; Till *et al.* 2008). In einer umfassenderen Untersuchung von Schets *et al.* (2010) wurden zusätzlich weitere unterschiedliche gesundheitliche Beeinträchtigungen, die mit dem Kontakt von unbehandeltem Oberflächenwasser bei Freizeitaktivitäten in Verbindung gebracht wurden, kategorisiert. Am häufigsten kam es demnach mit 48 % der erfassten Fälle zu Erkrankungen der Haut, gefolgt von gastrointestinalen Erkrankungen mit 31 % (Abbildung 3). Auffällig war dabei, dass bei Temperaturen oberhalb von 25 °C auch ein Anstieg der Erkrankungsfälle zu verzeichnen war, wenn die Anforderungen der EU-Badegewässerrichtlinie erfüllt wurden.

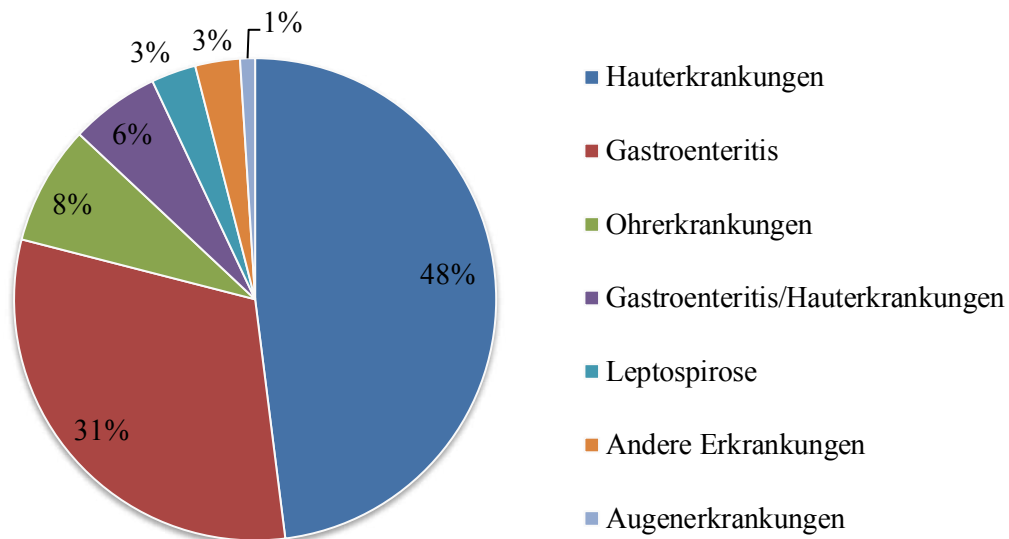


Abbildung 3: Erkrankungen, bedingt durch die Nutzung von unbehandelten Gewässern für Freizeitaktivitäten (z. B. Schwimmen). Die Erkrankungshäufigkeiten wurden über den Untersuchungszeitraum von 1991-2007 in den Niederlanden erhoben und nach unterschiedlichen gesundheitlichen Beschwerden aufgeteilt (nach Schets *et al.* 2010).

Gastrointestinale Erkrankungen können von sehr unterschiedlichen Arten von Pathogenen hervorgerufen werden. Darunter sind vor allem *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* und *E. coli* O157:H7 auf Seiten der bakteriellen Krankheitserreger, *Cryptosporidium* spp. und *Giardia lamblia*, die zu den Protozoen gehören, sowie Norovirus, Rotavirus und Adenovirus zu nennen. Eine Gewichtung nach der Erkrankungswahrscheinlichkeit, die sie für potenzielle Nutzer des Gewässers durch Ingestion darstellen, zeigt, dass die Viren vermutlich den größten Einfluss ausüben (Soller *et al.*, 2010). Doch auch durch Kontakt von kontaminiertem Wasser mit der Körperoberfläche sind Infektionen beispielsweise durch *Pseudomonas aeruginosa* oder *Aeromonas hydrophila* möglich.

Wie hoch die Konzentration der hygienisch relevanten Mikroorganismen im jeweiligen Gewässer zum Zeitpunkt der Nutzung ist, hängt neben dem Eintrag über punktuelle oder diffuse Quellen von einigen weiteren Faktoren ab. In natürlichen Gewässern bewirkt UV-Strahlung eine Abnahme der nachweisbaren Konzentrationen von Pathogenen vor allem in der Wasserphase. Im Biofilm ist der Einfluss der UV-Strahlung hingegen deutlich geringer (Schultz-Fademrecht *et al.* 2008). Zusätzlich spielen Temperatur, Prädation durch andere Mikroorganismen und Transportprozesse eine Rolle (Brookes *et al.* 2004). Die Reduktionsgeschwindigkeiten können sich von Organismus zu Organismus durch unterschiedliche Widerstandsfähigkeiten deutlich unterscheiden. In Tabelle 1/Tabelle 2 sind einige Fäkalbakterien mit den dazugehörigen Halbwertszeiten in Oberflächengewässern aufgelistet.

Eine vorübergehende Verschlechterung der Wasserqualität kann durch Regenfälle und damit verbundene Abschwemmungen, beispielsweise aus der Landwirtschaft, oder den Eintrag über Wasservögel oder Ausscheidungen der Badegäste hervorgerufen werden (Roser *et al.* 2006; Szewzyk und Knobling 2007). Bei Hochwasserereignissen besteht zudem die Gefahr, dass die Kanalsysteme und Kläranlagen - falls im Einzugsgebiet vorhanden - entlastet werden müssen, was zu einem verstärkten Eintrag von Pathogenen führen kann (ten Veldhuis *et al.* 2010).

Tabelle 2: Benötigte Reduktionszeiten zur Verringerung der Konzentration unterschiedlicher Bakterienspezies oder Bakteriengruppen auf 50 % des Ausgangswertes ausgewählter Fäkalbakterien im Oberflächenwasser aus Medema et al. (2003), wie in Cabral (2010) zitiert.

Parameter	Benötigte Reduktion auf 50% der Ausgangskonzentration (d)
Coliforme Bakterien	0,9
<i>E. coli</i>	1,5 - 3
Enterokokken	0,9 - 4
<i>Clostridium perfringens</i>	60 - >300
Salmonella	0,1 - 0,67

1.4. Häufig genutzte Indikatororganismen

Da die Messung aller einzelnen Pathogene, die eine Relevanz in Oberflächengewässern haben, nicht zu realisieren ist, wird in den meisten Fällen auf Indikatororganismen zurückgegriffen. Um das Risiko für Erkrankungen einschätzen zu können, die auf dem fäkal-oralen Weg erworben werden, sind dies sogenannte Fäkalindikatoren. Diese kommen natürlicherweise in hohen Konzentrationen im Darmtrakt von Menschen und Tieren vor und verursachen bei gesunden Personen in der Regel keine Erkrankungen. Sie sind leichter nachzuweisen als die meist in wesentlich geringeren Konzentrationen vorliegenden Krankheitserreger, wobei ein kultureller Nachweis jedoch eine Zeit von mehr als einem Tag in Anspruch nehmen kann. In vielen Fällen, wie auch in der gültigen Richtlinie 2006/7/EG, werden *E. coli* und intestinale Enterokokken zu diesem Zweck eingesetzt. Um eine Möglichkeit zu schaffen, schneller auf Verschmutzungsereignisse zu reagieren, wird zusätzlich verstärkt der Einsatz von Schnelltests zum Nachweis dieser Parameter erprobt, beispielsweise basierend auf dem Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Wade *et al.* 2006, 2008).

Widerstandsfähiger gegenüber Umweltbedingungen ist das grampositive, sporenbildende Bakterium *Clostridium perfringens*. Auch Desinfektionsmaßnahmen können die Sporen dieses Organismus bis zu einem gewissen Grad überstehen. Dadurch eignet es sich besonders, um einen Hinweis auf ebenfalls unempfindliche pathogene Organismen zu geben, unter die zum Beispiel die Protozoen der Gattungen *Giardia* und *Cryptosporidium* oder aber auch einige enterale Viren fallen. Wie die zuvor genannten Organismen gehört es zur natürlichen Darmflora, verursacht aber unter geeigneten Bedingungen auch selbst Infektionen, wie zum Beispiel Wundinfektionen. Die Konzentrationen sind jedoch deutlich niedriger als die von *E. coli*. Da *C. perfringens* sehr lange in aquatischen Systemen überdauern kann, kommt es nahezu ubiquitär in Oberflächengewässern vor (EPA 2007; Cabral 2010).

In einer früheren Fassung der Badegewässerrichtlinie war die Gruppe der coliformen Bakterien als Fäkalindikator vorhanden. Da diese allerdings nicht zwingend auf eine fäkale Verunreinigung hindeuten müssen, wurden sie bei der Neufassung nicht mehr in die Anforderungen übernommen (Dizer *et al.* 2005; Szewzyk und Knobling 2007).

Entero- und Coliphagen werden als Indikatoren für eine Belastung von Gewässern mit enteralen Viren genutzt. Problematisch beim Nachweis sind jedoch ihre hohe genetische Diversität und ein sehr unterschiedliches Abnahmeverhalten bei verschiedenen Temperaturen. Zusätzlich erschwert wird dies durch die Neigung, bei spezifischen Umweltbedingungen Aggregate zu bilden und im Vergleich zu *E. coli* und intestinalen Enterokokken durch geringere Konzentrationen (Santiago-Rodríguez *et al.* 2010).

Das Indikatorkonzept beinhaltet auch einige Schwächen. So ist es bei sporadisch auftretenden Pathogenen schwierig, eine feste Korrelation zu Indikatoren zu ermitteln, da nur eine geringe Anzahl

an Proben mit einem positiven Befund und einem Quantifizierungsergebnis zur Verfügung stehen (Wu *et al.* 2011). Zudem stellen Fäkalindikatoren das Verhalten einiger Pathogene nicht ausreichend dar, da sie sich in ihren Eigenschaften stark unterscheiden (Leclerc *et al.* 2001) oder sich bei geeigneten Umweltbedingungen im Oberflächengewässer vermehren können (Wuertz und Reis 2010). Möglich ist ebenfalls eine Etablierung des Indikatororganismus innerhalb des aquatischen Systems oder eine Anreicherung in den Sedimenten (Balzer *et al.* 2006; Boehm *et al.* 2009). Ihre Aussagekraft zur Abschätzung des Risikos ist vermutlich ebenfalls nicht auf extraintestinale Erkrankungen, wie zum Beispiel Ohrinfektionen, übertragbar (Prüss 1998).

Zusammengefasst lässt sich zu Anforderungen an Indikatoren sagen, dass ausreichende Hinweise auf eine zeitgleiche Anwesenheit mit dem pathogenen Zielorganismus gegeben sein sollten. Ihr Nachweis sollte dabei in kurzer Zeit und kostengünstig möglich sein, um ein ausreichendes Monitoring sicherzustellen (zusammengefasst von Wilkes *et al.* 2009). Einen allgemeingültigen Indikatororganismus oder Messparameter, der für alle pathogenen Mikroorganismen oder Parasiten gut geeignet ist, gibt es dabei nicht (Yates 2007).

1.5. Besonderheiten beim Nachweis hygienisch relevanter Bakterien in Oberflächengewässern

1.5.1. Heterogene Verteilung zwischen Wasser und Biofilmen

In aquatischen Systemen sind Mikroorganismen nicht gleichmäßig verteilt, sondern liegen häufig als Zellaggregate vor. Vor allem an den Phasengrenzen zu Feststoffen aber auch an den Wasser-Luft Grenzschichten kommt es zur Ausbildung sogenannter Biofilme. Diese stellen die häufigste Lebensweise von Mikroorganismen überhaupt dar (Wingender und Flemming 2011; Flemming *et al.* 2016). Eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen, die von den enthaltenen Organismen produziert wird, ermöglicht dabei einerseits einen festen Zusammenhalt und andererseits den Abbau unterschiedlicher Substrate durch die Einbettung extrazellulärer Enzyme (Flemming und Wingender 2010). Darüber hinaus bieten Biofilme einen Schutz gegen äußere Einflüsse, wie z. B. UV-Strahlung (Elasri und Miller 1999) oder Desinfektionsmittel (Goeres *et al.* 2004), und können ein besseres Überleben und damit eine Anreicherung auch von hygienisch bedenklichen Mikroorganismen bewirken (Wingender und Flemming 2011). Neben der Biofilmmatrix kann eine Aufnahme durch grasende Protozoen einige Mikroorganismen vor negativen Einwirkungen abschirmen (King *et al.* 1988).

Bei einer Ablösung von Biofilmbestandteilen werden stoßweise große Mengen an Zellen mobilisiert. Sind Pathogene enthalten, können diese die jeweiligen Infektionsdosen des Organismus überschreiten. Die gesteigerte Resistenz der Mikroorganismen bleibt zusätzlich in den abgelösten Partikeln erhalten (Wilson *et al.* 2004; Buckingham-Meyer *et al.* 2007).

1.5.2. Übergang in einen VBNC-Zustand

Eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterienarten kann in einen "viable but non-culturable" (VBNC)-Zustand übergehen, wenn eine Nährstoffknappheit oder sonstige Stressfaktoren vorliegen. In diesem kann mit den routinemäßig eingesetzten Nährmedien kein Wachstum und somit kein Nachweis mehr beobachtet werden. Das Wiedererlangen ihrer Kultivierbarkeit und Virulenz ist jedoch möglich. Dieses trifft sowohl auf planktonische als auch auf im Biofilm gebundene Zellen zu. Neben einer verringerten Zellgröße sind auch tiefgreifende Veränderungen des Stoffwechsels und höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen für diesen Zustand charakteristisch. Bei geeigneten Nährstoff- und Umweltbedingungen können die Zellen wieder in einen vitalen Zustand übergehen, der durch Wachstum und Zellteilung gekennzeichnet ist (Rowan 2004; Oliver 2005; Colwell 2009; Trevors 2011). Für die in dieser Arbeit untersuchten Organismen sind die Besonderheiten in den jeweiligen Unterkapiteln beschrieben.

1.6. Alternativen zu konventionellen kulturbasierten Nachweismethoden hygienisch relevanter Mikroorganismen

Viele der Standardnachweismethoden beruhen auf der selektiven kulturellen Anreicherung der Zielorganismen. Dadurch wird zum einen Zeit zum Anwachsen auf eine ausreichende Zellzahl benötigt, zum anderen muss der Organismus in einem vermehrungsfähigen Zustand vorliegen. Zusätzlich besteht bei Umweltproben immer die Gefahr, dass ein Überwachsen des Zielorganismus durch die Begleitflora ein falsch-negatives Ergebnis bewirken kann. Aus diesen Gründen werden fortlaufend alternative Methoden entwickelt, die ohne eine Anreicherung auskommen können.

1.6.1. Coliguard

Ein zeitnahes Ergebnis der Qualitätsprüfung von Badegewässern ist ideal, um die Exposition der Badenden gegenüber hygienisch relevanten Mikroorganismen möglichst gering zu halten. Ein "Near Real Time Monitoring" der *E. coli* Konzentration beziehungsweise der Konzentration der coliformen Bakterien ist mit dem automatisierten System Coliguard® der Firma mbOnline GmbH, St. Pölten (jetzt mikroLAN), möglich. Als Messprinzip wird hierbei eine fluoreszenzoptische Bestimmung der β -D-Glucuronidase-Aktivität für den Nachweis von *E. coli* und der β -D-Galactosidase-Aktivität für coliforme Bakterien eingesetzt. Da unter Umständen auch Zellen im VBNC-Zustand erfasst werden können und der Enzymgehalt der Zelle schwanken kann, sind die Befunde nicht unbedingt mit kulturbasierten Standardmethoden vergleichbar. Durch die Möglichkeiten, mehrere Messungen täglich durchzuführen, lassen sich jedoch Trends ableiten (Zibuschka *et al.* 2010).



Abbildung 4: Analysesystem zur fluoreszenzoptischen Messung der β -D-Glucuronidase-Aktivität (Nachweis *E. coli*) und der β -D-Galactosidase-Aktivität (Nachweis coliforme Bakterien). Das Gerät wird direkt an der zu überwachenden Stelle installiert und ermöglicht ein "Near Real Time Monitoring" (Zibuschka *et al.*, 2010).

©mbOnline GmbH, St. Pölten

1.6.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wird für unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt. Grundprinzip der Methode ist die Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten komplementären Sonden. Dadurch werden die Zellen des Zielorganismus bei der entsprechenden Anregung sichtbar und können so

fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden (Moter und Göbel 2000). Als Zielsequenz wird in den meisten Fällen eine Region der 16 S rRNA ausgewählt, da diese nur von geringen Variationen betroffen und in hoher Anzahl in der Zelle vorhanden ist.

1.6.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Inzwischen häufig eingesetzt werden Nachweisverfahren, die auf der Vervielfältigung und Detektion ausgewählter Sequenzen im Genom des Zielorganismus mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen. Hierbei können Indikatorbakterien und Pathogene mit hoher Sensitivität und Spezifität in einer kurzen Analysezeit quantifiziert werden. Die ermittelten Konzentrationen weichen jedoch häufig stark von den mit kulturellen Methoden oder FISH ermittelten ab (Ludwig und Schleifer 2000; Girones *et al.* 2010), siehe auch Abschnitt zu EMA/PMA qPCR.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es bei dieser Methode besonders wichtig, standardisierte Protokolle genau einzuhalten (Shanks *et al.* 2012). Zusätzlich ist bei natürlichen Gewässern durch den Gebrauch von Aufreinigungsmethoden sicherzustellen, dass keine Inhibition der Reaktionen durch die Probenmatrix besteht (Wilson 1997). Um festzustellen, ob die PCR störungsfrei ablaufen kann, werden häufig simultan zusätzlich interne Kontrollsequenzen (Internal Amplification Controls) bekannter Konzentration vervielfältigt und detektiert (Malomy *et al.* 2003).

1.6.4. EMA/PMA qPCR

Verursacht durch die Vermehrung von DNA-Rückständen nicht mehr lebensfähiger Zellen während der PCR, kommt es bei der Quantifizierung zu einer Überschätzung der Bakterienkonzentrationen mit konventionellen qPCR-Verfahren. Um dieses zu verhindern kann eine Modifikation der Methode vorgenommen werden, die auf der Selektion nach Zellmembranintegrität als ein Kriterium für die Viabilität beruht. Hierzu werden die Farbstoffe Propidium-Monoazid (PMA) oder alternativ Ethidium-Monoazid (EMA) verwendet, die durch eine beschädigte Zellmembran eindringen und sich an die DNA anlagern können. Bei einer anschließenden Bestrahlung mit Licht kommt es zur Ausbildung kovalenter Bindungen. Diese Modifizierung der DNA führt im weiteren Verlauf dazu, dass die PCR nicht mehr ungehindert ablaufen kann (Nogva *et al.* 2003; Nocker *et al.* 2006; Nocker *et al.* 2009). Zusätzlich erfolgt eine Bindung des Farbstoffes an extrazelluläre DNA, die dadurch weniger gut löslich ist. Somit kann ebenfalls bei der DNA-Extraktion eine Separierung erfolgen (Nocker *et al.* 2006; Nocker und Camper 2006).

Das zu verwendende Protokoll muss in jedem Fall an den zu untersuchenden Organismus und an die Probenmatrix angepasst werden, da vor allem EMA auch durch unbeschädigte Membranen einiger Bakterienarten in die Zelle eindringen kann. Bedingt durch eine höhere Ladung des Farbstoffmoleküls ist dieses bei PMA weniger stark ausgeprägt (Nocker *et al.* 2006). Ist eine Probenanreicherung durch eine Membranfiltration erforderlich, kann die Behandlung mit dem Farbstoff sowie die Bestrahlung mit Licht direkt auf dem Filter erfolgen. Als Lichtquelle bieten sich besonders LED-Lampen mit einer Wellenlänge von 460 nm an (Hellein *et al.* 2012).

1.7. Ausgewählte bakterielle Pathogene mit Relevanz in Oberflächengewässern

1.7.1. *Aeromonas* spp.

Verschiedene Spezies der Gattung *Aeromonas* kommen natürlicherweise in allen Arten von offenen Gewässern sowie Brack- und Salzwasser vor, wobei in gemäßigten Zonen höhere Temperaturen und Nährstoffkonzentrationen zu einer Zunahme der Konzentrationen führen. Neben der aquatischen Umgebung sind sie aber auch in Böden und Sedimenten zu finden (EPA 2001, 2006). Bei einer Untersuchung von Oberflächenrohwater zur Trinkwasseraufbereitung in Russland zeigte sich, dass *Aeromonas* spp. die dort dominante Gattung der Bakterien darstellte und bis zu 25 % des gesamt nachgewiesenen Bakteriengehaltes ausmachte (Ivanova *et al.* 2001). Die Konzentrationen in

Oberflächenwasser sind nach Untersuchungen von Rippey und Cabelli (1980) charakteristisch für den trophischen Zustand des aquatischen Systems.

Aeromonas spp. gehören zu den γ -Proteobakterien und liegen als gramnegative Stäbchen vor. Sie sind fakultativ anaerob und oxidase- sowie katalasepositiv. Innerhalb der Ordnung Aeromonadales gehören sie der Familie der Aeromonadaceae an. Sie sind in der Lage D-Glukose zu vergären und Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Zusätzlich besitzen sie eine Vielzahl an Enzymen, mit denen sie Substrate hydrolytisch abbauen können (Huys 2014). Temperaturen von 22 °C bis 35 °C sind im Allgemeinen für das Wachstum ideal, wobei einige Spezies aber auch noch unterhalb und oberhalb im Bereich von 0 °C bis 45 °C wachsen können. Der pH-Wert liegt dabei bestmöglich in einem Bereich zwischen 5,5 und 9, die Konzentration an Natriumchlorid bei bis zu 4 % (Igbinosa *et al.* 2012). *Aeromonas* spp. werden mit vielen unterschiedlichen Infektionen, sowohl beim Menschen als auch bei Tieren, in Verbindung gebracht, wobei besonders die Rolle als Erreger von Gastroenteritis nicht vollständig geklärt ist (siehe auch Kapitel 4.2).

Derzeit gibt es in Deutschland keine gültigen Grenzwerte für *Aeromonas* spp. in aquatischen Systemen. Im Gegensatz dazu existieren zum Beispiel in den Niederlanden bereits seit längerem Richtlinien in Bezug auf das Trinkwasser, nach denen 20 KBE/100 mL bei Einspeisung in das Trinkwassernetz und 200 KBE/100 mL im Verteilungssystem nicht überschritten werden dürfen (van der Kooij 1991).

1.7.1.1. Vorkommen im Trinkwassersystem, Bildung von Biofilmen und Übergang in den VBNC-Zustand

Obwohl *Aeromonas* spp. durch unterschiedliche Verfahren zu sehr großen Anteilen bei der Trinkwasseraufbereitung aus dem Rohwasser entfernt werden können (Sartory 1998), wurden sie in einer Reihe von unterschiedlichen Trinkwassersystemen nachgewiesen (Burke *et al.* 1984; Gavriel *et al.* 1998; Egorov *et al.* 2011). Je höher hierbei die Temperatur und je niedriger der Gehalt an freiem Chlor war, desto höher waren auch die gemessenen Konzentrationen (Burke *et al.* 1984). Außerdem nehmen die Konzentrationen mit der Verweildauer im System zu (van der Kooij 1988). Ebenfalls konnte ein Zusammenhang zu Niederschlagsereignissen festgestellt werden (Gavriel *et al.* 1998).

Auch bei der Untersuchung von Trinkwasserbrunnen wurden Aeromonaden häufig nachgewiesen. In sehr heißen Regionen kann es dabei, verglichen mit den Erfahrungen aus den Trinkwassersystemen gemäßigter Zonen, zu einer gegenteiligen Saisonalität kommen, mit einem Maximum der Konzentrationen in der Winterzeit mit milden Temperaturen (Ghenghesh *et al.* 2001). Durch die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen können *Aeromonas* spp. lange in natürlichen und künstlichen Systemen überdauern. Die Lebensform im Biofilm ermöglicht zudem durch die hohen Zelldichten eine verbesserte Interaktion (Quorum Sensing), durch die wiederum Virulenzmechanismen beeinflusst werden können (Talagrand-Reboul *et al.* 2017).

Im Gegensatz zum Oberflächenwasser mit einer Vielzahl verschiedener Genotypen dominiert in Trinkwassersystemen meist sehr lange ein bestimmter Klon (Kühn *et al.* 1997). Grundsätzlich können *Aeromonas* spp. eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen in sehr niedrigen Konzentrationen nutzen, welche allerdings von besser angepassten Bakterien im Trinkwasser schneller zum Wachstum verwertet werden können. Ihr Wachstum im Trinkwassersystem ist daher eher durch die Nutzung von Biomasse der vorhandenen Biofilme und Sedimente bedingt (van der Kooij 1991). Durch die Fähigkeit, sich in Biofilme einzunisten, überdauern sie sehr lange, wobei sie mit kulturunabhängigen Methoden nachgewiesen werden können, wenn dies kulturell nicht mehr möglich ist (Bomo *et al.* 2004).

Allgemein sinkt die Kultivierbarkeit von *Aeromonas* spp. in nährstoffarmen Wasser nach 7 Wochen bei 4 °C und nach 10 Wochen bei 25 °C sehr stark ab, während aber die Zellzahl gleich bleibt. Durch eine Vorinkubation bei nährstoffarmen Bedingungen zeigt sich eine Verlängerung des Zeitraums, in

dem *Aeromonas* spp. kulturell nachweisbar bleiben (Wai *et al.* 2000; Mary *et al.* 2002). Auch bei Umweltisolaten kommt es zu einem verzögerten Übergang in den VBNC-Zustand (Casabianca *et al.* 2015). Durch Überführung in ein Medium, das Substanzen zum Abbau von Wasserstoffperoxid oder Katalase bzw. Natriumpyruvat enthielt, konnten in Versuchen von Wai *et al.* (2000) die Zellen wieder in den kultivierbaren Zustand gebracht werden. Zusätzlich ist zu beachten, dass Amöben, welche häufig an Grenzschichten oder als Teil der Biofilmgemeinschaft aufzufinden sind, eine Rolle als Reservoir und Vehikel bei Infektionen spielen können (Rahman *et al.* 2008).

1.7.1.2. Medizinische Bedeutung von *Aeromonas* spp.

Mit zunehmender Nutzung molekularbiologischer Nachweismethoden konnten *Aeromonas* spp. bei einer Vielzahl an extraintestinalen Infektionen nachgewiesen werden, darunter Augenentzündungen, Harnwegsinfekten, Infektionen von Wunden und Operationswunden, Meningitis und Sepsis sowie Abszessen der Leber bei immungeschwächten Personen (Pund und Theegarten 2008; Parker und Shaw 2011; Huys 2014). Aber auch eine Ausbreitung von *Aeromonas* spp. über den Blutkreislauf in den Atmungstrakt bei immungeschwächten Menschen scheint möglich (Janda und Abbott 1998; Igbiosa *et al.* 2012).

In Untersuchungen zeigte sich ein Kontakt von Wunden mit der Umwelt als wichtiger Risikofaktor von Wundinfektionen mit *Aeromonas* spp., wobei kontaminiertes Bodenmaterial und Wasser beide je gleich häufig als Quelle der Infektion fungierten (Lamy *et al.* 2009). Ebenfalls sind Lungenentzündungen durch Aspiration von kontaminiertem Wasser bei immungeschwächten Patienten zu berücksichtigen (Mukhopadhyay *et al.* 2003). Eine bedeutende Rolle scheinen *Aeromonas* spp. ebenfalls bei Lungenentzündungen ursprünglich gesunder Personen nach Beinahe-Ertrinken oder Unfällen einzunehmen, die zu einem großen Anteil zum Tod führen (Miyake *et al.* 2000).

Neben den zuvor beschriebenen Infektionstypen nehmen *Aeromonas* spp. eine unklare Rolle als Durchfallerreger ein. Da der Zielorganismus zudem auch sehr häufig bei Symptombfreiheit nachgewiesen wurde, gehen die Meinungen auseinander, ob einige *Aeromonas*-Stämme als intrinsische enterische Pathogene bewertet werden sollten (Abraham und Rohde 2014). In einer Expositionsstudie konnte nur bei einem geringen Anteil der Teilnehmer durch die Gabe von klinischen *A. hydrophila*-Isolaten eine Durchfallerkrankung ausgelöst werden (Morgan *et al.* 1985). Dies bedeutet, dass die Koch'schen Postulate für die Einstufung als Krankheitserreger bei *Aeromonas* spp. nicht vollständig erfüllt sind (Janda und Abbott 2010). Der Krankheitsverlauf ist zwar im Allgemeinen mild, es kann aber auch zu einem hämolytisch-urämischen Syndrom kommen (Janda und Abbott 2010). Ausbrüche von Durchfallerkrankungen sind durch den Konsum *Aeromonas*-kontaminierter Nahrungsmittel beschrieben (Isonhood und Drake 2002). Leider sind vollständige Dokumentationen größerer Ausbrüche von Durchfallerkrankungen derzeit nicht verfügbar (Parker und Shaw 2011).

Es findet sich jedoch auch die Saisonalität von *Aeromonas* spp. in aquatischen Systemen bei einzelnen Untersuchungen von Stuhlproben wieder, was auf vermehrtes Wachstum in diesen Umgebungen zurückzuführen sein könnte (Janda und Abbott 2010). Gestützt wird diese Vermutung durch genotypische Populationsanalysen mittels PFGE durch (Pablos *et al.* 2010, 2011). In anderen Untersuchungen zeigte sich jedoch keine Ähnlichkeit zwischen Isolaten aus Stuhlproben und Trinkwasserisolaten (Havelaar *et al.* 1992), und nach von Graevenitz (2007) korrelierte die Wiederfindung von *Aeromonas* in Wasserproben nicht mit klinischen Isolaten aus Stuhlproben, weswegen Empfehlungen der Kontrolle von *Aeromonas* spp. in Gewässern mit Bedacht zu geben seien.

Aeromonas spp. spielen zudem eine große Rolle als Fischpathogen in Aquakulturen oder bei frei lebenden Süß- und Salzwasserfischen. Hierunter sind vor allem die psychrophile Spezies *A. salmonicida* und unter den mesophilen Spezies *A. hydrophila* zu nennen (Beaz-Hidalgo und Figueras 2013).

Ob durch die verschiedenen *Aeromonas*-Stämme eine Erkrankung ausgelöst werden kann, hängt in großem Maße vom Vorliegen mehrerer Virulenzfaktoren ab. Hierbei sind zum Beispiel die Fähigkeiten zur Bildung von Hämolysin und weiterer Toxine zu nennen. Diese lassen sich relativ einfach über die Detektion entsprechender Gene mit PCR-basierten Methoden erfassen (Kingombe *et al.* 1999; Sen und Rodgers 2004) und werden bei der überwiegenden Mehrheit der Umwelt- und klinischen Isolate nachgewiesen (Berg *et al.* 2011; Aravena-Román *et al.* 2014). Bei der Untersuchung von Isolaten in Oberflächengewässern fällt ebenfalls auf, dass die Isolate häufig gleich über mehrere Virulenzfaktoren und zusätzlich über Antibiotikaresistenzen verfügen (Gibotti *et al.* 2000), die auch auf Phänotypenebene ausgebildet werden (Bhowmik *et al.* 2009).

1.7.1.3. Nachweis von *Aeromonas* spp. in Wasser

Bei einem Vergleich von zehn verschiedenen Medien durch Handfield *et al.* (1996) stellte sich Ampicillin-Dextrin-Agar als geeignetstes Medium zur Quantifizierung von *Aeromonas* spp. in Trinkwasser heraus. Bei Beeinträchtigungen durch eine starke Begleitflora kann alternativ auf Ampicillin-Gallensalz-Inositol-Xylose-Agar (MIX-Agar) zurückgegriffen werden (Villari *et al.* 1999). Es besteht bei diesen Medien jedoch die Einschränkung, dass das Wachstum einiger Ampicillin-sensiblen Spezies (*A. trota* sowie einige *A. caviae*- und *A. schubertii*-Stämme) gehemmt wird. Ein molekularbiologischer Nachweis bietet sich bei Umweltproben eher nicht an, da die Nachweisgrenze dieser Methoden als zu hoch angesehen wird (EPA 2006). Shannon *et al.* (2007) gaben bei einer PCR-basierten Konzentrationsbestimmung von Aeromonaden in Wasser eine Nachweisgrenze von 22 GU/Reaktion an.

Die routinemäßige Identifizierung von Umweltisolaten durch kommerzielle biochemische Identifizierungssysteme ist durch veraltete Datenbanken inklusive der Taxonomie sowie ungünstige Algorithmen und empfohlene zusätzliche Tests (Lamy *et al.* 2010) deutlich beeinträchtigt, was zu falschen Ergebnissen führen kann (Abbott *et al.* 1998). Eine vielversprechende Alternative hierzu könnte die Nutzung einer Identifizierung mittels MALDI-ToF-MS sein (Lamy *et al.* 2011).

1.7.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das insbesondere in feuchten Umgebungen ubiquitär vorkommt. Darunter fallen auch technische Einrichtungen zur Nutzung und Verteilung von Wasser. Bei kontaminierten Lebensmitteln, vor allem Gemüse, werden durchaus hohe Konzentrationen an *P. aeruginosa* gemessen, wohingegen in kontaminierten Trinkwassersystemen meist niedrige Gehalte zu verzeichnen sind (Hardalo und Edberg, 1997). Ursachen sind meist Fehler bei der Einrichtung der Hausinstallation oder bei Arbeiten am Leitungssystem (Wingender *et al.* 2009). Problematisch ist jedoch in jedem Fall eine hohe Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln, was bei der Chlorierung von Wasser zu beobachten ist (Grobe *et al.* 2001).

Das Bakterium wird der Gattung *Pseudomonas* innerhalb der Klasse der γ -Proteobakterien zugeordnet. Es ist gramnegativ sowie oxidasepositiv und liegt stäbchenförmig vor (Madigan *et al.* 2005). Auffällig ist, dass *P. aeruginosa* mit 5,5 bis 7 Mbp ein äußerst großes Genom besitzt und ein breites Spektrum an metabolischen Reaktionen nutzt. Das Genom setzt sich hierbei aus einem "Core-Genom" zusammen, das bei unterschiedlichen Stämmen kaum variiert, und einem "Accessory-Genom", das mit anderen Pseudomonaden per horizontalem Gentransfer ausgetauscht werden kann (Klockgether *et al.* 2011).

Während im offenen Ozean nur eine geringe Anzahl an Genotypen nachgewiesen werden kann (Khan *et al.* 2007), liegt in Fließgewässern eine hohe Diversität des Bakteriums vor. Dies ist ein Hinweis dafür, dass dieses Bakterium dort zur autochthonen Flora gehört (Pirnay *et al.* 2005). In Abwasser konnte *P. aeruginosa* durch Shannon *et al.* (2007) mit Hilfe PCR-basierter Messungen in Konzentrationen von etwa 10^4 GU/100 mL nachgewiesen werden. Die Autoren konnten dabei mit der

angewandten Methode eine vollständige Entfernung des Zielorganismus im Laufe der Aufbereitung in Kläranlagen feststellen.

1.7.2.1. Vorkommen im Trinkwassersystem, Bildung von Biofilmen und Übergang in den VBNC-Zustand

Dieser Bakterienart ist es möglich, eine sehr lange Zeit in Wasser zu überdauern. Boyle *et al.* (1991) gelang bis zu fünf Monate lang ein positiver kultureller Nachweis von *P. aeruginosa* in destilliertem Wasser über einen breiten Temperaturbereich. Einige Stämme, die auch als "mucoid" bezeichnet werden, sind in der Lage, große Mengen an extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) zu bilden. Verbunden ist dies meist mit einer starken Neigung Biofilme zu bilden, innerhalb der die Zellen - eingebettet in die EPS- stärker vor äußeren Einflüssen geschützt sind (Goeres *et al.* 2004). Besonders trifft dies auf die Resistenz gegenüber Chlor zu (Grobe *et al.* 2001; Buckingham-Meyer *et al.* 2007). Bei Desinfektionen mit hohen Konzentrationen an freiem Chlor kann der Biofilm als Reservoir dienen, während die planktonische Population von *P. aeruginosa* inaktiviert wird. Nach und nach werden anschließend wieder einzelne Zellen an die Wasserphase abgegeben. Zusätzlich kommt es hierbei auch zu einer Selektion resistenter, mucoider Stämme (Rice *et al.* 2012). Innerhalb von Hausinstallationen kann es auch zu einer Einnistung von *P. aeruginosa* in bestehende Biofilme kommen, welche dann über lange Zeiträume als Reservoir dienen können (Bressler *et al.* 2009; Moritz *et al.* 2010).

Eine Übertragung von *P. aeruginosa* über das Trinkwasser wurde durch Studien beleuchtet und stellt z. B. bei Krankenhäusern ein Problem dar (Exner *et al.* 2010). Dabei können unterschiedliche Expositionswege eine Rolle spielen (Falkinham *et al.* 2015). Eine Untersuchung auf *P. aeruginosa* kann in Deutschland vom Gesundheitsamt angeordnet werden, ist jedoch routinemäßig nicht vorgesehen (UBA 2002). Wegen der geringen Nährstoffansprüche kann es jedoch leicht zu einer raschen Vermehrung im Trinkwassersystem kommen und die durch das Bakterium hervorgerufenen Erkrankungen können unter Umständen einen sehr schweren Verlauf haben. Daher sind auch geringe Konzentrationen als kritisch zu werten (RKI 2002).

Unabhängig davon ist jedoch bei klinischen Isolaten oder bei abgeschlossenen Umgebungen häufig die Dominanz eines einzelnen Klons zu beobachten (Römling *et al.* 1994). Dwidjosiswojo *et al.* (2011) konnten zeigen, dass Kupfer aus Leitungsmaterialien einen VBNC-Zustand von *P. aeruginosa* bewirken kann. Nach Inaktivierung des Kupfers durch einen Chelator erlangte das Bakterium seine Kultivierbarkeit und pathogenen Eigenschaften zurück.

1.7.2.2. Medizinische Bedeutung von *P. aeruginosa*

Grundsätzlich kann *P. aeruginosa* durch jede Körperfläche, die kontaminiertem Wasser ausgesetzt ist, in den Körper eindringen (Rice *et al.* 2012). Infolgedessen können sich, vor allem bei immungeschwächten Menschen, schwere Infektionen ausbilden. Deutlich begünstigt wird eine Infektion, wenn das Gewebe bereits geschädigt ist (Hardalo und Edberg 1997). Betroffen sind jedoch auch gesunde Personen mit intakter Haut, bei denen der Krankheitsverlauf im Allgemeinen leichter ausfällt (Agger und Mardan 1995).

Je nach befallener Körperstelle kann es zu verschiedenen Erkrankungen kommen, darunter fallen unter anderem Harnwegsinfekte, Mastitis und Folliculitis (Gustafson *et al.* 1983). Ein großes Problem stellen außerdem Atemwegsinfekte dar, vor allem wenn eine Grunderkrankung wie cystische Fibrose vorhanden ist. Diese nehmen meist einen sehr langen chronischen Verlauf, wobei der ursprüngliche Klon auch noch nach mehreren Jahrzehnten nachweisbar ist (Tümmeler *et al.* 2014). Bei Badenden kommt es nach dem Schwimmen in kontaminierten Gewässern häufig bereits bei geringen Konzentrationen des Bakteriums zur Ausbildung einer Otitis externa – deutsch: Außenohrentzündung "Schwimmerohr" – (van Asperen *et al.* 1995). Bei Schwimmbädern und Whirlpools spielt diese durch

P. aeruginosa hervorgerufene Infektion ebenfalls eine Rolle (Havelaar *et al.* 1983). Eine medikamentöse Therapie gestaltet sich meist wegen vorhandener Resistenzen als schwierig und Umgebungen wie Krankenhäuser mit einem hohen Einsatz von Antibiotika fördern eine Selektion von Stämmen mit zusätzlichen Resistenzen (Deredjian *et al.* 2011).

Generell werden sowohl bei klinischen als auch bei *P. aeruginosa*-Isolaten aus der Umwelt pathogene Eigenschaften beobachtet (Alonso *et al.* 1999). Bei einigen gesunden Menschen scheint das Bakterium übergangsweise Bestandteil der Hautflora zu sein, ohne Symptome hervorzurufen (Meyer-Hoffert *et al.* 2011). Ebenfalls wurde das Bakterium vermehrt bei Patienten mit einem Reizdarmsyndrom nachgewiesen (Kerckhoffs *et al.* 2011). Ob und welche Rolle es bei der Erkrankung spielt, konnte bislang jedoch nicht abschließend geklärt werden. Einfluss auf das pathogene Potential können verschiedene Virulenzfaktoren haben (Hardalo und Edberg 1997).

1.7.2.3. Nachweis von *P. aeruginosa* in Wasser

Für den quantitativen und qualitativen Nachweis von *P. aeruginosa* ist eine Vielzahl von Medien bekannt, die alle unterschiedliche Einschränkungen, Sensitivität sowie Selektivität mit sich bringen. Zusätzlich erschweren subjektive Auswertungskriterien den Erhalt von reproduzierbaren Ergebnissen (Hardalo und Edberg 1997).

Die derzeit einzige in Deutschland gültige Norm DIN EN ISO 16266:2008 für die Untersuchung in Wasser ist relativ kostenintensiv und mit hohem Arbeitsaufwand verbunden (Heinemeyer und Luden 2009). Diese beinhaltet den Nachweis des häufig gebildeten grün-blauen Pigments Pyocyanin als ein entscheidendes Kriterium zur Identifizierung von *P. aeruginosa*.

Eine Studie von Schneider (2011) stellt das kommerzielle MPN-System Pseudalert[®] des Herstellers IDEXX als eine eventuelle Alternative vor. Dieses zeigte sich unempfindlicher gegenüber dem Einfluss der Probenmatrix im speziellen Fall von Naturfreibädern. Eine PCR-basierte Methode zum qualitativen Nachweis ist mit Hilfe des Exotoxin A-Gens als Zielsequenz ebenfalls möglich (Khan und Cerniglia 1994).

1.7.3. *Campylobacter* spp.

Die Bedeutung von *Campylobacter* spp. ist in den vergangenen Jahrzehnten stark angestiegen. Bis in die 1950er Jahre kamen Nachweise beim Menschen äußerst selten vor und es war lediglich ein Zusammenhang von Infektionen durch *Campylobacter* mit Fehlgeburten bei Schafen und Kühen bekannt (Skirrow 2006). Heutzutage stellen einige Spezies dieser Gattung die weltweit häufigste Ursache für eine bakteriell bedingte Gastroenteritis dar (Moore *et al.* 2005; WHO 2013).

1.7.3.1. Physiologie und Taxonomie

Campylobacter spp. werden gemeinsam mit unter anderem *Arcobacter* spp. in der Familie Campylobacteraceae innerhalb der ϵ -Proteobakterien zusammengefasst. Sie sind oxidasepositiv und liegen als gramnegative, gekrümmte bzw. S-förmige oder korkenzieherförmige Stäbchen mit einer Breite von 0,2 bis 0,8 μm und einer Länge von 0,5 bis 5 μm vor. Vor allem in älteren Zellkulturen können aber auch Kokken vorhanden sein. Die meisten Spezies sind durch den Besitz eines Flagellums beweglich. Viele Spezies haben eine vergleichsweise hohe optimale Wachstumstemperatur von 42 °C und es kann keine Vermehrung unterhalb von 30 °C beobachtet werden (Park 2002; Madigan *et al.* 2003; Levin 2007; Bolton 2015). *Campylobacter* spp. benötigen mikroaerophile und capnophile Wachstumsbedingungen mit einem optimalen Sauerstoffgehalt von 5 % und Kohlendioxidgehalt von 3 bis 5 % (Donnison 2003; Snelling *et al.* 2005).

Eine Energiegewinnung durch Fermentation oder Oxidation von Kohlenhydratquellen ist ihnen nicht möglich, sondern erfolgt durch Verwertung von Aminosäuren oder Intermediaten des Zitronensäurezyklus (Vandamme 2000, wie in Snelling *et al.* 2005 zitiert). Dabei wachsen

Campylobacter spp. relativ langsam, was eine lange Zeitspanne für einen kulturellen Nachweis bedeutet (Acheson und Allos 2001). Das Genom von *C. jejuni* ist inzwischen vollständig bekannt und mit 1,6 bis 1,7 Mbp relativ klein, was die Notwendigkeit von komplexen Nährmedien erklären könnte (Snelling *et al.* 2005).

Dem Genus *Campylobacter* werden derzeit 22 Spezies sowie 8 Subspezies zugeordnet, von denen viele humanpathogen sind. Am häufigsten werden dabei *C. jejuni* und *C. coli* mit Erkrankungen in Verbindung gebracht. In weitaus geringeren Fallzahlen werden jedoch auch *C. lari* und *C. upsaliensis* als Ursache einer *Campylobacter*-Enteritis ermittelt. Wegen ihrer Fähigkeit, bei einer relativ hohen Temperatur zu wachsen, werden die zuvor genannten Spezies auch als Gruppe der "thermotoleranten *Campylobacter*" bezeichnet (Paulin und On 2010).

1.7.3.2. Vorkommen in Oberflächengewässern und Umwelt

Campylobacter spp. sind in Gewässern weit verbreitet. Eingetragen werden sie durch Kläranlagenabläufe und Abflüsse landwirtschaftlich genutzter Flächen, aber auch Ausscheidungen von Wasservögeln, bei denen sie häufig Bestandteil der Darmflora sind (Martikainen *et al.* 1990; Abulreesh *et al.* 2004, 2006; Jones 2005). Ein Nachweis von *Campylobacter* spp. kann dabei als Anzeichen für eine unmittelbar zuvor erfolgte fäkale Verunreinigung gewertet werden, da diese sich nicht außerhalb von gleichwarmen Wirtstieren vermehren können und schneller inaktiviert werden als gängige Indikatorbakterien (Jones, 2001). Kommt es zu einem Eintrag von *Campylobacter* spp. über Kläranlagenabläufe in Fließgewässern, reduziert sich meist durch die rasche Aktivitätsabnahme und Verdünnungseffekte die Konzentration des Pathogens sehr schnell flussabwärts wieder (Bolton *et al.* 1987; Obiri-Danso und Jones 1999, wie zitiert durch Jones 2001). Befinden sich im Flussverlauf mehrere Punkteinleitungen von Kläranlagen, so nimmt die Konzentration nicht mit deren Anzahl zu (Rechenburg und Kistemann 2009). Bei starken Niederschlagsraten erhöht sich diese jedoch durch Mischwasserentlastungen um ein Vielfaches (Rechenburg und Kistemann 2009). Nach Jokinen *et al.* (2010) ist jedoch auch eine negative Korrelation mit Niederschlägen beobachtet worden.

Saisonale Konzentrationsunterschiede von *Campylobacter* spp. in Oberflächengewässern werden vor allem durch unterschiedliche Inaktivierungsraten zu den jeweiligen Jahreszeiten bestimmt (Jones 2001). Doch während im Herbst und Winter meist die höchsten Konzentrationen in Gewässern gemessen werden, kommt es eher im Frühjahr bis Sommer zu einem Peak in den *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen (Bolton *et al.* 1987; Carter *et al.* 1987; Brennhovd *et al.* 1992; Abulreesh *et al.* 2006; Wilkes *et al.* 2009).

Der Gehalt von *Campylobacter* spp. im Abwasser ist ebenfalls im Sommer etwa eine log-Stufe geringer als im Rest des Jahres, wobei jedoch keine direkte Korrelation mit einem einzelnen Parameter wie der Wassertemperatur, dem Sauerstoffgehalt, dem pH-Wert, der Niederschlagsintensität oder der Sonneneinstrahlung ermittelt werden kann (Koenraad *et al.* 1994). Mittels aerober, biologischer Aufbereitung von Abwasser können -bedingt durch den Einfluss des Sauerstoffs auf das mikroaerophile Bakterium, Anheftung an Partikel und Abbau durch Protozoen- die Konzentrationen des Pathogens um eine bis zwei log-Stufen gesenkt werden. Anaerobe Techniken sind hingegen wegen des mikroaerophilen Charakters von *Campylobacter* nur wenig zur Elimination geeignet (Koenraad *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist eine Reduktion durch Belebtschlamm-Verfahren um eine log-Stufe und durch biologische Tropfkörper um lediglich 0,6 log-Stufen möglich. Zusammengefasst beschreiben Rechenburg und Kistemann (2009) eine Reduktion von 1,75 bis 3,5 log-Stufen durch gängige Kläranlagen. Da mit den zuvor genannten Techniken keine komplette Elimination möglich ist, kann daher eine zusätzliche Desinfektion von Kläranlagenabläufen vor der Einleitung in Oberflächengewässer sinnvoll sein (Koenraad *et al.* 1994).

Die Diversität von *Campylobacter*-Populationen im Oberflächenwasser ist abhängig von der Eintragsquelle der Pathogene (Abulreesh *et al.* 2006). Bei einer Untersuchung von Flusswasser durch (Denis *et al.* 2011) konnte eine Vielzahl verschiedener Genotypen dokumentiert werden, was auf

unterschiedliche Eintragsquellen schließen lässt. In stehenden Gewässern wird dabei eher *C. coli*, in fließenden eher *C. jejuni* nachgewiesen (Kemp *et al.* 2005). Als mögliches Reservoir für *Campylobacter* spp. dienen in der Umwelt Vögel und Wiederkäuer (Stanley und Jones 2003). Die Infektion von Wasser- und anderen Vögeln verläuft meist symptomfrei, wobei deren erhöhte Körpertemperatur von 42 °C ideal für das Wachstum von *Campylobacter* spp. ist (Jones 2005). In den Ausscheidungen ist *C. jejuni* dabei häufiger enthalten als *C. coli* und *C. lari* (zusammengefasst in Abulreesh *et al.* (2006)).

Auch wenn Bakterien dieses Genus aus einer fäkalen Verunreinigung stammen, spiegeln häufig genutzte Indikatorparameter und –organismen nicht immer zuverlässig eine Belastungssituation mit diesen Organismen wider. In Studien wurde sowohl kein Zusammenhang (Carter *et al.* 1987; Arvanitidou *et al.* 1995; Kemp *et al.* 2005), schwache Zusammenhänge (St-Pierre *et al.* 2009), und nur vereinzelt eine gute Korrelation zu unterschiedlichen Parametern festgestellt (Brennhovd *et al.* 1992; Vereen *et al.* 2013). Bei einer Studie durch Hellein *et al.* (2011) mithilfe kulturunabhängiger Nachweise von *Campylobacter* spp. konnte ebenfalls keine Korrelation zu ausgewählten Indikatororganismen hergestellt werden.

Doch *Campylobacter* spp. finden sich nicht nur in der Wasserphase wieder. Bolton *et al.* (1999) gelang ein Nachweis in 45 % der Sandproben von ausgewählten Badestränden. Die Nachweisrate im Sand von Stränden, die nicht den Standards entsprachen, war dabei nur leicht erhöht. Auch wenn ein Nachweis bei feuchtem Sand häufiger gelang, wurden die Pathogene trotz ihrer Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung auch in trockenem Sand nachgewiesen.

1.7.3.3. Überlebensstrategien, “Viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand und Vorkommen im Biofilm

Auch wenn sich aus dem Genom regulierende Gene, die bei anderen enterischen Bakterien wie *E. coli* oder *Salmonella enterica* einen Übergang in den VBNC-Zustand bewirken, nicht ableiten lassen, können *Campylobacter* spp. unter einigen Bedingungen relativ lange in der Umwelt überleben. Dies lässt darauf schließen, dass sie über Strategien verfügen, die sich deutlich von denen anderer Bakterien unterscheiden (Murphy *et al.* 2006). Generell wird jedoch auch bei ihnen durch subletalen Stress eine Antwort ausgelöst, die sie resistenter gegenüber Umweltbedingungen macht und je nach Stamm variieren kann (Murphy *et al.* 2003).

Von Tholozan *et al.* (1999) wurde bei der Inkubation eines *C. jejuni*-Stamms in Oberflächenwasser nach etwa 15 Tagen ein VBNC-Zustand erreicht. Dabei unterschieden sich die Zellen deutlich von denen im kultivierbaren Zustand. Die Zellform war kürzer und dicker bis hin zum Vorliegen unbeweglicher Kokken, mit einer im Verhältnis zum Volumen kleinen Oberfläche (Thomas *et al.* 1999a). Zusätzlich nahm der Kaliumgehalt deutlich ab, der zellinterne pH-Wert und der ATP-Gehalt der Zellen fielen auf ein sehr niedriges Niveau. Der Proteingehalt sank nicht, es war ein vermehrter Wassergehalt der Zellen und eine Änderung der Fettsäurezusammensetzung in der Membran zu verzeichnen (Tholozan *et al.*, 1999).

Die Rolle, die nichtkultivierbare *Campylobacter* spp. bei Ausbrüchen spielen, ist unklar (Abulreesh *et al.* 2006) und Ergebnisse der mit kulturabhängigen und kulturunabhängigen Methoden ermittelten Konzentrationen (Rollins und Colwell 1986) können sich stark unterscheiden. Zu der Zeitspanne, wie lange *Campylobacter* spp. im Flusswasser kultivierbar bleiben können, liegen unterschiedliche Erfahrungen vor. Diese reichen von 43 h bei 4 °C und zwischen 6 h und 22 h bei 37 °C bis hin zu einem Zeitraum von länger als 4 Monaten bei 4 °C (Rollins und Colwell 1986; Obiri-Danso *et al.* 2001; González und Hänninen 2012). Das Ausmaß der Abnahme wird dabei durch Sauerstoffgehalt und Konzentration organischer Substrate beeinflusst (Buswell *et al.* 1998; Tatchou-Nyamsi-König *et al.* 2007)

Als größter Stressfaktor für *Campylobacter* spp. wird eine Nährstoffknappheit angesehen. Diese kann sich drastisch auf die Kultivierbarkeit und Fähigkeit zur Adhäsion bzw. Invasion in Wirtszellen auswirken. Die Menge an verfügbaren Kohlenstoffquellen beeinflusst zudem die Diversität und die Persistenz von *Campylobacter* spp. in Biofilmen sehr stark (Korhonen und Martikainen, 1991; Buswell *et al.*, 1998a; Mihaljevic *et al.*, 2007). Zusätzlich ist die Überlebensfähigkeit des Organismus stark von der Temperatur abhängig. Überschreitet die Temperatur einen gewissen Wert, bildet das Bakterium Heat-Shock Proteine, um sich zu schützen (Konkel *et al.*, 1998). Grundsätzlich ist die Überlebensfähigkeit bei 4 °C gegenüber 30 °C deutlich verbessert, beeinflusst von pH-Wert und Salzkonzentration. Dabei zeigen Patientenisolat eine gesteigerte Fähigkeit bei 4 °C zu überdauern als tierische Isolate (Chan *et al.* 2001). *Campylobacter* spp. besitzt eine hohe Anfälligkeit gegenüber einer Photoinaktivierung (Sinton *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung bieten fehlende Nachweise zu einem Reparaturmechanismus von photobiologischen DNA-Schädigungen. Generell zeigen sich dennoch Umweltisolate als resistenter gegenüber UV-Strahlung (Obiri-Danso *et al.*, 2001). Bei Laborversuchen, die die UV-Einwirkung während der Sommerzeit abbilden sollten, war bereits nach 10 min kulturell mehr als eine log-Stufe Abnahme der Konzentration zu verzeichnen. Nach 40 min war kein Nachweis für *C. jejuni* und *C. coli* mehr möglich. Bei Umweltproben mit natürlichen *Campylobacter*-Populationen in Flusswasser und künstlicher Sonneneinstrahlung gelang bereits nach 25 min kein kultureller Nachweis mehr (Obiri-Danso *et al.* 2001). Eine weitere charakteristische Eigenschaft von *Campylobacter* spp. ist eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung (Doyle und Roman 1982).

Die Fähigkeit zur Persistenz in der Umwelt ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich. *C. lari* konnte bei einzelnen Studien besser in Oberflächengewässern überdauern als *C. jejuni* oder *C. coli* (Obiri-Danso *et al.* 2001). Thomas *et al.* (1999b) konnten nur bei bestimmten Umweltbedingungen eine höhere Persistenz von *C. lari* feststellen und beschrieben *C. jejuni* als widerstandsfähigste Spezies. Sie stellten fest, dass *Campylobacter* länger in nährstoffreichem Flusswasser gegenüber deionisiertem Wasser nachzuweisen war. Ein zusätzlicher Eintrag von Sediment bewirkte jedoch bei ihren Untersuchungen keine verlängerten Nachweiszeiträume.

Trotz fehlender Kultivierbarkeit kann eine Anheftung der Zellen an die Darmschleimhaut (Patrone *et al.* 2013) und somit eine Infektion nach einer Verweilzeit in Oberflächengewässern noch für mehrere Wochen möglich sein (Jones *et al.* 1991). Eine Wiedererlangung des kultivierbaren Zustandes durch die Passage eines tierischen Wirts ist möglich (Saha *et al.* 1991; Baffone *et al.* 2006), jedoch nicht immer erfolgreich im Laborversuch nachgewiesen worden (Ziprin und Harvey 2004). Ein Gelingen ist dabei abhängig von Stamm und Alter der VBNC-Zellen (Talibart *et al.* 2000).

Neben tierischen Wirten können *Campylobacter* spp. mit eukaryotischen Einzellern interagieren. Sie nutzen Amöben und einige Algen als Wirt für das Überleben und eventuell auch zur Vermehrung unter ungünstigen Umweltbedingungen (Axelsson-Olsson *et al.* 2010). Auch bei einem solchen intrazellulären Vorliegen in Einzellern kann es zu einer *Campylobacter*-Infektion beim Menschen kommen (Snelling *et al.* 2008). Für Systeme, in denen gleichzeitig *Acanthamoeba polyphaga* vorliegt, wurde bereits ein längeres Überleben beschrieben (Axelsson-Olsson *et al.* 2005).

Bezüglich der bakteriellen Begleitflora wurden sowohl positive als auch negative Effekte auf das Überleben durch Anwesenheit einer autochthonen Flora berichtet (Buswell *et al.* 1998). Allgemein ist das Überleben besser je niedriger die Konzentration der Begleitflora ist. Durch die Anwesenheit von Biofilmen hingegen scheint dieses positiv beeinflusst zu werden (Buswell *et al.* 1998; Pitkänen 2013). Eine Fähigkeit Biofilme zu bilden ist vor allem für *C. jejuni* beschrieben, aber auch für andere Spezies auf unterschiedlichen Oberflächen nachgewiesen (Gunther und Chen 2009). Dabei haben Biofilm-Zellen nach Entfernung aus dem Zellverband ein schlechteres Überlebensverhalten als planktonisch angezüchtete Zellen, was den Erkenntnissen über andere Pathogene widerspricht. Dykes *et al.* (2003) begründen ihre Ergebnisse damit, dass die von anderen Organismen bekannten Mechanismen einer Stressantwort bei *Campylobacter* zu fehlen scheinen. Unter aeroben Bedingungen kommt es verstärkt

zur Bildung von Biofilmen, aus denen kontinuierlich hohe Mengen an Zellen wieder an die Wasserphase abgegeben werden (Reuter *et al.* 2010). Dieses ermöglicht *Campylobacter* spp. ein Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen und stellt ein bedeutendes Reservoir dar.

Verglichen mit Biofilmen aus Reinkulturen bleibt bei einem Mischkulturbiofilm mit *P. aeruginosa* die Kultivierbarkeit länger erhalten und es besteht eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Strömungen (Ica *et al.* 2012). Culotti und Packman (2015) beschreiben ein Wachstum von *C. jejuni* auf der Oberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmen, wenn eine Biofilmbildung des Organismus allein nicht möglich ist. Lehtola *et al.* (2006) berichten ebenfalls von einer verlängerten Nachweisbarkeit in Trinkwasserbiofilmen.

1.7.3.4. Medizinische Bedeutung von *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. werden erst seit den 1970er Jahren bei Patienten mit den entsprechenden Symptomen routinemäßig isoliert (Dekeyser *et al.* 1972; Skirrow 1977). Es sind davor jedoch auch einige Ausbrüche durch "Vibrio-ähnliche" Erreger beschrieben worden, die im Nachhinein dem Genus *Campylobacter* zugeordnet werden konnten. Möglicherweise wurden sie schon Ende des 19. Jahrhunderts durch Escherich mikroskopisch nachgewiesen. Aufgrund der fehlenden kulturellen Nachweise wurde jedoch geschlossen, dass die spiralförmigen Zellen keine ursächliche Bedeutung hatten, und seine Veröffentlichungen sind lange Zeit in Vergessenheit geraten (Butzler 2004).

Bei einer Erkrankung durch *Campylobacter* spp. stellen sich die Symptome meist 2-5 Tage nach der Infektion ein und halten für etwa 3-6 Tage an. Beschwerden äußern sich durch akute selbstlimitierende Durchfälle, Fieber und Unterleibskrämpfe. In 8-10 % der gemeldeten Fälle wird eine Behandlung in einem Krankenhaus nötig, was Schätzungen zufolge etwa 0,5 % der Gesamtheit der Erkrankungen entspricht. Es wird dabei davon ausgegangen, dass die Letalitätsrate bei etwa 0,01 % liegt. Abgesehen von einer Elektrolytgabe ist in den meisten Fällen keine medikamentöse Behandlung nötig. Neben den akuten Symptomen einer Durchfallerkrankung kann eine Infektion mit *Campylobacter* allerdings auch chronische Folgeerkrankungen auslösen. Bekannt ist ein Zusammenhang mit dem Guillain-Barré-Syndrom, einer Erkrankung des Nervensystems, und reaktiver Arthritis (Reiter-Syndrom) (Nachamkin 2002; Paulin und On 2010). Außer der vorrangigen Rolle als Gastroenteritiserreger sind auch sporadisch akute extraintestinale Infektionen, z. B. der Mundschleimhaut beschrieben worden (Snelling *et al.* 2005).

Campylobacter spp. verfügen über mehrere Virulenzfaktoren. Zum einen Mobilität durch ein Flagellum und Chemotaxis, die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion sowie das Bilden von Toxinen, ein Vorliegen spezieller Oberflächenstrukturen und ein System zur Aufnahme von Eisen (van Vliet *et al.* 2002; Dasti *et al.* 2010; Bolton 2015). Trotz der beschriebenen medizinischen Probleme bei Kühen und Schafen kommt *C. fetus* beim Menschen zwar bei systemischen Infektionen vor, ist jedoch nicht bekannt, Fehlgeburten auszulösen (Moore *et al.* 2005).

Betrachtet man die Relevanz der einzelnen Spezies, ist *C. jejuni* für 80-85 % der Infektionen verantwortlich, gefolgt von *C. coli* mit 10 %- 15 %. Andere Spezies wie *C. lari* werden seltener nachgewiesen und können sich in ihrem Vorkommen regional stark unterscheiden (Lastovica und Roux 2000).

Bedingt durch steigende Fallzahlen und gravierenden Folgeerkrankungen wird *Campylobacter* eine bedeutende Stellung zugeschrieben (Moore *et al.* 2005). Dazu trägt ebenfalls bei, dass die Infektionsdosis des gastrointestinalen Pathogens bei Ingestion sehr niedrig ist. In Studien mit Freiwilligen wurden bereits 800 Zellen als ausreichend für eine Infektion ermittelt (Black *et al.* 1988). Medema *et al.* (1996) leiteten eine Illness-to-infection-Rate von 22 % ab und gaben an, dass sich die Erkrankungsrate zwischen den einzelnen Isolaten zu unterscheiden scheint. Unter Einbeziehung zusätzlicher Daten von Ausbruchssituationen wurde die ermittelte Dosis-Wirkungsbeziehung von Teunis *et al.* (2005) weiter verfeinert.

Eine Betrachtung der gemeldeten Erkrankungsfälle im Untersuchungsgebiet Nordrhein-Westfalen sowie Deutschland insgesamt macht deutlich, dass die Bedeutung des Pathogens auch dort stetig steigt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Registrierte Fälle der Erkrankungen durch *Campylobacter* spp. in den unten angegebenen Zeiträumen nach Auskunft des Robert-Koch-Instituts (SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 28.11.2016)

Jahr	Gemeldete Erkrankungsfälle in Deutschland	Gemeldete Erkrankungsfälle in Nordrhein-Westfalen
2012	62.923	15.904
2013	63.652	16.019
2014	71.011	19.458
2015	70.261	19.452

Derzeit gibt es keine anerkannten Impfungen beim Menschen. Ein Einsatz von Medikamenten kann die Erkrankung nicht gänzlich verhindern, sondern nur behandeln, was eventuell zur Bildung von Resistenzen beiträgt (WHO 2013). Allgemein nehmen die Resistenzen von *Campylobacter* spp. gegen Fluorchinolone vor allem durch Einsatz in der Nutztierhaltung in Europa, Asien und den USA (Butzler 2004) stark zu. Gegenüber Erythromycin sind *Campylobacter* spp. sehr empfindlich (Butzler 2004) hier sind aber ebenfalls bereits Resistenzen beschrieben (Aarestrup und Engberg 2001; Moore *et al.* 2006).

Trotz der weiten Verbreitung von *Campylobacter* in der Umwelt ist häufig nicht klar, welche Rolle dies bei der Epidemiologie spielt. Ein wichtiger Grund dafür ist, dass meist keine parallele Typisierung von Umwelt- und Patientenisolaten stattfindet (Snelling *et al.* 2005).

1.7.3.5. Risikofaktoren für eine Infektion

In einer Studie über die wasserbürtigen Infektionen in England war *Campylobacter* die häufigste Ursache von Erkrankungen durch eine private Wasserversorgung (Furtado *et al.* 1998). Eine Untersuchung zur Epidemiologie von Frost (2001) beschrieb Wasser -noch vor kontaminiertem Geflügelfleisch- als bedeutendsten Vektor für Ausbrüche von Campylobacteriose. In anderen Studien wurde die Nahrungsquelle bzw. die Tierhaltung als Hauptquelle für Infektionen identifiziert (Wilson *et al.* 2008; Mughini-Gras *et al.* 2012). 90 % der Erkrankungen treten meist sporadisch in der Sommerzeit auf. Eine mögliche Erklärung dafür sind vermehrte risikoreiche Aktivitäten z. B. Grillen oder Trinken von unbehandeltem Wasser (Thomas *et al.* 1999a; Snelling *et al.* 2005; Humphrey *et al.* 2007).

Das Schwimmen in natürlichen Gewässern wurde als zusätzliche Risikoquelle für *Campylobacter*-Infektionen identifiziert (Koenraad *et al.* 1997; Schönberg-Norio *et al.* 2004), wenn auch in einer anderen Studie gezeigt wurde, dass Schwimmen im Meer, Bädern und Seen niedrigere Erkrankungsraten bewirkt (Kapperud *et al.* 2003). Es ist aber hierbei zu beachten, dass die Erfassung von Ausbrüchen, die durch die Nutzung von Freizeitgewässern bedingt sind, schwieriger ist als Infektionen über das Trinkwasser (Pitkänen 2013).

Das Risiko einer Infektion ist stark erhöht, wenn das Immunsystem altersbedingt oder durch Vorliegen anderer Grunderkrankungen geschwächt ist (Moore *et al.* 2005). Auch eine durch Medikamente verringerte Bildung von Magensäure kann dies bewirken (Neal *et al.* 1996) sowie eine Erkrankung an Diabetes (Neal und Slack 1997). Auch wenn *Campylobacter* generell empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten ist, könnte die Ingestion in Verbindung mit Milch, die puffernd wirkt und somit

den pH-Wert innerhalb des Magens senkt schon bei einer geringeren Zellzahl eine Infektion hervorrufen. Ähnliches gilt bei der Aufnahme einer größeren Menge von Wasser (Blaser *et al.* 1980). Durch die regelmäßige Aufnahme kleiner Dosen von *Campylobacter* spp. kann eine Immunität erworben werden. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass in Ländern, in denen die Erkrankung weit verbreitet ist, ein Sinken der Illness-to-Infection-Rate mit steigendem Alter beobachtet werden kann (Calva *et al.* 1988).

1.7.3.6. Nachweis von *Campylobacter* spp. in Wasser

Um die gewünschte Sensitivität zu erreichen, müssten aufgrund der niedrigen Konzentrationen von *Campylobacter*, sowohl für den kulturabhängigen als auch für den kulturunabhängigen Nachweis, sehr große Volumina untersucht werden (Pitkänen 2013).

Den Medien zum Nachweis von *Campylobacter* spp. wird häufig Blut oder Aktivkohle zugesetzt, um toxische Effekte von Sauerstoffderivaten zu minimieren (Corry *et al.* 1995). Auch bei der derzeit gültigen genormten Methode nach ISO 17995:2005 zum Nachweis von *Campylobacter* in Wasser werden solche Medien eingesetzt. Bei dem dort beschriebenen Verfahren ist ein direkter quantitativer Nachweis nicht möglich, da zunächst eine selektive Voranreicherung erfolgen muss. Es werden dazu zwei unterschiedlich stark selektive Bouillons vorgegeben. Wie auch bei anderen Bakterienarten kann eine Verwendung verschiedener Medien sehr unterschiedliche Ergebnisse bewirken, die untereinander nicht unbedingt vergleichbar sind (Murphy *et al.* 2005).

Zur Bestätigung und weiteren Identifizierung von Isolaten stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung. Zum einen kann auf Latex-Agglutinationsassays zurückgegriffen werden (Nachamkin und Barbagallo 1990). Ebenfalls kommerziell erhältliche biochemische Identifizierungssysteme (wie z.B. API® Campy der Firma bioMérieux) sollen eine Identifizierung auf Speziesebene möglich machen. Die Methode der matrix-assisted desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) kann hingegen auch sehr kurzfristig erfolgen und die Methode zeigt in Studien eine hohe Sensitivität (Martiny *et al.* 2011). Ist eine Genotypisierung mittels PFGE erwünscht, so stehen umfangreiche Datenbanken zur Verfügung. Eine klassische Serotypisierung kann ebenfalls zur weiteren Charakterisierung durchgeführt werden, zeigte sich aber häufig nicht als ausreichend (Paulin und On 2010).

Generell besteht bei den traditionellen Nachweismethoden von *Campylobacter* spp. in Umweltproben noch Optimierungspotential. Pitkänen *et al.* (2009) verwenden beispielsweise eine neu entwickelte Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) mit mikroaerophiler Atmosphäre und berichten von signifikant höherer Wiederfindung bei der Untersuchung von Trinkwasser als bei statischen Standardmethoden der ISO 17995:2005 unter Verwendung von Bolton-Bouillon.

Für einen kulturunabhängigen Nachweis sind verschiedene methodische Ansätze möglich. Zum einen haben Poppert *et al.* (2008) ein Set von Sonden zur FISH entwickelt, die für unterschiedliche Gruppen und Spezies von *Campylobacter* spezifisch sind. Diese ermöglichen eine Erfassung der thermotoleranten *Campylobacter* und eine Identifizierung der Spezies *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsaliensis*. Auch ein direkter Nachweis von *Campylobacter* spp. in Flusswasser und Schlamm kann so mittels FISH erfolgen. Dabei sind die Nachweisgrenzen mit 10^3 bzw. 10^4 Zellen/100 mL jedoch sehr hoch. Auch bei einer vorherigen Anreicherung ist dies nur ab einer Konzentration von 10^2 Zellen/100 mL für Flusswasser und 10^3 Zellen / 100 mL für Schlamm möglich (Moreno *et al.* 2003). Zur Anreicherung kann bei dieser Methode eine Membranfiltration eingesetzt werden (Lehtola *et al.* 2005).

Eine Vielzahl von unterschiedlichen Protokollen steht für den Nachweis via PCR zur Verfügung. Darunter erprobten Alexandrino *et al.* (2004) ein PCR-Protokoll für den Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* im Abwasser mit einer Nachweisgrenze von 2×10^3 GU/100 mL. Park *et al.* (2011) entwickelten eine Multiplex-PCR zum simultanen Nachweis von *Campylobacter* spp., *Salmonella* und

E. coli O157:H7 in Oberflächenwasser basierend auf dem SYBR-Green Prinzip. Ebenfalls mittels Multiplex-PCR haben LaGier *et al.* (2004) und Toplak *et al.* (2012) eine Methode zur gleichzeitigen Erfassung und Unterscheidung von *C. jejuni* und *C. coli* erarbeitet. Wird die Erfassung von lebenden Zellen gewünscht so kann eine PMA-qPCR, wie in Josefsen *et al.* (2010) und Bae und Wuertz (2012) beschrieben, eingesetzt werden.

Sails *et al.* (2002) haben den Einsatz eines PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) als Nachweismethode für *C. jejuni* und *C. coli* in Oberflächenwasser getestet. Dabei wurde eine Übereinstimmung in 86 % der getesteten Proben gefunden. Unterschiedliche Befunde könnten nach Meinung der Autoren zum einen durch unterschiedliche Nachweisgrenzen der Methode und zum anderen dadurch, dass mittels ELISA auch VBNC-Zellen erfasst werden können, bedingt sein. Die Dauer des Untersuchungsganges mittels ELISA verkürzt sich dabei um 2 bis 3 Tage.

1.7.4. *Salmonella* spp.

Das Genus *Salmonella* umfasst nur zwei Spezies, *S. bongori* und *S. enterica*, welche wiederum sechs Subspezies beinhaltet. Sie sind in der Familie der Enterobacteriaceae verankert und sind stäbchenförmig, gramnegativ, oxidasenegativ sowie fakultativ anaerob. Eine Fähigkeit, Sporen zu bilden, besteht nicht und die meisten Stämme sind beweglich. Je nach Art ihrer Oberflächenantigene wird *S. enterica* in über 2.500 unterschiedliche Serovare eingeteilt, die alle Infektionen beim Menschen hervorrufen können. Dabei werden die O-Antigene (Lipopolysaccharide) und H-Antigene (Flagella-Komplex) an der Zelloberfläche berücksichtigt (McQuiston *et al.* 2008).

Auf Grundlage klinischer Symptome werden die Serovare in zwei Gruppen, typhoidale (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, *S. Paratyphi* B, *S. Paratyphi* C) und nichttyphoidale *Salmonellen* eingeteilt. Während nichttyphoidale Serovare eine im Normalfall selbstlimitierende Gastroenteritis hervorrufen, wird von Serovaren der typhoidalen Gruppe enterisches Fieber mit Unterleibsschmerzen, Erbrechen und starker Diarrhoe ausgelöst (Bell *et al.* 2016). Neben Menschen können auch andere Säugetiere, Vögel, Reptilien mit *Salmonella* spp. infiziert werden. Die Erreger können ebenfalls mit Pflanzen, Algen und Insekten assoziiert sein (Byappanahalli *et al.* 2009; Dolejská *et al.* 2009; Jokinen *et al.* 2011; Levantesi *et al.* 2012). Diese spielen eventuell auch als Vektor eine Rolle (Winfield und Groisman 2003).

1.7.4.1. *Salmonella* spp. in der Umwelt und Gewässern

In Oberflächengewässern werden *Salmonellen* regelmäßig nachgewiesen. Aber auch eine Kontamination des Grundwassers und ein Überleben des Organismus in Salzwasser sind möglich. Je nach Region ist der Gehalt in Gewässern häufig durch oberflächliche Abflüsse bedingt. Häusliche Abwässer bzw. Kläranlagen und Intensivtierhaltung können zusätzlich zur Belastung von Gewässern mit *Salmonellen* beitragen (Jokinen *et al.* 2010; Vereen *et al.* 2013). Dabei sind die Konzentrationen im Abwasser mit 10^2 - 10^3 KBE/100 mL sehr hoch. Eine Aufbereitung von Abwasser mit dem Belebtschlammverfahren kann eine Reduktion um mindestens eine log-Stufe bewirken, die aber nicht so hoch ist wie bei dem Indikatororganismus *E. coli* (Wéry *et al.* 2008). Je nachdem ob eine Vorbehandlung stattgefunden hat, können auch durch das Aufbringen von Dung große Mengen von *Salmonellen* in die Umwelt eingebracht werden. Diese können sehr lange in Boden und Sedimenten überdauern (Abdel-Monem und Dowidar 1990; Chandran *et al.* 2011) und vor allem nach Niederschlägen auf den behandelten landwirtschaftlichen Flächen im Boden auf höhere Konzentrationen anwachsen (Zaleski *et al.* 2005). Generell sind, abhängig von den jeweiligen Gegebenheiten, positive Korrelationen mit Niederschlagsmengen beschrieben (Wilkes *et al.* 2009; Jokinen *et al.* 2010; Levantesi *et al.* 2012). Bei anderen Untersuchungen war dieser Zusammenhang nicht eindeutig (McEgan *et al.* 2013) oder sogar gegenteilig (Vereen *et al.* 2013). Ein weiteres häufiges Problem in der Landwirtschaft ist die Nutzung kontaminierter Bewässerungsteiche, wodurch eine spätere Aufnahme von *Salmonellen* über die Nahrung möglich ist.

Tendenziell zeigt das Bakterium eine saisonale Abhängigkeit mit höheren Nachweisraten im Herbst (Wilkes *et al.* 2009). Die Zusammenhänge zu gängigen Indikatoren, die das Vorliegen von *Salmonella* spp. in der Umwelt anzeigen sollen, sind dabei komplex (McEgan *et al.* 2013). Während Arvanitidou *et al.* (1997) eine gute Korrelation mit Indikatorbakterien beschreiben, war diese mit kulturunabhängigen Methoden von Ahmed *et al.* (2009) nicht festzustellen. Vereen *et al.* (2013) berichten von einer verbesserten Aussagekraft von intestinalen Enterokokken gegenüber von *E. coli*, bei dem nur eine schwache Korrelation mit dem Gehalt an Salmonellen besteht (McEgan *et al.* 2013). Unter Umständen können Bacteroidales eine Alternative zu den gängigen Fäkalindikatorbakterien darstellen. Es findet sich jedoch auch bei diesen keine uneingeschränkte Eignung (Walters *et al.* 2007; Levantesi *et al.* 2012). Auch bei der Abwesenheit von Indikatororganismen wurden *Salmonella* spp. nachgewiesen (Moriñigo *et al.* 1990). Sie kommen sporadisch bei niedrigen Konzentrationen von Indikatorbakterien an Badestränden vor (Polo *et al.* 1998) und wurden von Mansilha *et al.* (2010) an Stränden mit guter und ausgezeichneter Badewasserqualität nach EU-Badegewässerrichtlinie identifiziert. Ein wichtiger zu beachtender Faktor ist zusätzlich, dass die Konzentrationen innerhalb des Sediments von Gewässern deutlich höher ausfallen können (Hendricks 1971). Untersuchungen der Serovarverteilung in Oberflächengewässern zeigen sowohl einen menschlichen als auch einen tierischen Ursprung der Verunreinigungen. Dabei konnten auch klinisch bedeutsame Serovare parallel in Oberflächengewässern nachgewiesen werden (Polo *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2013).

1.7.4.2. VBNC-Zustand von *Salmonella* spp. und das Vorkommen in Biofilmen und Wasserinstallationen

Generell sind Salmonellen auch außerhalb des Wirts sehr überlebensfähig. Sie wurden auch in unwirtlichen Lebensräumen wie dem Granitgestein eines Gebirges nachgewiesen (Thomason *et al.* 1975). Betrachtet man die Kultivierbarkeit, so nimmt der Anteil der kultivierbaren Zellen nach 72 h in Flusswasser deutlich ab, während mit kulturunabhängigen Methoden noch über 6 Wochen konstante Konzentrationen gemessen werden können (Domingo *et al.* 2000). Biofilme tragen zum Überleben bei, da Salmonellen innerhalb des Biofilms geschützt gegenüber Stressfaktoren wie Austrocknung und Desinfektion sind (Steenackers *et al.* 2012). Eine Bildung von Biofilmen durch Salmonellen wurde auf unterschiedlichsten abiotischen und biotischen Oberflächen beobachtet (Steenackers *et al.* 2012). Auch eine Einnistung in bestehende Biofilme von Wassersystemen wurde im Labormaßstab gezeigt, in denen *S. enterica* eine lange Zeit überdauern und sich sogar vermehren kann (Armon *et al.* 1997). Innerhalb häuslicher Abwassersysteme bleiben sie nach Ende einer Erkrankung so noch über Monate nachweisbar (Barker und Bloomfield 2000).

Salmonellen verfügen über allgemeine Stressantwort-Systeme, die durch einzelne Stressbedingungen ausgelöst werden und sie auf mögliche ungünstige Lebensräume im späteren Verlauf vorbereiten. Dies verbessert auch ihre Überlebenschancen außerhalb des Wirts und eine Persistenz in der Umwelt (Spector und Kenyon 2012). Im Gegensatz zu *Campylobacter* ist bei Salmonellen keine verstärkte Anfälligkeit zur Photoinaktivierung in Fluss- und Salzwasser nachgewiesen worden (Sinton *et al.* 2007). Dies bestätigt sich auch in Feldstudien von Sassoubre *et al.* (2011), bei denen sich herausstellte, dass eine Photoinaktivierung im Gegensatz zu Indikatorbakterien eine untergeordnete Rolle spielt. Grundsätzlich bewirkt die UV-Strahlung jedoch zusammen mit der Prädation durch Protozoen (Mezrioui *et al.* 1995), Bakteriophagen und der Konkurrenz mit Begleitflora eine Aktivitätsabnahme in wässrigen Lebensräumen (Chandran *et al.* 2005). Positiv auf ein Überleben in Gewässern wirken sich wiederum gelöste Kohlenstoffquellen und niedrigere Konzentrationen autochthoner Organismen und Schutz durch Sedimente zum Beispiel vor grasenden Protozoen aus (Rhodes und Kator 1988; Fish und Pettibone, 1995; Chandran *et al.* 2011).

Vor allem bei niedrigeren Temperaturen von unter 10 °C ist es Salmonellen möglich, wesentlich länger als der Indikatororganismus *E. coli* im Wasser zu überdauern (Rhodes und Kator 1988). Dies ist in erster Linie dadurch bedingt, dass der Lebenszyklus von Salmonellen an die Ausscheidung in die

Umwelt und die Übertragung auf einen neuen Wirt angepasst ist. Innerhalb des Erdbodens können Salmonellen ebenfalls Zeiträume von bis zu einem Jahr überdauern (Davies und Wray 1996). Zusätzlich verfügt *Salmonella* spp. über eine hohe Toleranz gegenüber osmotischem Stress (Mezrioui *et al.* 1995). Auch der Übergang in einen VBNC-Zustand ist für Salmonellen beschrieben. In einer Studie von Roszak *et al.* (1984) hat *Salmonella* spp. bei Inkubation in Flusswasser die Kultivierbarkeit nach 48 h verloren, konnte aber durch eine Zugabe von Nährstoffen für einige Zeit wieder in den kultivierbaren Zustand überführt werden.

Salmonellen sind in der Lage Biofilme unter unterschiedlichen Umweltbedingungen zu bilden, für die eine Reihe unterschiedlicher Strukturkomponenten genutzt werden. Die Inkorporation in Biofilme bietet dabei nachweislich einen Schutz gegenüber für Salmonellen ungünstigen äußeren Einflüssen wie Austrocknung, Desinfektionsmitteln oder Antibiotika (Steenackers *et al.* 2012). Vor allem bei nicht-typhoidalen Stämmen wird vermutet, dass die Bildung von Biofilmen dazu beiträgt, außerhalb des Wirts überdauern zu können (Liu *et al.* 2018). Es ist jedoch noch unklar, ob sich Salmonellen in Biofilmen von aquatischen Systemen auch relevant vermehren können (Sha *et al.* 2013).

1.7.4.3. Medizinische Bedeutung von *S. enterica*

S. enterica gehört mit zu den häufigsten bakteriellen Erregern von Darmerkrankungen. Die Gruppe der typhoidalen Salmonellen kann mit Typhus und Paratyphus sehr ernste Erkrankungen bewirken (Levantesi *et al.* 2012). Die zugehörigen *S. enterica*-Serovare Typhi und Paratyphi sind hierbei wirtsspezifisch für Menschen (Gordon 2008) und werden hauptsächlich in Entwicklungsländern über das Wasser verbreitet (Sánchez-Vargas *et al.* 2011). Eine Ansteckung mit non-typhoidalen Salmonellen erfolgt hingegen meist über kontaminierte Lebensmittel. Es sind jedoch auch wasserbürtige Ausbrüche beschrieben. Die Freizeitnutzung von belasteten Gewässern kann eine der wichtigsten Ursachen für Salmonellen-Infektionen während der Kindheit darstellen (Levantesi *et al.* 2012). Auch lange nach Abklingen der Symptome werden typhoidale Serovare von 1-4% der Infizierten dauerhaft ausgeschieden, bei nichttyphoidalen Serovaren ist der Anteil mit 0,1-1% deutlich geringer. Generell kann eine Antibiotikagabe den Trägerstatus zusätzlich verlängern (Sánchez-Vargas *et al.* 2011).

Majowicz *et al.* (2010) berechneten weltweit etwa 94 Millionen Fälle *S. enterica* bedingter Erkrankungen pro Jahr mit etwa 155.000 Todesfällen. Dabei konnten -entgegen bekannter Expositionsstudien an Freiwilligen- schon Dosen von 10 Zellen ausreichend sein, um eine Krankheit hervorzurufen. Allgemein scheinen Ausbruchssituationen bei niedrigen Dosen von $<10^3$ häufig aufzutreten (Hornick *et al.* 1970 in Blaser und Newman 1982).

Im Untersuchungsgebiet in Nordrhein-Westfalen sind die Zahlen der gemeldeten Erkrankungsfälle durch Salmonellen in den vergangenen Jahren rückläufig (siehe Tabelle 4). Dieser Trend bestätigt sich auch bei einer Betrachtung der bundesweit registrierten Fälle.

Tabelle 4: Registrierte Fälle der Erkrankungen durch *S. enterica* in den unten angegebenen Zeiträumen nach Auskunft des Robert-Koch-Instituts (SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 28.11.2016)

Jahr	Erkrankungsfälle in Deutschland	Erkrankungsfälle in Nordrhein-Westfalen
2012	20.861	4.430
2013	18.989	3.895
2014	16.233	3.282
2015	13.869	2.963

Eine Erkrankung wird durch Immunschwäche deutlich begünstigt, was besonders in entwicklungsschwachen Ländern sehr problematisch ist (Feasey *et al.* 2012). Bei immungeschwächten Patienten besteht zudem auch das besondere Risiko, an einer Bakteriämie durch non-typhoidale Salmonellen zu erkranken, verbunden mit einer stark erhöhten Letalität (Brown und Eykyn 2000; Gordon 2008). Für das weit verbreitete Serovar *S. Typhimurium* sind über die vergangenen Jahrzehnte immer mehr Resistenzen gegenüber Antibiotika, bedingt durch den Einsatz in der Nutztierhaltung, beschrieben worden, die sich rasch verbreitet haben (Rabsch *et al.* 2001). Resistenzen stellen auch bei *S. Typhi* und *S. Paratyphi* ein weltweites Problem dar, beginnend mit einer Resistenz gegen Chloramphenicol und anschließend gegen β -Lactam-Antibiotika, Chinolone und Azithromycin (Sánchez-Vargas *et al.* 2011). Inzwischen werden multiresistente *Salmonella*-Stämme auch in Oberflächengewässern in Entwicklungsländern gefunden (Levantesi *et al.* 2012).

Um Infektionen zu vermeiden, werden Impfungen gegen typhoidale Salmonellen in Risikoländern empfohlen. Impfstrategien gegen non-typhoidale Salmonellen bei Nutztieren sind ebenfalls möglich (Sánchez-Vargas *et al.* 2011).

1.7.4.4. Nachweis von *S. enterica* in Wasser

Ein kultureller Nachweis von *S. enterica* ist sehr umfangreich, sodass ein Ergebnis frühestens nach einer Woche vorliegt. Zur Untersuchung von Wasser existiert mit DIN EN ISO 19250:2013 eine genormte Nachweismethode. Diese sieht jedoch zunächst nur eine qualitative Bestimmung des Zielorganismus vor und ist nicht zur Erfassung typhoidaler Serovare geeignet. Eine Anreicherung des Zielorganismus wird nach diesem Verfahren über die Verwendung der selektiven Rappaport-Vassiliadis-Bouillon mit Soja (RVS) erreicht. Da die Selektivität dieses Mediums zum Teil auf osmotischem Stress beruht, ist je nach Probenmatrix eine Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser empfohlen. Dadurch soll verhindert werden, dass vorgeschädigte Zellen durch die zusätzlichen Stressbedingungen ihre Kultivierbarkeit verlieren. Im Anschluss an die Flüssiganreicherung erfolgt ein Ausstrich auf unterschiedlichen festen Nährmedien. Dabei ist Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) sowie ein zusätzliches, vom Labor wählbares Medium zu verwenden. Kolonien, die durch Salmonellen gebildet werden, können auf diesen durch charakteristische Stoffwechselreaktionen identifiziert werden. Zusätzlich ist bei einem Nachweis nach dieser Norm eine weitere biochemische Identifizierung der gewonnenen Isolate mit Hilfe unterschiedlicher Bestätigungsmedien vorgesehen.

Für genauere Identifizierungen, die über die Anforderungen der Norm hinausgehen, wird zudem häufig auf Untersuchungen mittels MALDI-ToF-MS zurückgegriffen (Gomba *et al.* 2016). Ist eine Genotypisierung gewonnener Isolate erwünscht, basiert diese meist auf einer Analyse mittels PFGE (Bell *et al.* 2016), da in diesem Fall mit PulseNet ausreichend große Vergleichsdatenbanken vorhanden sind (Swaminathan *et al.* 2001).

Bei einem kulturunabhängigen Nachweis mittels PCR stellt die hohe Nachweisgrenze von etwa 10^2 GU/Reaktion, was meist oberhalb der Konzentrationen im Oberflächengewässer liegt, ein erhebliches Problem dar. Umgangen werden kann dieses zwar mit einer Voranreicherung, was jedoch auch einige Schwachstellen hat. Zum einen verlängert sich die Dauer des Nachweises deutlich, zum anderen kommt es zu einem Enrichment Bias und die ebenfalls erhöhten Mengen der Begleitflora können die Güte der anschließenden PCR negativ beeinflussen (Bell *et al.* 2016). Um eine Anreicherung und Separierung der Zellen dennoch erreichen zu können, wurden bislang Aptamer- (Jyoti *et al.* 2011; Singh *et al.* 2012) und Phagen-basierte Techniken eingesetzt (Laube *et al.* 2014; Chattopadhyay *et al.* 2016).

Ein häufig eingesetztes Zielgen für den Nachweis in Oberflächengewässern ist das *invA*-Gen der Salmonellen, das an der Invasion in die Wirtszelle beteiligt ist (Ahmed *et al.* 2009). Jyoti *et al.* (2010) haben ebenfalls für den qPCR-Nachweis des *invA*-Gens ein Protokoll mit Nutzen der Molecular Beacon-Techniken entwickelt. Bei einem Test mehrerer Primerpaare mit vielen unterschiedlichen

Stämmen von Malorny *et al.* (2003) zur Standardisierung des Nachweises via PCR wurde das Set von Rahn *et al.* (1992) als am selektivsten befunden. Bonetta *et al.* (2011) hingegen gelang es, ein Protokoll für die PCR-basierte Quantifizierung in Oberflächengewässern mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze von 3 GU/L zu etablieren.

In Bezug auf die PMA-qPCR, um zwischen lebenden Zellen unterscheiden zu können, gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen zur Anwendbarkeit. Li und Chen (2013) konnten eine optimale Selektion mit einem 130 bp Amplikon und einer 50 µM PMA-Konzentration vornehmen, bei Banihashemi *et al.* (2012) gelang dies nur bei Auswahl eines deutlich größeren Amplikons und einer geringeren PMA-Konzentration. Barbau-Piednoir *et al.* (2014) jedoch konnten eine Veränderung der mittels qPCR ermittelten Konzentration nicht auf Zellmembranintegrität zurückführen und schlagen eine konventionelle Anreicherung und anschließende Bestätigung via PCR vor.

Eine alternative Methode kulturunabhängiger Konzentrationsermittlung von lebensfähigen Zellen mit Hilfe der PCR wurde von González-Escalona *et al.* (2009) entwickelt. Sie führten eine reverse Transkriptase (RT)-qPCR der *invA*-mRNA durch. Da jedoch kein konstantes Verhältnis der mRNA-Gehalte pro Zelle in den unterschiedlichen Wachstumsphasen gegeben ist, ist diese Methode zum einen nicht sehr genau und verfügt unter Umständen auch über eine sehr hohe Nachweisgrenze.

Neben den PCR-basierten Methoden existieren auch Protokolle zum Nachweis von Salmonellen in Oberflächengewässern und Abwasser mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA), wie durch Ho und Tam (2000) beschrieben. Diese schließen eine Voranreicherung mit ein.

1.7.5. *Legionella* spp.

Bei *Legionella* spp. handelt es sich um natürlicherweise in Gewässern auftretende Umweltbakterien, die unter einer Vielzahl verschiedener Bedingungen in diesen überdauern können (Fliermans *et al.* 1981). Sie liegen als gramnegative Stäbchen mit einer Breite 0,3 µm bis 0,9 µm und einer Länge von 2 µm bis 20 µm vor, sind nicht sporenbildend und katalasepositiv. In klinischen Proben sind häufig auch Kokken oder bei einigen Nährmedien verlängerte Filamente zu beobachten (Diederer 2008). Als Energie- und Kohlenstoffquelle werden Aminosäuren verwendet, sie nutzen keine Fermentation (EPA 1999; Mekour *et al.* 2013). Einige Spezies wachsen besser bei einem Kohlendioxidgehalt der Atmosphäre von 2 - 5 % (Cunha *et al.* 2016). Ein Überleben in Wasser ist in einer breiten Temperaturspanne von 0 °C bis 63 °C möglich mit einem pH-Wert zwischen 5,0 und 8,5 sowie einer Sauerstoffkonzentrationen von 0,2 bis 15 ppm (EPA 1999). Das Genus *Legionella* wird als einziges der Familie *Legionellaceae* zugeordnet und besteht aus 58 Spezies und drei Subspezies, von denen etwa 30 Infektionen -vor allem der unteren Atemwege- hervorrufen. Die bekannteste Spezies *L. pneumophila* kann wiederum in mindestens 16 Serogruppen unterteilt werden (Harrison und Saunders 1994; Diederer 2008; Cunha *et al.* 2016).

Eine Vermehrung von Legionellen findet in der Umwelt intrazellulär in Protozoen statt. Im Vergleich zur Anzucht unter Laborbedingungen ist die Vermehrung innerhalb eines Wirtes bei einigen Legionellenstämmen mit einer erhöhten Virulenz verbunden (Cirillo 1994, 1999). Die Wirtszelle bietet dem Bakterium zusätzlich auch Schutz gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen wie wechselnden Temperaturen und Austrocknung aber auch Desinfektionsmitteln (EPA 1999) sowie die Möglichkeit des Transportes in bessere Lebensräume (Declerck *et al.* 2009). Der Lebenszyklus von *Legionella* spp. kann dabei in zwei Phasen unterteilt werden. Die post-exponentielle Phase ist durch die Suche nach einem Wirt gekennzeichnet. Die Zelle ist kurz und mobil durch die Ausbildung einer Flagelle. Die Stressresistenz sowie die Natriumsensibilität sind erhöht. Eine Aufnahme der Wirtszelle durch Phagozytose bildet den Übergang in die exponentielle Phase, in der die Replikation stattfindet. Die Zellen besitzen keine Flagellen, verlängern sich und bilden Filamente aus. Es wird eine herabgesetzte Cytotoxizität und Stressresistenz, dafür jedoch eine erhöhte Natriumresistenz beobachtet. Nach etwa 48 Stunden sind die Bakterien im Übermaß in der Zelle vorhanden, woraufhin es zur Zelllyse und Freigabe in die Umwelt kommt verbunden mit einem Wiederübergang in die

infektiöse Phase (Steinert *et al.* 2002; Fields *et al.* 2002; Phin *et al.* 2014). Neben Protozoen bietet auch eine Einnistung in Biofilmen *Legionella* spp. Schutz vor Umwelteinflüssen. Diese ermöglicht eine längere Persistenz in aquatischen Systemen, und auch die Kultivierbarkeit bleibt länger erhalten (Surman *et al.* 1994).

Neben natürlichen aquatischen Systemen als Reservoir für Legionellen finden diese auch in künstlichen Wassersystemen und vor allem beim Eintrag in Kühlwassersystemen gute Vermehrungsbedingungen (Carducci *et al.* 2010; Cunha *et al.* 2016). Bei der Betrachtung der Abwasserbehandlung ist auffällig, dass mit den gängigen Methoden kaum eine signifikante Reduktion von *Legionella* spp. zu erreichen ist (Palmer *et al.* 1993; Roll und Fujioka 1995). Kläranlagenabläufe können somit eine relevante Quelle für einen erhöhten Eintrag in Gewässer darstellen (van Heijnsbergen *et al.* 2015). Problematisch ist zudem, dass bei der biologischen Aufbereitung eine Überführung in Aerosole stattfinden kann (Blatny *et al.* 2008).

1.7.5.1. Überleben und Wechselwirkung mit anderen Bakterien

Legionellen sind im Allgemeinen empfindlich gegenüber Austrocknung (Katz und Hammel 1987). Innerhalb von Aerosolen ist ein Überleben bei warmem Klima und vor allem einer hohen Luftfeuchtigkeit verlängert (Hambleton *et al.* 1983; Dunn *et al.* 2013). Die Resistenz gegenüber einer chlorbasierten Desinfektion ist relativ hoch und wird durch die Inkorporation in Biofilme noch einmal deutlich gesteigert (Cooper und Hanlon 2010). Generell ist bei ungünstigen Umweltbedingungen ein Übergang von *Legionella* spp. in den VBNC-Zustand möglich, in dem immer noch eine Bildung von Virulenzproteinen nachgewiesen werden kann (Alleron *et al.* 2013; Mekhour *et al.* 2013). Werden diese Zellen bei der Konzentrationsbestimmung mitberücksichtigt, so können 0,6 bis 2 log-Stufen höhere Werte erfasst werden als bei einer rein kulturbasierten Nachweismethode (Buse *et al.* 2012). Eine Rückführung in den kultivierbaren Zustand ist durch eine Wirtspassage beispielsweise in Amöben möglich (Al-Bana *et al.* 2014). Zu Amöben liegt eine starke Assoziation als Wirtsorganismus, wie im vorherigen Abschnitt innerhalb des zweiphasigen Lebenszyklus beschrieben, vor. Ebenfalls bietet die Lebensweise von Amöben einen Schutz vor Umwelteinflüssen. Legionellen sind sehr gut an Amöben als Wirtszellen angepasst, was auf einen langen Zeitraum der Co-Evolution hindeutet (Richards *et al.* 2013).

Der Großteil der Zellen liegt gebunden im Biofilm vor (Rogers *et al.* 1994). Diese können sich sowohl an der Grenzschicht zu Feststoffen als auch an der Luft-Wassergrenzschicht befinden (Declerck 2010). Hierbei ist eine Anreicherung im Biofilm beschrieben (Żbikowska *et al.* 2014). Generell bewirkt die Anwesenheit von Sediment und autochthoner Mikroorganismen eine verbesserte Überlebensfähigkeit unter anderem durch die Bereitstellung von Nährstoffen (Fliermans *et al.* 1981; Stout *et al.* 1985). Es kann aber auch gegenteiliger Effekt, bedingt durch Bildung von Bakteriziden, eintreten (Cotuk und Dogruoz 2005; Guerrieri *et al.* 2008).

1.7.5.2. Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung und Verteilung

Bei der Aufbereitung von Oberflächenwasser wird die Konzentration und Diversität von *Legionella* spp. stark reduziert (Lesnik *et al.* 2016). Hierbei spielt jedoch die Wahl des Verfahrens eine bedeutende Rolle. Das Verfahren der Langsamsandfiltration ist nicht zur Elimination geeignet und hat -wie die Flockung- kaum einen Einfluss auf die Diversität. Im Gegensatz dazu kann mittels Ozonung eine Reduktion der Konzentration von einer log-Stufe erreicht werden (Wullings *et al.* 2011). Durch eine Chlorierung wurde von Eichler *et al.* (2006) eine grundlegende Veränderung der Populationszusammensetzung beobachtet. Gegenüber der Verwendung von Grundwasser für die Trinkwasseraufbereitung kann bei Oberflächenwasser ein Trend höherer Konzentrationen von Legionellen bei der Bestimmung mittels qPCR beobachtet werden (Wullings und van der Kooij 2006). Trinkwasserbedingte Infektionen durch Legionellen treten vermehrt in Industrienationen auf, da in diesen ideale Wachstumsbedingungen in Form von komplexen Wasserkreisläufen und

Warmwasseranlagen von 35 °C bis 55 °C häufiger anzutreffen sind (Bhopal 1993). Dabei können die verwendeten Leitungsmaterialien das Wachstum hemmen oder auch fördern. Auf den Biofilmen an Grenzschichten kann auch hier eine Einnistung und Anreicherung von Legionellen erfolgen (Moritz *et al.* 2010; Phin *et al.* 2014). Stagnation trägt ebenfalls zu einer Vermehrung von Legionellen bei (Buse *et al.* 2012). Zur Eindämmung der Konzentration innerhalb des Systems kann eine Erhitzung auf mehr als 60 °C oder UV-Bestrahlung eingesetzt werden (Blanc *et al.* 2005; Triassi *et al.* 2006).

1.7.5.3. Medizinische Bedeutung

Zuerst beschrieben wurde das Pathogen *L. pneumophila* von Fraser *et al.* (1977), nachdem es zu einem gehäuften Auftreten von Lungenentzündungen bei einem Treffen der American Legion in Philadelphia gekommen war. In den nachfolgenden Untersuchungen gelang es erstmals, den Erreger mit Hilfe spezieller Nährmedien zu isolieren. Mit den neu gewonnenen Erkenntnissen konnten im Nachhinein einige frühere Ausbrüche von Lungenerkrankungen unbekannter Ursache ebenfalls *L. pneumophila* als Krankheitserreger zugeordnet werden (Diederer 2008). Eine Infektion erfolgt dabei fast immer durch Inhalation von *Legionella*-haltigen Aerosolen. Bei *L. longbeachae* scheint sich der Übertragungsweg zu unterscheiden, ist aber noch nicht vollständig geklärt (Amodeo *et al.* 2010). Extrapulmonale Infektionen, die nicht durch Inhalation eines kontaminierten Aerosols bedingt sind wie zum Beispiel Wundinfektionen, sind sehr selten (Maiwald *et al.* 1998).

Durch Legionellen können zwei grundlegend verschiedene Krankheitsbilder hervorgerufen werden. Bei der Legionärskrankheit treten nach einer Inkubationszeit von 2 – 14 Tagen Symptome einer atypischen Lungenentzündung mit hohem Fieber auf, die eine Behandlung im Krankenhaus notwendig machen können. Zusätzlich kommt es häufig zu Begleitsymptomen wie Diarrhoe, Funktionsstörungen der Niere, Bradykardie und neurologischen Beeinträchtigungen. Die Letalitätsrate beträgt 10 - 20 %, kann aber bei immungeschwächten Erkrankten auch höher ausfallen (Maiwald *et al.* 1998; Cunha *et al.* 2016). Das Pontiac Fieber ist von der Legionärskrankheit vor allem durch seinen wesentlich milderen Verlauf abzugrenzen. Nach einer kurzen Inkubationszeit von nur 1 - 2 Tagen kommt es zu einer fiebrigen, grippeähnlichen Erkrankung. Es kommt zu keiner Entzündung der Lunge, und ein tödlicher Verlauf ist nicht zu erwarten. Möglicherweise durch eine fehlende Vermehrung im Atemtrakt ist bei diesem Krankheitsbild kein kultureller Nachweis von Legionellen möglich (Maiwald *et al.* 1998). Erkrankungen von Pontiac Fieber werden wegen milder Symptome meist nur bei größeren Ausbrüchen registriert. Tendenziell tritt die Legionärskrankheit eher bei älteren und Pontiac Fieber bei jüngeren Personen auf (Phin *et al.* 2014).

Legionella spp. gehören nicht zu den klassischen an den Menschen angepassten pathogenen Bakterien, sondern Veränderungen in der menschlichen Lebensweise haben zu einer Gefährdung durch dieses Genus geführt (Steinert *et al.* 2002). Die Wechselwirkung mit dem Immunsystem unterscheidet sich deutlich von anderen Bakterien, denn es findet eine Vermehrung in den Phagosomen innerhalb der Makrophagen der Lungenalveolen statt (Abu Kwaik 1998; Steinert *et al.* 2002). Der zweiphasige Lebenszyklus mit intrazellulärer Vermehrung, wie analog bei Protozoen als Wirt, bleibt somit auch bei Infektionen des Menschen erhalten (Flieger *et al.* 2003; Jules und Buchrieser 2007; Mekhour *et al.* 2013). Es sind verschiedene Virulenzfaktoren, wie die Bildung von Phospholipasen und Cytotoxinen sowie das Gen *mip* bekannt, das im Zusammenhang mit der Invasion in Wirtszellen steht (Dowling *et al.* 1992; Fields *et al.* 2002; Flieger *et al.* 2003).

L. pneumophila ist virulenter als andere Spezies und bildet deshalb einen Schwerpunkt in der Forschung (Mekhour *et al.* 2013). Vor allem *L. pneumophila* Serogruppe 1 ist für die meisten Fälle von Legionärskrankheit in Europa verantwortlich (Phin *et al.* 2014). Die Serovarverteilung in Umweltproben unterscheidet sich davon deutlich, sodass der Anteil der Serogruppe 1 bei diesen deutlich geringer ausfällt (Muder und Yu 2002; Doleans *et al.* 2004). Die genaue Höhe der Infektionsdosis ist nicht bekannt (Mekhour *et al.* 2013). Es wurde jedoch eine Verbindung zwischen Kontaminationsgraden und dem Erkrankungsrisiko festgestellt (O'Neill und Humphreys 2005). Bei

Dosis-Response-Studien im Tiermodell wurden bereits bei einer sehr geringen Dosis von etwa 5 KBE Infektionen beschrieben, auch wenn ein verbreitetes Auftreten von Symptomen erst bei höheren Dosen nachzuweisen war (Muller *et al.* 1983). Dabei spielt der genaue Inhalationsweg und die Wachstumsbedingungen des Stammes eine große Rolle (Fitzgeorge *et al.* 1983).

Ein Anstieg der Erkrankungsfälle ist im Sommer (Fliermans *et al.* 1981; Diederer 2008) beziehungsweise bei feuchtem, warmem Klima zu beobachten (Fisman *et al.* 2005). Bei der Nutzung von Freizeitgewässern werden dabei Tauchen und Beinahe-Ertrinken als zusätzliche Risikofaktoren diskutiert (Farrant *et al.* 1988; Faris *et al.* 2005; van Heijnsbergen *et al.* 2015). Kommt es zur Legionärskrankheit, kann eine antibiotische Behandlung mit Makroliden, Tetracyclinen und Chinolonen erfolgen. Derzeit sind noch keine Probleme mit erworbenen Resistenzen bei der Antibiotikabehandlung beschrieben. Eine Verwendung von Antibiotika bei Pontiac-Fieber ist nicht notwendig (Maiwald *et al.* 1998; Diederer 2008; Cunha *et al.* 2016). Die Letalitätssrate der Legionärerkrankung ist innerhalb der letzten Jahrzehnte zurückgegangen (Benin *et al.* 2002). Dennoch sind die derzeitigen Methoden zur Risikobewertung verbesserungsfähig, was das Problem einer wahrscheinlichen Untererfassung der Fälle miteinschließt (Cunha *et al.* 2016).

In Deutschland wurden in den Jahren 2012 bis 2015 zwischen 653 und 923 Fälle von Legionellose durch das Robert-Koch-Institut registriert (Tabelle 5). Auf das Land Nordrhein-Westfalen entfallen dabei zwischen 158 und 319 Fälle. Eine Vielzahl der 2013 in NRW gemeldeten Fälle ist dabei auf eine Ausbruchssituation in Warstein zurückzuführen (RKI 2013).

Tabelle 5: Registrierte Fälle der Erkrankungen durch Legionellen in den unten angegebenen Zeiträumen nach Auskunft des Robert-Koch-Instituts (SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 28.11.2016)

Jahr	Erkrankungsfälle in Deutschland	Erkrankungsfälle in Nordrhein-Westfalen
2012	656	158
2013	923	319
2014	858	204
2015	881	212

1.7.5.4. Nachweis von *Legionella* spp. in Wasser

Trotz der weiten Verbreitung in der Umwelt sind die Anforderungen von *Legionella* spp. für eine erfolgreiche Kultivierung sehr spezifisch (EPA 1999). So wachsen sie am besten bei der Verwendung von Labormedien, die die intrazellulären Bedingungen des Wirtes simulieren anstatt der Umweltbedingungen in wässrigen Systemen (Fields *et al.* 2002). Einige Spezies, die phylogenetisch mit Legionellen verwandt sind, können mit Hilfe der gängigen Medien allein nicht subkultiviert werden. Eine Vermehrung scheint nur in passenden Wirtszellen wie Amöben möglich, weswegen sie als “*Legionella*-like amoebal pathogens“ bezeichnet werden. Die Rolle dieser Pathogene wurde bisher nicht abschließend geklärt (Adeleke *et al.* 1996; Marrie *et al.* 2001; Cunha *et al.* 2016). Bei einigen bisher erfolgreich isolierten *Legionella*-Spezies empfiehlt sich ebenfalls eine Co-Kultivierung mit Amöben (Fallon und Rowbotham 1990).

In vielen Standardmethoden zur Erfassung von Legionellen werden den Nährmedien Eisen, L-Cystein und α -Ketoglutarat sowie Aktivkohle und Hefeextrakt für ein verbessertes Wachstum zugesetzt (Maiwald *et al.* 1998; Diederer 2008). Dies trifft auch für die genormten Nachweismethoden nach ISO 11731:1998 und DIN EN ISO 11731-2:2008 zu, die sich derzeit in Überarbeitung befinden. Die standardisierten kulturbasierten Methoden haben meist die Einschränkung, dass sie nicht gleich gut an

alle Spezies angepasst sind und mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Untererfassung zu rechnen ist (Buse *et al.* 2012). Problematisch ist auch, dass gesicherte Ergebnisse erst nach frühestens 10 Tagen zur Verfügung stehen (Behets *et al.* 2007). Aus diesem Grund wurden verschiedene Testsysteme und Methoden entwickelt, die eine Erfassung von nicht kultivierbaren Zellen und eine Verkürzung der Analysedauer realisieren sollen. Für die Erfassung von *L. pneumophila* mittels qPCR wird häufig das *mip*-Gen eingesetzt. Hierfür haben Shannon *et al.* (2007) eine Methode für den Nachweis im Abwasser und Behets *et al.* (2007) eine Duplex TaqMan qPCR mit interner Prozesskontrolle und einer Nachweisgrenze von etwa 6 GU/100 mL entwickelt. Horng *et al.* (2006) koppeln für einen qualitativen Nachweis ein PCR- und ein Immunochromatographie-Verfahren (PCR–ICT), das auch eine Unterscheidung von *L. pneumophila* und übrigen Spezies möglich macht. Weitere alternative Methoden binden verschiedenste Techniken wie ein DNA-Microarray (Zhou *et al.* 2011), eine Durchflusszytometrie (Füchslin *et al.* 2010; Taguri *et al.* 2011), eine FISH von *Legionella* spp. (Grimm *et al.* 1998) und *L. pneumophila* (Bauer *et al.* 2008), eine Immunomagnetische Separation (Allegra *et al.* 2011) gefolgt von einer kulturellen oder PCR-basierten Quantifizierung (Yáñez *et al.* 2005) oder einen Nachweis mittels Peptid-Nukleinsäure-Sonden (Wilks und Keevil 2006) ein (zusammengefasst in Buse *et al.* 2012).

Ist eine Typisierung gewonnener *Legionella* spp.-Isolate erwünscht, so hat sich die PFGE als internationaler Standard mit umfangreichen verfügbaren Datenbanken durchgesetzt (Phin *et al.* 2014). Eine biochemische Identifizierung bis auf Speziesebene kann mit dem BIOLOG-System erzielt werden (Mauchline und Keevil 1991).

2. Material

2.1. Verwendete Bakterienstämme

Referenzstämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 30187	(ATCC 7966)
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689	(ATCC 33559)
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478	(ATCC 19433)
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	(ATCC 11775)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 30104	(ATCC 13883)
<i>Legionella pneumophila</i>	DSM 7513	(ATCC 33152)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	(ATCC 27853)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1128	(ATCC 9027)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071	(ATCC 10145)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DSM 50342	(ATCC 14909)
<i>Pseudomonas corrugata</i>	DSM 7228	(ATCC 29736)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090	(ATCC 13525)
<i>Pseudomonas luteola</i>	DSM 6975	(ATCC 43273)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	DSM 50017	(ATCC 25411)
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291	(ATCC 12633)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 5190	(ATCC 17588)

Umweltisolate und sonstige Bakterienstämme

Alle im Folgenden aufgelisteten Stämme sind Bestandteil der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Aquatischen Mikrobiologie des Biofilm-Centres (Universität Duisburg-Essen).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AdS:	Isolat aus einer Selbstschluss-Armatur der kontaminierten Hausinstallation einer Schule (Moritz <i>et al.</i> 2010)
<i>Salmonella</i> Typhimurium UMR1:	Virulente Mutante des Stammes <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028-1s (Römling <i>et al.</i> 1998)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 17:	Isolat Ruhr, Mülheim a. d. Ruhr (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 18:	Aufwuchs eines Abflusses in der Hausinstallation, Gelsenkirchen (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 29:	Isolat Ruhr, Mülheim a. d. Ruhr (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 31:	Flusssediment Ruhr, Mülheim a. d. Ruhr (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 50:	Beckenwasser, öffentliches Schwimmbad Kleve (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 81	Aufwuchs eines Abflusses in der Hausinstallation eines Fleischzerlegebetriebs, Duisburg, mucoid (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1:	Stammsammlung Lehrstuhl für Mikroorganismen Ruhr-Universität Bochum (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PT 1:	Teichwasser, Mülheim a. d. Ruhr (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PT 31:	Trinkwasser, Duisburg (Grobe 1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 14:	Patientenisolat (Rahme <i>et al.</i> 1995)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> FRD 1:	Isoliert aus Sputum eines Patienten mit cystischer Fibrose, mucoid (Ohman, Chakrabarty 1981)

2.2. Geräte

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Großgeräte und Laborequipment

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	BP 210	Sartorius
Binokular	M26	Leica
Bottle top Filter	Nalgene® 0,2 µm	Thermo Fisher
Edelstahlfiltrationseinheit	6x, kleine Volumina	Millipore
Epifluoreszenzmikroskop Objektiv Okular Geldokumentationseinheit	Eclipse Ni-E CFI Planochromat DM 100x Oil CFI Okular 10x/22 GelDoc™ XR	Nikon Bio-Rad
Gelelektrophoreseeinheit Laufkammer	HE 33 mini horizontal submarine unit	Amersham Biosciences
Spannungsquelle	Power Pack P 25	Biometra
Heizblock/Mischer	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Shake 'n' Stack	Thermo Scientific
Inkubatoren	Kelvitron® t HERAtherm™ RC26PLUS	Heraeus Thermo-Fisher Sorvall
Kühlzentrifuge (große Volumina) Rotor	SS-34	
Kühlzentrifuge (Kleine Volumina)	Biofuge Fresco Heraeus Fresco 21	Heraeus Thermo Scientific
LED-Lampe für Reaktionsgefäße	PhAST Blue	GeUL
Lichtmikroskop/Phasenkontrast- mikroskop	DM LS	Leica
Magnetrührer	RET basic	IKA®-Werke
Membranfiltrationseinheit, Edelstahl		Sartorius
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite 200 PRO	Tecan
Muffelöfen	K 114	Heraeus
Multiparameter-Messgerät Leitfähigkeitselektrode pH-Elektrode Sauerstoffelektrode PCR-Cycler	340i TetraCon® 325/S SenTix NR. einfügen CellOx 325 Mastercycler® ep gradient S	WTW Eppendorf
pH-Meter	pH 540 GLP	WTW
Quanti-Tray Sealer	2 X	IDEXX
Quarz-Messplatte zur Nukleinsäuremessung Reagenzglaswärmer	NanoQuant Plate Vortex-Genie 2	Tecan Scientific Industries

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Reaktionskammer für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	VIT-Reactors	Vermicon
Real-Time PCR-Cycler	CFX96 Touch	Bio-Rad
Schüttelwasserbad	CFL 1092	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus
Stomacher®	400	Seward
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf
Trockenschrank	6060	Heraeus
Ultraschallbad	Sonorex RK 103H	BANDELIN electronic
UV-Lampe (365 nm)	Fluorescence analysis cabinet Spectroline® CM-10 with UV lamp	Spectronics Corporation
Waage	Extend	Sartorius
Wasserbad	1013	Gesellschaft für Labortechnik GmbH

2.3. Materialien

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial

Material	Typenbezeichnung	Firma
96-well Plates für die qPCR	white	Bio-Rad
Anaerobiertopf		Merck
Anaerocult C		Merck
Bottle Top Filter, Celluloseacetat	0,20 µm Porengröße	Nalgene
Campygen		Oxoid
Cryobank™	Stammhaltungssystem für Mikroorganismen	Mast Diagnostica
Folie zum Versiegeln der 96-well Plates	Microseal® 'B' Film	Bio-Rad
Keramiktiegel		
Kunststoffbeutel	Zubehör Stomacher	Seward
Membranfilter, Cellulosemischester	GN-6, 0,45 µm Porengröße, ø 47 mm	Pall
Membranfilter, schwarz, Cellulosemischester	MicroPlus-31 ST, 0,45 µm Porengröße, ø 50 mm	Whatman
Objektträger FISH	Epoxibeschichtet, 8 Vertiefungen, 6 mm	Roth
Oxidase-Teststreifen	Bactident®, 1.13300	Merck
Polycarbonatfilter	0,4 µm	Millipore

Material	Typenbezeichnung	Firma
Polycarbonatfilter, schwarz	0,2 µm Porengröße	Millipore
Probenahmebehälter	1000 mL, HDPE	aqua Laborservice
Reaktionsgefäße	1,5 mL, 2 mL sowie PCR clean	Eppendorf
Reaktionskammer FISH	VIT [®] -Reaktor	Vermicon
Spritzen	20 mL	B. Braun
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S plus 0,2 µm Porengröße	Sarstedt
Sterile Wattestäbchen	EUROTURBO [®]	Dentalab
Thoma Zählkammer	0,0025 mm ²	Labor-Optik
Zentrifugen-Röhrchen	15 mL und 50 mL	Sarstedt

2.4. Chemikalien

Tabelle 8 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Lösungen

Chemikalie		Firma
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	C ₁₆ H ₁₅ N ₅ , ≥ 98 %	Sigma-Aldrich
50x TAE (TRIS/acetic acid/EDTA)-Puffer	161-0743-MSDS	Bio-Rad
5-Fluoruracil		
Agar	Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company
Agarose	Pulsed Field Certified, 162-0137	Bio-Rad
Ampicillin		AppliChem
Bacillol AF		Bode Chemie
Bromthymolblau		Merck Millipore Corporation
Citifluor AF 2		Citifluor Ltd.
D-(+)-Trehalosedihydrat		Sigma-Aldrich
Dextrin aus Kartoffelstärke		Fluka Analytical
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat		
DNA Ladder, Größenmarker	MassRuler DNA Ladder Mix 100 – 10.000 bp	Thermo Scientific
DNA-Größenmarker	MassRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
DNA-Loading Dye	6x MassRuler	Thermo Scientific
Dodecylsulfat, Natriumsalz	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Sigma-Aldrich
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat,	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	Merck Millipore Corporation
Ethanol	99,9 %, absolut	VWR
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Bio-Rad
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Tetranatiumsalz	≥ 99 %	Sigma-Aldrich

Chemikalie		Firma
Formaldehyd	(36,5 – 38 %) CH ₂ O	Sigma-Aldrich
Formamid	CH ₃ NO, ≥ 99,5 % p.a.	Roth
Glycerin		Merck Millipore Corporation
Hefeextrakt, granuliert		Merck Millipore Corporation
Immersionsöl Typ N		Leica
Kalibrationspuffer pH Elektrode		WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Kaliumchlorid,	KCl	Merck Millipore Corporation
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , ≥ 99,5 %	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	
Kovacs-Indolreagenz		Merck Millipore Corporation
Magermilchpulver (Skim milk)	Bacto Skim milk	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat,	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka Analytical
Malachitgrün-Oxalat		Merck Millipore Corporation
Natriumchlorid,	NaCl, 99,9 %	VWR International
Natriumdeoxycholat		Fluka Analytical
Neßlers Reagenz	p. a.	Fluka
Paraformaldehyd	(CH ₂ O) _n	Merck
Propidiummonoazid (PMA)	C ₂₇ H ₃₂ N ₆ ²⁺	Biotium
Salzsäure	HCl, 37 % puriss., p.a.	AVS Tritonorm
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	PUFFERAN [®] , C ₄ H ₁₁ NO ₃	Roth
Tryptose	Bacto Tryptose	Becton, Dickinson and Company
Wasser für die Analytik (Rotipuran [®])	p. a., ACS	Roth
Wasser für die Molekularbiologie		Bio-Rad
Wasserstoffperoxid	3 % Bactident [®]	Merck

2.5. Kommerzielle Testsysteme und Kits zur Probenaufbereitung

Tabelle 9 In dieser Arbeit verwendete kommerzielle Testsysteme und Kits

Testsystem	Hersteller	Anwendungsbereich
API [®] 20 E (Teststreifen) 20 100	bioMérieux Clinical Diagnostics	Identifizierung gramnegativer Stäbchen
API [®] NaCl 0,85 % Medium 20 230		
TDA 70 402		
JAMES 70 542		
VP 1 + VP 2 70 422		
API [®] 20 NE (Teststreifen,	bioMérieux Clinical Diagnostics	Identifizierung von

Testsystem	Hersteller	Anwendungsbereich
AUX Medium) 20050 API® NaCl 0,85 % Medium 20 070 JAMES 70 542 NIT 1 + NIT 2 70 442 Zn Reagent 70 38 Paraffinöl 70 100 McFarland Standards 70900		gramnegativen nicht fermentierenden Bakterien
API® Campy (Teststreifen, NaCl Medium 0,85 %, AUX Medium, McFarland Standard Nr. 6) 20800 API® NaCl 0.85 % 20 070 NIT 1 + NIT 2 70 442 FB 70 562 NIN 70 491 Paraffinöl 70 100	bioMérieux Clinical Diagnostics	Identifizierung von <i>Campylobacter</i> Arten
DrySpot <i>Campylobacter</i> Test	Oxoid Limited, Thermo Fisher Scientific	Latex-Agglutinationstest zur Identifizierung von <i>Campylobacter</i>
Colilert®	IDEXX Laboratories, Inc.	MPN-Verfahren zum quantitativen Nachweis von <i>E. coli</i> und coliformen Bakterien
Enterolert®	IDEXX Laboratories, Inc.	MPN-Verfahren zum quantitativen Nachweis von intestinalen Enterokokken
Pseudalert®	IDEXX Laboratories, Inc.	MPN-Verfahren zum quantitativen Nachweis von <i>P. aeruginosa</i>
Bactident® Oxidase (Teststreifen)	Merck Millipore Corporation	Nachweis der Cytochromoxidase
Aquadien™	Bio-Rad	
iQ-Check Quanti Legionella spp – 3578102	Bio-Rad	
iQ-Check Quanti L. pneumo – 3578103	Bio-Rad	
iQ Supermix	Bio-Rad	
COLIGUARD® Puffer 300	mbonline Best. Nr. 100219	Reinigungslösung (Coliguard)
CG Coliformen Reagens 300	mbonline Best. Nr.100217	Fluorogenes Medium zum automatisierten Nachweis von coliformen Bakterien (Coliguard)
CG <i>E. coli</i> Reagens 300	mbonline Best. Nr. 100215	Fluorogenes Medium zum automatisierten Nachweis von <i>E. coli</i> (Coliguard)

2.6. Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben wurden die Lösungen in deionisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 121° C sterilisiert. Eine Lagerung erfolgte in Dunkelheit bei Raumtemperatur.

Steriles deionisiertes Wasser

Deionisiertes Wasser wurde, falls nicht anders vermerkt, im Anschluss an die hausinterne Aufbereitungsanlage der Universität Duisburg-Essen am Laborzapfhahn entnommen und durch

Autoklavieren sterilisiert. Wurde partikelfreies Deionat benötigt, erfolge die Sterilisation durch eine Filtration mit Bottle-Top Filtern (0,2 µm Porendurchmesser).

Steriles Standortwasser

Das Oberflächenwasser der Ruhr wurde sterilfiltriert. Bestand der Bedarf an größeren Volumina wurden hierzu Bottle-Top Filter (0,2 µm Porendurchmesser) verwendet, bei kleineren Volumina wurde auf Spritzenvorsatzfilter zurückgegriffen.

Physiologische Kochsalzlösung (0,85 % NaCl)

Zusammensetzung pro Liter:

8,5 g Natriumchlorid

Säurepuffer HCl/KCl-Puffer (0,2 M)

Zur Herstellung wurden vorab zwei separate Lösungen, eine 0,2 M Salzsäurelösung und eine 0,2 M Kaliumchloridlösung, angesetzt.

0,2 M Salzsäurelösung:

10 mL einer 25 % HCl-Lösung wurden 390 mL deionisiertem Wasser zugesetzt.

0,2 M Kaliumchloridlösung:

14,9 g KCl wurden in 1 L deionisiertem Wasser gelöst.

Der Säurepuffer wurde aus 3,9 mL der Salzsäurelösung und 25 mL der Kaliumchloridlösung gemischt. Eine Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe einer 1 M Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung auf $2,2 \pm 0,2$.

Propidiummonoazid (PMA) Stammlösung (200 mM)

1 mg PMA wurden in 98 µL Wasser für die Molekularbiologie gelöst, um eine 200 mM Stammlösung herzustellen. Diese wurde bei -20 °C unter Lichtabschluss gelagert. Eine zusätzliche Sterilisation war nicht notwendig.

Acetat (TAE)-Laufpuffer für die Gelelektrophorese

Es wurden 20 mL des 50x TAE-Pufferkonzentrats in 980 mL deionisiertem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde nicht autoklaviert.

Agarosegel 2 % (w/v) für die Gelelektrophorese

2 g Agarose wurden mit TAE-Laufpuffer für die Gelelektrophorese auf 100 mL aufgefüllt. Die Mischung wurde in einem Mikrowellenofen unter gelegentlichem Rühren bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erwärmt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung in eine Gießform gefüllt und härtete dort etwa 45 min bis zur Verfestigung aus.

2.7. Lösungen und Puffer für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Falls nicht anders angegeben wurden die Lösungen in Wasser für die Analytik (Rotipuran[®]) angesetzt und gesondert für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die vorbereiteten Lösungen wurden bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert.

Phosphat gepufferte Saline (PBS) pH 7,2

Zusammensetzung pro Liter:

8,0 g Natriumchlorid, 0,20 g Kaliumchlorid, 1,81 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt.

4 % Paraformaldehyd in PBS

Es wurden je 4 g Paraformaldehyd in 65 mL Wasser (Rotipuran[®]) durch Rühren bei ca. 50 °C gelöst und anschließend auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde danach mit Hilfe eines Celluloseacetat-

2. Material

Filters (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert. Die vorbereitete Lösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Natriumchloridlösung (NaCl), 5 M

Zusammensetzung pro Liter:

292,2 g Natriumchlorid

EDTA-Lösung, 0,25 M

Zusammensetzung pro Liter:

104,05 g Tetranatrium-EDTA

Dodecylsulfat(SDS)-Lösung, 10 % (w/v)

Zusammensetzung pro Liter:

100 g Dodecylsulfat, Natriumsalz

Die Lösung wurde mit Hilfe eines Celluloseacetat-Filters (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert.

Tris (1 M), pH 7,2

Zusammensetzung pro Liter:

121,14 g Tris

Die Lösung wurde vor dem Autoklavieren mit 7 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Tris (1 M), pH 8,0

Zusammensetzung pro Liter:

121,14 g Tris

Die Lösung wurde vor dem Autoklavieren mit 7 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

2.8. Gensonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Alle Gensonden wurden entsprechend verdünnt, sodass eine Stammlösung von 50 ng/µL erhalten wurde. Diese wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde aus der Stammlösung eine Arbeitslösung der Gensondensuspension bestehend aus 1 µL Stammlösung und 9 µL des jeweiligen Hybridisierungspuffers angesetzt. Die Gensonden wurden als Lyophilisat von der Firma Eurofins Genomics GmbH bezogen und waren bereits mittels Hochleistungsflüssigkeitchromatographie aufbereitet. Eine Markierung mit dem Farbstoff Cy3 befand sich am 5'-Ende der jeweiligen Sonde.

Tabelle 10 Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit dem dazugehörigen Zielorganismus

Zielorganismus	Sondenbezeichnung	Sequenz (5'-3')	Literatur
<i>Aeromonas</i> spp.	AERBOMO	CTA CTT TCC CGC TGC CGC C	Bomo <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Psae16S-182	CCA CTT TCT CCC TCA GGA CG	Wellinghausen <i>et al.</i> (2005)
<i>Campylobacter</i> spp., <i>Helicobacter</i> spp., <i>Arcobacter</i> spp.	HelCArc	AAC AGT CGG GAG GGA CTC	Poppert <i>et al.</i> (2008)
Thermotolerante <i>Campylobacter</i> spp.	Catherm	GCC CTA AGC GTC CTT CCA	Poppert <i>et al.</i> (2008)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cajej	AGC TAA CCA CAC CTT ATA CCG	Poppert <i>et al.</i> (2008)

<i>Legionella</i> spp.	Leg705	CTGGTGTTCCTCCGATC	Manz <i>et al.</i> (1995)
<i>Legionella pneumophila</i>	LEGPNE1	ATC TGA CCG TCC CAG GTT	Grimm <i>et al.</i> (1998)
Unspezifische Sonde für die Domäne <i>Bacteria</i>	EUB 338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann <i>et al.</i> (1990)

2.8.1. Hybridisierungspuffer

Im Folgenden ist die Zusammensetzung für die jeweiligen Zielorganismen tabellarisch aufgeführt.

Aeromonas spp.

Sonde: AERBOMO

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [µL]
NaCl (5 M)	0,9 M	180
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	35 %	350
Wasser (Rotipuran®)		450
Gesamt		1000

P. aeruginosa

Sonde: Psael6S-182

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [µL]
NaCl (5 M)	0,9 M	180
Tris (1 M), pH 8,0	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	40 %	400
Wasser (Rotipuran®)		400
Gesamt		1000

Campylobacter spp.

Sonden: HelCArc, Catherm, Cajej

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [µL]
NaCl (5 M)	0,9 M	180
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	30 %	300
Wasser (Rotipuran®)		500
Gesamt		1000

Legionella spp.

Sonden: LEG705, LEGPNE1

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [µL]
NaCl (5 M)	0,9 M	180
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	20 %	200
Wasser (Rotipuran®)		600
Gesamt		1000

2. Material

Domäne Bacteria

Sonde: EUB 338

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [μ L]
NaCl (5 M)	0,9 M	180
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	20
SDS (10 %)	0,01 %	1
Formamid	30 %	300
Wasser (Rotipuran [®])		500
Gesamt		1000

2.8.2. Waschpuffer

Im Folgenden ist die Zusammensetzung für die jeweiligen Zielorganismen tabellarisch aufgeführt.

Aeromonas spp.

Sonde: AERBOMO

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [mL]
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	1,0
EDTA (0,25 M)	5 mM	1,0
SDS (10 %)	0,1 %	0,5
Wasser (Rotipuran [®])		47,5
Gesamt		50

P. aeruginosa

Sonde: Psae16S-182

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [mL]
Tris (1 M), pH 8,0	20 mM	1,0
EDTA (0,25 M)	5 mM	1,0
NaCl (5M)	56 mM	0,56
SDS (10 %)	0,01 %	0,05
Wasser (Rotipuran [®])		47,39
Gesamt		50

Campylobacter spp.

Sonden: HelCArc, Catherm, Cajej

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [mL]
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	1,0
NaCl (5M)	112 mM	1,12
EDTA (0,25 M)	5 mM	1,0
SDS (10 %)	0,01 %	0,05
Wasser (Rotipuran [®])		46,38
Gesamt		50

Domäne Bacteria

Sonde: EUB 338

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [mL]
Tris (1 M), pH 7,2	20 mM	1,0
NaCl (5M)	112 mM	1,12
EDTA (0,25 M)	5 mM	1,0
SDS (10 %)	0,01 %	0,05
Wasser (Rotipuran [®])		46,38
Gesamt		50

2.9. Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.9.1. Intestinale Enterokokken

Für den quantitativen Nachweis mittels PCR wurde das 23S rRNA-Gen als Zielsequenz genutzt. Es wurde eine TaqMan Methode mit den in Tabelle 11 aufgelisteten Primern und der dazugehörigen Sonde angewandt.

Tabelle 11 Primer und TaqMan Sonde für den quantitativen Nachweis intestinaler Enterokokken mittels qPCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Literatur
ECST748F	AGAAATTCCAAACGAACTTG	Ludwig und Schleifer (2000)
GPL813TQ	TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA	
ENC854R	CAGTGCTCTACCTCCATCATT	

2.9.2. *Aeromonas* spp.

Die Virulenzgene bekannter Pathogenitätsfaktoren von *Aeromonas* spp. wurden mittels PCR nachgewiesen. Ausgewählt wurden hierbei Gene, die eine Elastase (*ahyB*), Lipasen (*lip*, *pla*, *lipH3*, *alp-1*) und die Enterotoxine (*act*, *aerA*, *hlyA*, *alt*, *ast*) codieren. Zur Kontrolle wurde ebenfalls das Gen der 16S rRNA verwendet. Die Primer wurden über Eurofins MWG GmbH (Ebersbach, Deutschland) bezogen. Die Lyophilisate wurden in Wasser für die Molekularbiologie gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12 Primer für den Nachweis ausgewählter Virulenz- und Kontrollgene von *Aeromonas* spp.

Zielsequenz	Primer	Sequenz (5'-3')	Literatur
<i>act, aerA, hlyA</i>	ActF	AGAAGGTGACCACCAAGAACA	Kingombe <i>et al.</i> (1999)
	ActR	AACTGACATCGGCCTTGAAGCTC	
<i>ast</i>	AstF	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	Sen und Rodgers (2004)
	AstR	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	
<i>alt</i>	AltF	TGACCCAGTCCTGGCACGGC	Sen und Rodgers (2004)
	AltR	GGTGATCGATCACCACCAGC	
<i>lip, pla, lipH3, alp-1</i>	LipF	ATCTTCTCCGACTGGTTCCGG	Sen und Rodgers (2004)
	LipR	CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	
<i>ahyB</i>	ElaF	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	Sen und Rodgers (2004)
	ElaR	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	
16S rRNA	A16SF	GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA	Wang <i>et al.</i> (2003)
	A16SR	TCACCGCAACATTCTGATTTG	

2.10. Nährmedien

Die Lösungen für die Nährmedienherstellung wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Bei Agarnährmedien wurden nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C im Wasserbad Portionen von circa 15 mL in sterile Petrischalen gegossen. Eine Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Abweichungen sind in den einzelnen Unterkapiteln separat vermerkt. Bei der Herstellung wurden die Anforderungen der DIN EN ISO 11133 berücksichtigt.

Nähragar

Zusammensetzung pro Liter:

20 g Nähragar für die Mikrobiologie (Merck, 105450)

Entspricht nach Herstellerangaben: 5 g Pepton aus Fleisch, 3 g Fleischextrakt, 12 g Agar-Agar

2. Material

Casein-Soja-Pepton-Agar (CASO)

Zusammensetzung pro Liter:

40 g Casein-Soja-Pepton-Agar (CASO-Agar), (Merck, 107324)

Entspricht nach Herstellerangaben: 15 g Pepton aus Casein, 5 g Pepton aus Sojamehl, 5 g

Natriumchlorid, 15 g Agar-Agar

Hirn-Herz-Bouillon

Zusammensetzung pro Liter:

37 g Brain Heart Infusion Broth, (Oxoid, CM1135)

Entspricht nach Herstellerangaben: 12,5 g Hirn Aufguss-Partikel, 5 g Rinderherz Aufguss-Partikel,

10 g Proteose Pepton, 2 g Glukose, 5 g Natriumchlorid, 2,5 g Natriumhydrogenphosphat

Nährbouillon

Zusammensetzung pro Liter:

8 g Nährbouillon, (Merck, 105443)

Entspricht nach Herstellerangaben: 5 g Pepton aus Fleisch, 3 g Fleischextrakt

Columbia-Blutagar

Bezogen als Fertigmedium:

Columbia agar + 5% sheep blood (bioMérieux, 43041)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben: 12,0 g pankreatisch abgebautes Kasein, 5,0 g

peptisch abgebautes Tiergewebe, 3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g Rindfleischextrakt, 1,0 g Maisstärke, 5,0 g

Natriumchlorid, 13,5 g Agar-Agar, 5 % defibriniertes Schafsblut

Skim milk agar, 5 %

Zur Herstellung wurden je 0,5 L einer Lösung mit 10 % Magermilchpulver (Skim milk) und doppeltkonzentriertem Nähragar angesetzt und separat autoklaviert. Anschließend wurden die beiden Ansätze vermischt.

Zusammensetzung pro Liter:

50 g Magermilchpulver (Skim milk), 5,0 g Pepton aus Fleisch, 3,0 g Fleischextrakt, 12,0 g Agar-Agar

2.11. Selektivmedien

2.11.1. *Aeromonas* spp.

Ampicillin-Dextrin-Agar (ADA) nach Havelaar *et al.* (1987)

Zusammensetzung pro Liter:

15,0 g Bacto Agar, 10,0 g Dextrin, 5,0 g Bacto Tryptose, 3,0 g Natriumchlorid, 2,0 g Hefeextrakt,

2,0 g Kaliumchlorid, 0,2 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 0,1 g Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, 8,0 ml

Bromthymolblau-Lösung (10 mg/mL in Deionat)

Nach dem Autoklavieren in Deionat gelöst und sterilfiltriert hinzugegeben:

100 mg Natriumdeoxycholat, 10 mg Ampicillin

Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

2.11.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Malachitgrün-Bouillon

Zusammensetzung pro Liter:

8,4 g Malachitgrün-Bouillon Basis (Merck, 110329);

Entspricht nach Herstellerangaben: 5 g Pepton aus Fleisch, 3 g Fleischextrakt, 0,37 g Dikaliumhydrogenphosphat

Nach dem Autoklavieren in Deionat gelöst und sterilfiltriert hinzugegeben:

0,01 g Malachitgrün-Oxalat

Cetrimid-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

45,3 g Cetrimid-Agar, *Pseudomonas* Selektivagar Basis (Merck, 105284)

Entspricht nach Herstellerangaben: 20,0 g Pepton aus Gelatine, 1,4 g Magnesiumchlorid, 10 g Kaliumsulfat; 0,3 g N,N,N-Trimethylhexadecyl-ammoniumbromid (Cetrimid), 13,6 g Agar-Agar

Zusätzlich:

10 mL Glycerin

Pseudomonas-Agar F

Zusammensetzung pro Liter:

35 g *Pseudomonas*-Agar F (Basis) (Merck, 110989)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Pepton aus Fleisch, 1,5 g Magnesiumsulfat, 1,5 g Dikaliumhydrogenphosphat, 12 g Agar-Agar

Zusätzlich:

10 mL Glycerin

Pseudomonas-Agar P

Zusammensetzung pro Liter:

44 g *Pseudomonas*-Agar P (Basis) (Merck, 110988)

Entspricht nach Herstellerangaben: 20 g Pepton aus Fleisch, 1,4 g Magnesiumchlorid, 10 g Kaliumsulfat, 12,6 g Agar-Agar

Zusätzlich:

10 mL Glycerin

Cetrimid-Nalidixinsäure(CN)-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

48,4 g *Pseudomonas* Agar Basis (Oxoid, CM0559)

Entspricht nach Herstellerangaben: 16 g Pepton aus Gelatine, 10 g Casein Hydrolysat, 10 g Kaliumsulfat, 1,4 g Magnesiumchlorid, 11 g Agar-Agar

Zusätzlich:

10 mL Glycerin

Nach dem Autoklavieren in sterilem Deionat-Ethanol 1:1 gelöst hinzugegeben:

2 Ampullen CN-Selektivsupplement (Oxoid, SR0102)

Entspricht nach Herstellerangaben: 200 mg N,N,N-Trimethylhexadecyl-ammoniumbromid (Cetrimid), 15 mg Nalidixinsäure Natriumsalz

2. Material

RAPID'*P. aeruginosa*-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

26,4 g RAPID'*P. aeruginosa*-Agar dehydriert (Bio-Rad, 356-4900)

Entspricht nach Herstellerangaben: 14 g Nährstoffmischung, 2,15 g Puffer System, 0,13 g chromogenes Substrat, 0,11 g Selektivmischung, 10 g Agar

2.11.3. *Campylobacter* spp.

Preston-Bouillon

Zusammensetzung pro Liter:

25 g Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, CM0067)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Lab-Lemco Pulver, 10 g Pepton, 5 g Natriumchlorid

Nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

50 mL lysiertes Pferdeblut (Oxoid, SR0048);

2 Ampullen Preston *Campylobacter* Selektiv Supplement (Oxoid, SR0204), 2 Ampullen *Campylobacter* Wachstumssupplement (Oxoid, SR0232)

Entspricht nach Herstellerangaben: 5000 IU Polymyxin B, 10 mg Rifampicin, 10 mg Trimethoprim, 100 mg Cycloheximid; 0,25 g Natriumpyruvat, 0,25 g Natriumdisulfat, 0,25 g Eisen(II)-sulfat (Heptahydrat)

Bolton-Bouillon

Zusammensetzung pro Liter:

27,6 g Bolton Broth (Oxoid, CM0983)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Lactalbumin-Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, 1 g α -Ketoglutar säure, 0,5 g Natriumpyruvat, 0,5 g Natriumdisulfat, 0,6 g Natriumcarbonat, 0,01 g Hämin

Nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

50 mL Pferdeblut, lysiert (Oxoid, SR48)

2 Ampullen Bolton Broth Selective Supplement (Oxoid, SR0183)

Entspricht nach Herstellerangaben: 20 mg Cefoperazon, 20 mg Vancomycin, 20 mg Trimethoprim, 50 mg Cycloheximid

Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate (mCCD)-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

Campylobacter blood-free selective agar base (Oxoid, CM0739)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Lab-Lemco Pulver, 10 g Pepton, 5 g Natriumchlorid, 4 g bakteriologische Aktivkohle, 3 g Caseinhydrolysat, 1 g Natriumdesoxycholat, 0,25 g Eisen(II)-sulfat, 0,25 g Natriumpyruvat, 12 g Agar

Nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

2 Ampullen CCDA Selektiv Supplement (Oxoid, SR0155)

Entspricht nach Herstellerangaben: 32 mg Cefoperazone, 10 mg Amphotericin B

Aktivkohle-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

Campylobacter blood-free selective agar base (Oxoid, CM0739)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Lab-Lemco Pulver, 10 g Pepton, 5 g Natriumchlorid, 4 g bakteriologische Aktivkohle, 3 g Caseinhydrolysat, 1 g Natriumdesoxycholat, 0,25 g Eisen(II)-sulfat, 0,25 g Natriumpyruvat, 12 g Agar

2.11.4. Salmonellen

Gepuffertes Pepton-Wasser

Zusammensetzung pro Liter:

10 g Buffered Peptone-Water (Oxoid, CM1049)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Pepton, 5 g Natriumchlorid, 3,5 g Dinatriumphosphat, 1,5 g Kaliumdihydrogenphosphat

Salmonellen-Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vassiliadis (RVS-Bouillon)

Zusammensetzung pro Liter:

26,75 g Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RVS Broth) (Oxoid, CM866)

Entspricht nach Herstellerangaben: 4,5 g Soja aus Pepton, 7,2 g Natriumchlorid, 1,26 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,18 g Dikaliumhydrogensulfat, 13,58 Magnesiumchlorid (wasserfrei), 0,036 g Malachitgrün

Xylose-Lysin-Desoxycholat(XLD)-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

53 g X.L.D. Agar (Oxoid, CM0469)

Entspricht nach Herstellerangaben: 3 g Hefeextrakt, 5 g L-Lysin (Monohydrochlorid), 3,75 g Xylose, 7,5 g Laktose, 7,5 g Saccharose, 1 g Natriumdesoxycholat, 5 g Natriumchlorid, 6,8 g Natriumthiosulfat, 0,8 g Ammoniumeisen(III)-citrat 0,08 g Phenolrot, 12,5 g Agar

Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose(BPLS)-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

52 g Brilliant Green Agar (modified) (Oxoid, CM0329)

Entspricht nach Herstellerangaben: 5 g Lab-Lemco Pulver, 10 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 1 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,6 g Natriumdihydrogenphosphat, 10 g Laktose, 10 g Saccharose, 0,9 g Phenolrot, 0,0047 g Brilliantgrün, 12 g Agar

2.11.5. Leptospiren

Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) Medium

Zusammensetzung pro Liter:

2,3 g Difco™ Leptospira Medium EMJH (Becton Dickinson, 279410) in 900 mL Deionat (aufgefüllt auf 1 L durch Zugabe des Supplements)

Entspricht nach Herstellerangaben: 1,0 g Dinatriumphosphat, 0,3 g Kaliumphosphat, 1 g Natriumchlorid, 0,25 g Ammoniumchlorid, 0,005 g Thiamin

Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben:

1 Ampulle Difco™ Leptospira Enrichment EMJH (Becton Dickinson, 279510): enthält Albumin, Polysorbate 80 und weitere Stoffe, die das Wachstum von *Leptospira* spp. fördern sollen, sowie 100 µg/mL 5-Fluoruracil

2.11.6. Legionellen

Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)-Agar

Bezogen als Fertigmedium: *Legionella* Growth Medium BCYE (Oxoid, PO5072)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben: 2 g Aktivkohle, 10 g Hefeextrakt, 13 g Agar-Agar, 10 g Puffer/Kaliumhydroxid, 0,25 g Eisen(III)-Pyrophosphat, 0,4 g L-Cystein Hydrochlorid, 1,0 g α-Ketoglutarat

Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide (GVPC)-Agar

2. Material

Bezogen als Fertigmedium: *Legionella* Selective Medium GVPC (Oxoid, PO5074)

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben: 2 g Aktivkohle, 10 g Hefeextrakt, 13 g Agar-Agar, 1,5 g Glycin (Ammoniak-frei), 0,5 mg Vancomycin Hydrochlorid, 40000 IU Polymyxin-B-sulfat, 40,0 mg Cycloheximid

2.12. Medien für die biochemische Identifizierung

Acetamid-Bouillon

Zusammensetzung pro Liter:

2,56 g Acetamide Nutrient Broth (Fluka/Sigma-Aldrich, 00185)

Entspricht nach Herstellerangaben: 2,0 g Acetamid, 0,158 g Magnesiumsulfat, 0,2 g Natriumchlorid, 0,005 g Natriummolybdat, 0,0005 g Eisen(II)-sulfat, 0,2 g Dikaliumhydrogenphosphat

Bromkresolpurpur-Bouillon (purple broth) mit 0,7 %Trehalose

Zusammensetzung pro Liter:

15 g Purple Broth Base (Becton Dickinson, 211558)

Nach dem Autoklavieren in Deionat gelöst und sterilfiltriert hinzugegeben:

7 g D-(+)-Trehalosedihydrat

Trypton-Wasser

Zusammensetzung pro Liter:

15 g Tryptone Water (Oxoid, CM0087)

Entspricht nach Herstellerangaben: 10 g Trypton, 5 g Natriumchlorid

Dreizucker-Eisen (Triple Sugar Iron-TSI)-Agar

Zusammensetzung pro Liter:

65 g Triple Sugar Iron Agar (Oxoid, CM0277)

Entspricht nach Herstellerangaben: 3 g Lab-Lemco Pulver, 3 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 5 g Natriumchlorid, 10 g Lactose, 10 g Saccharose, 1 g Glucose, 0,3 g Eisen(III)-Citrat, 0,3 g Natriumthiosulfat, 0,024 g Phenolrot, 12 g Agar

Lysin-Eisen Agar

Zusammensetzung pro Liter:

34 g Lysine Iron Agar (Oxoid, CM0381)

Entspricht nach Herstellerangaben: 5 g bakteriologisches Pepton, 3 g Hefeextrakt, 1 g Glukose, 10 g L-Lysin, 0,5 g Ammoniumeisen(III)-citrat, 0,04 g Natriumthiosulfat, 0,02 g Bromkresolpurpur, 14,5 g Agar

Harnstoff-Pepton-Agar nach Christensen

Angesetzt zu 100 mL

Zusammensetzung pro Liter:

24 g Urea Agar Base (Oxoid, CM0053)

Entspricht nach Herstellerangaben: 1 g Pepton, 1 g Glukose, 5 g Natriumchlorid, 1,2 g Dinatriumphosphat, 0,8 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,012 g Phenolrot, 15 g Agar

Nach dem Autoklavieren steril hinzugeben:

1 Ampulle Urea-Lösung 40 % (Oxoid, SR0020) je 100 mL Medium

2.13. Software und Datenbanken

Tool zur MPN-Berechnung

MPN Calculator Build 23 by Mike Curiale

Meteorologische Daten

Datenbank WESTE-XL des Deutschen Wetterdienstes DWD

Ausgewählte Messtelle: Essen Bredeney (45239); Position: 51° 24' N; 6° 59' O

Auswertung von API®-Profilen

API®web™ Website

Dokumentationssoftware Gelelektrophorese

Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad)

Software zur Auswertung der qPCR (freies Protokoll)

CFX Manager 3.0 (Bio-Rad)

Software zur Auswertung der qPCR (genormtes Verfahren des Legionellennachweises)

BioRad CFX Manager industrial diagnostic Edition 2.1

Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Bildbearbeitung

Microsoft Office 2010 (Word, Excel), GIMP 2.8.14

Statistik

SAS 9.4 (SAS Institute Inc.)

3. Methoden

3.1. Untersuchungsbereich

Die in dieser Untersuchung gewonnenen Frischwasserproben entstammen alle aus dem urbanen Fluss „Ruhr“. Es wurde ein Abschnitt in einer dicht besiedelten Region im Stadtgebiet Essen bzw. Mülheim ausgewählt. Das Gewässer wird in diesem Bereich für zahlreiche Freizeitaktivitäten genutzt.

Zusätzlich leiten jedoch auch Regenüberläufe oder die Abläufe von Kläranlagen in den Fluss ein.

Zur Untersuchung der Eliminierung von Mikroorganismen aus Oberflächenwasser während der Trinkwasseraufbereitung wurden verschiedene Aufbereitungsstufen eines Wasserwerkes beprobt. Bei diesem wird Rohwasser aus der Ruhr nach einer Bodenpassage zur Aufbereitung genutzt.

3.2. Auswahl der Probenahmestellen Oberflächenwasser, Ruhr

Die Probenahmestellen wurden so gewählt, dass möglichst viele Einflussfaktoren auf die hygienische Qualität des Wassers einbezogen werden können. In Abbildung 5 kann die genaue Lage abgelesen werden. Die Strömung der Ruhr verläuft hierbei von der Probenahmestelle BarCelona (1) in Richtung Mülheim-Styrum (8). Zwischen den Probenahmestellen BarCelona (1) und Zornige Ameise (2) befindet sich die Einleitung eines Regenüberlaufbeckens. Der Einfluss eines Kläranlagenablaufs kann zudem durch die Stellen Rote Mühle (3) und Fischereiverein (4) abgebildet werden, dieser befindet sich zwischen beiden Stellen. In direkter Nähe zu einem Vogelschutzgebiet liegt die Stelle Polderpumpwerk (5). Diese wurde gewählt, um den möglichen Eintrag von Pathogenen durch Wildvögel erfassen zu können. Eine Untersuchung der Stellen Seaside Beach (6) sowie Löwental (7) wurde durchgeführt, da diese potenzielle Badestellen darstellen. Im Gebiet Mülheim an der Ruhr, Styrum (8) findet eine Entnahme von Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung statt, daher wurden dort ebenfalls Proben entnommen.



Abbildung 5: Lage der in dieser Arbeit genutzten Probenahmestellen im Stadtgebiet Essen / Mülheim an der Ruhr. BarCelona (1), Zornige Ameise (2), Rote Mühle (3), Fischereiverein (4), Polderpumpwerk (5), Seaside Beach (6), Löwental (7), Mülheim an der Ruhr, Styrum (8) © Ruhrverband

3.3. Auswahl der Probenahmestellen Trinkwasseraufbereitung

Zur Untersuchung der Eliminierung der hygienisch relevanten Bakterien während der Trinkwasseraufbereitung wurde der gesamte Prozess mit insgesamt fünf Schritten eines Ruhr-Wasserwerks beprobt. Eine genaue Einteilung der Entnahmestellen ist zusätzlich in Abbildung 6 grafisch dargestellt. Neben Rohwasser aus der Ruhr (Stelle 1), das zunächst eine Bodenpassage durchlief und in einem Brunnen gesammelt wird (Stelle 3), wurde anfänglich zusätzlich Rhein-Uferfiltrat (Stelle 2) eingespeist. Um die Quelle einer möglichen Konzentrationserhöhung zuordnen zu können, wurden beide Wasserarten separat und anschließend in ihrer Mischung (Stelle 4) erfasst. Weitere Proben wurden nach einer Behandlung mit Ozon entnommen (Stelle 5). In diese schlossen sich eine Mehrschichtfiltration (Stelle 6), gefolgt von einer Aktivkohlefiltration (Stelle 7), an. Vor der endgültigen Einspeisung ins Wasserverteilungsnetz fand eine Desinfektion mittels UV-Bestrahlung statt, nach der ebenfalls eine Probe entnommen wurde (Stelle 8).

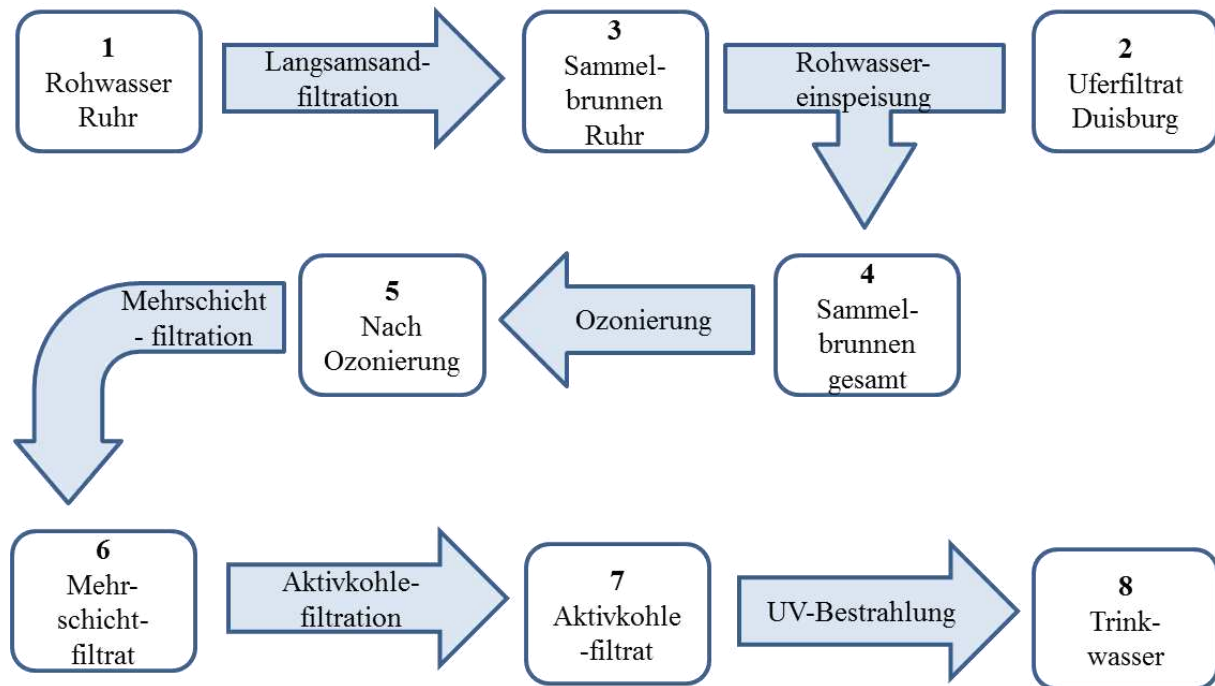


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beprobung der Trinkwasseraufbereitung eines Ruhr-Wasserwerks mit insgesamt acht Entnahmestellen.

3.4. Probenentnahme wässriger Proben nach DIN 19458:2006

Mit Hilfe eines an einer Teleskopstange befestigten Schöpfbechers wurden in circa 2 m Entfernung vom Ufer Wasserproben entnommen. Der Becher wurde dazu vorher mehrmals mit Flusswasser gespült und durch Umdrehen unterhalb der Wasseroberfläche (etwa 30 cm Tiefe) befüllt. Die Proben wurden in sterile Einweg-Gefäße abgefüllt und bis zur Bearbeitung gekühlt und lichtgeschützt gelagert.

3.5. Beprobung der Sedimente und epilithischer Biofilme

Das Ruhrsediment wurde mit einer sterilen Schöpfkelle entnommen, wobei möglichst wenig grobe Steine mit aufgenommen wurden. Die epilithischen Biofilme wurden mit einem sterilen Silikonschaber abgelöst. Die so gewonnenen Proben wurden in sterile Bechergläser gegeben und bis zur weiteren Aufbereitung unter Lichtabschluss gekühlt.

3.6. Beprobung des Uferbereichs „Planschzone“

Die Entnahme von Wasserproben erfolgte wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, jedoch in einem Bereich mit geringerer Wassertiefe (ca. 30 cm) in kurzer Entfernung zum Ufer. Zusätzlich wurde eine Probe an derselben Stelle während des Aufwirbelns von Sediment entnommen.

3.7. Beprobung der Reinigungsstufen eines Ruhrwasserwerks

Die Gewinnung von Proben war in diesem Fall nur an fest installierten Dauerläufern möglich. Diese Wasserproben wurden in sterile Einweggefäße abgefüllt und bis zur weiteren Bearbeitung unter Lichtabschluss gekühlt.

3.8. Bestimmung physikalisch chemischer Begleitparameter

Wasser- und Lufttemperatur sowie die elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert und Sauerstoffgehalt wurden mit einem Kombinationsmessgerät (WTW) gemessen. Die Messelektroden wurden hierfür direkt an der beprobten Stelle in das fließende Gewässer getaucht. Eine Kalibration der pH- und Sauerstoffelektrode erfolgte meßtäglich nach Anweisungen des Herstellers.

3.9. Aufbereitung von Sedimentproben für mikrobiologische Untersuchungen

Es wurden 10 g der Sedimentprobe in ein 250 mL Becherglas (hohe Form) überführt und mit 90 mL sterilfiltriertem Standortwasser (Porengröße 0,2 µm) überschichtet. Das Becherglas wurde im Korb eines Ultraschallbades mit Metallstiften mittig fixiert, und das Bad wurde bis zum Flüssigkeitsspiegel des Becherglases mit Wasser befüllt. Eine Beschallung erfolgte für 10 min bei 35 kHz.

3.10. Aufbereitung von Proben des epilithischen Biofilms für mikrobiologische Untersuchungen

10 g der Biofilmprobe wurden in einen sterilen Polyethylenbeutel gegeben und mit 90 mL sterilfiltriertem Standortwasser (Porengröße 0,2 µm) vermischt. Der Beutel wurde in die entsprechende Vorrichtung eines Stomachers eingespannt und die Suspension für 20 min bei 260 Upm homogenisiert.

3.11. Bestimmung des Trockenrückstandes/Wassergehaltes der Sediment- und Biofilmproben

Ein Aliquot der Probe wurde in einen ausgeglühten Keramiktiegel bekannten Gewichts gefüllt. Anschließend wurde die Probe im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Vor dem Wiegen wurde die Probe dabei jeweils im Exsikkator bis zum Erreichen der Raumtemperatur abgekühlt.

Der Trockenrückstand w_{dr} (in Prozent) ergibt sich als:

$$w_{dr} = \frac{m_c - m_a}{m_b - m_a} \times 100$$

Formel 1: Berechnung des Trockenrückstandes von Sediment- und Biofilmproben

Der Wassergehalt w_w (in Prozent) der Probe analog als:

$$w_w = \frac{m_b - m_c}{m_b - m_a} \times 100$$

Formel 2: Berechnung des Wassergehaltes von Sediment- und Biofilmproben

m_a – Masse des leeren Tiegels

m_b – Masse des Tiegels mit Probe

m_c – Masse des Tiegels mit Trockenrückstand der Probe

3.12. Bestimmung des Glühverlustes der Sediment- und Biofilmproben

Die Analyse des Glühverlustes schloss sich an die Trocknung der Proben zur Bestimmung der Trockenmasse bzw. des Wassergehaltes an. Hierfür wurde der Tiegel in einen Muffelofen überführt und für mindestens 30 min bei 550 °C geglüht. Anschließend wurde der Tiegel nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Exsikkator ausgewogen.

Hierbei galt für den Glühverlust w_V :

$$w_V = \frac{m_c - m_d}{m_c - m_a} \times 100$$

Formel 3: Berechnung des Glühverlustes von Sediment- und Biofilmproben

Mit dem Glührückstand w_R :

$$w_R = 100 - w_V$$

Formel 4: Berechnung des Glührückstandes von Sediment- und Biofilmproben

m_a – Masse des leeren Tiegels

m_c – Masse des Tiegels mit Trockenrückstand der Probe

m_d – Masse des Tiegels mit ausgeglühter Probe

3.13. Bestimmung mikrobiologischer Begleitparameter

3.13.1. Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl

Es wurden zunächst geeignete Verdünnungen der Probe in partikelfreiem Deionat hergestellt. Daraufhin wurden 4 mL der Probe mit 1 mL einer DAPI-Lösung (25 µg/mL in Formaldehyd (2 % (v/v)) versetzt und 20 min in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch einen schwarzen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Bis zur Auszählung unter dem Epifluoreszenzmikroskop wurden die Filter bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Für die Auswertung bei 1000-facher Vergrößerung wurden die Filter zunächst in Citifluor AF eingebettet, und es wurden 20 Gesichtsfelder bzw. 400 Zellen ausgezählt. Ein Großteil der Bestimmungen der Gesamtzellzahl wurden am IWW Zentrum Wasser durchgeführt und die Daten für diese Studie zur Verfügung gestellt.

3.13.2. Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C

Die Bestimmung der Koloniezahlen wurde vom IWW Zentrum Wasser nach den Vorgaben der TrinkwV 2001, Anhang 5, Teil I, d, bb durchgeführt.

3.13.3. Quantifizierung der ausgewählten hygienisch relevanten Bakterien

3.14. Kulturabhängige Methoden

3.14.1. *Escherichia coli* und intestinale Enterokokken sowie *Clostridium perfringens*

Eine Konzentrationsbestimmung der oben genannten Bakterienarten wurde hauptsächlich durch das IWW Zentrum Wasser durchgeführt. Dabei wurde der Gehalt an *E. coli* durch unterschiedliche Methoden bestimmt. Zum einen wurde das in DIN EN ISO 9308-3:1999 festgelegte Mikrotiterplattenverfahren verwendet und zum anderen das durch die Firma IDEXX erhältliche MPN-Testsystem Colilert® (DIN EN ISO 9308-2:2014), das ebenfalls ein Ablesen des Gehalts an coliformen Bakterien ermöglicht. Auch die Konzentration von intestinalen Enterokokken wurde sowohl durch ein MPN-Testsystem Enterolert® der Firma IDEXX als auch durch die in DIN EN ISO 7899-2:2000

beschriebene Methode erfasst. Der Nachweis von *Clostridium perfringens* erfolgte unter Berücksichtigung des Membranfiltrationsverfahren nach TrinkwV 2001, Anlage 5, Teil I, e.

3.14.2. *Aeromonas* spp.

Zum Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächengewässern existiert in Deutschland derzeit kein genormtes Verfahren. Es wurde daher eine Methode verwendet, die sich an einer Publikation von Havelaar *et al.* aus dem Jahr 1987 orientiert.

Geeignete Volumen wurden zunächst filtriert und der Filter anschließend auf Ampicillin-Dextrin-Agar aufgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 20 ± 4 h bei 30 °C wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt, wobei diejenigen mit einer gelblichen Färbung als *Aeromonas* spp. gewertet wurden. Alle auftretenden Kolonietypen mit einer Gelbfärbung wurden beschrieben und separat ausgezählt. Zusätzlich wurden Kolonien jedes Typs unter Verwendung von Nähragar subkultiviert und mit verschiedenen Bestätigungsreaktionen getestet.

Beim quantitativen Nachweis in Oberflächengewässern wurde routinemäßig ein maximales Volumen von 2 mL Probe eingesetzt, woraus sich hierbei eine Nachweisgrenze von 50 KBE/100 mL ergibt. Bei allen Schritten des Untersuchungsgangs wurde parallel ein positiver Kontrollansatz von *Aeromonas hydrophila* DSM 30187 sowie eine Negativkontrolle getestet.

Biochemische Identifizierung

Die Identifizierung der erhaltenen Subkulturen stützte sich auf Bestätigungsreaktionen, die in der Vorschrift "Method 1605" der USEPA vorgeschlagen werden. Diese umfassten einen Oxidase-Test mittels Teststreifen, sowie einen Nachweis der Indolbildung und Trehaloseverwertung. Zur Untersuchung der Indolbildung wurde eine Einzelkolonie in Trypton-Wasser mit anschließender Inkubation für 24 h bei 30 °C resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2-3 Tropfen Kovacs-Reagenz überschichtet. Ein roter Farbumschlag des Reagenzes zeigte hierbei eine positive Reaktion an. Um eine mögliche Vergärung von Trehalose zu überprüfen, wurde analog eine Kolonie der jeweiligen Subkultur in Bromkresolpurpur-Bouillon mit 0,7 % Trehalose suspendiert. Die Verwertung der Trehalose wurde durch einen säurebedingten gelben Farbumschlag sichtbar. Alle untersuchten Isolate wurden in einer Stammsammlung für mögliche weitere Experimente hinterlegt.

Biochemische Identifizierung mittels API® 20 NE Testsystem

Parallel zu den Bestätigungsreaktionen erfolgte eine zusätzliche Identifizierung einiger ausgewählter Subkulturen durch das kommerzielle Testsystem API® 20 NE der Firma bioMérieux. Es wurde dabei eine Übernachtskultur auf Nähragar nach Herstellerangaben in das Testsystem eingesetzt. Eine Auswertung erfolgte mittels API®web™ Datenbank.

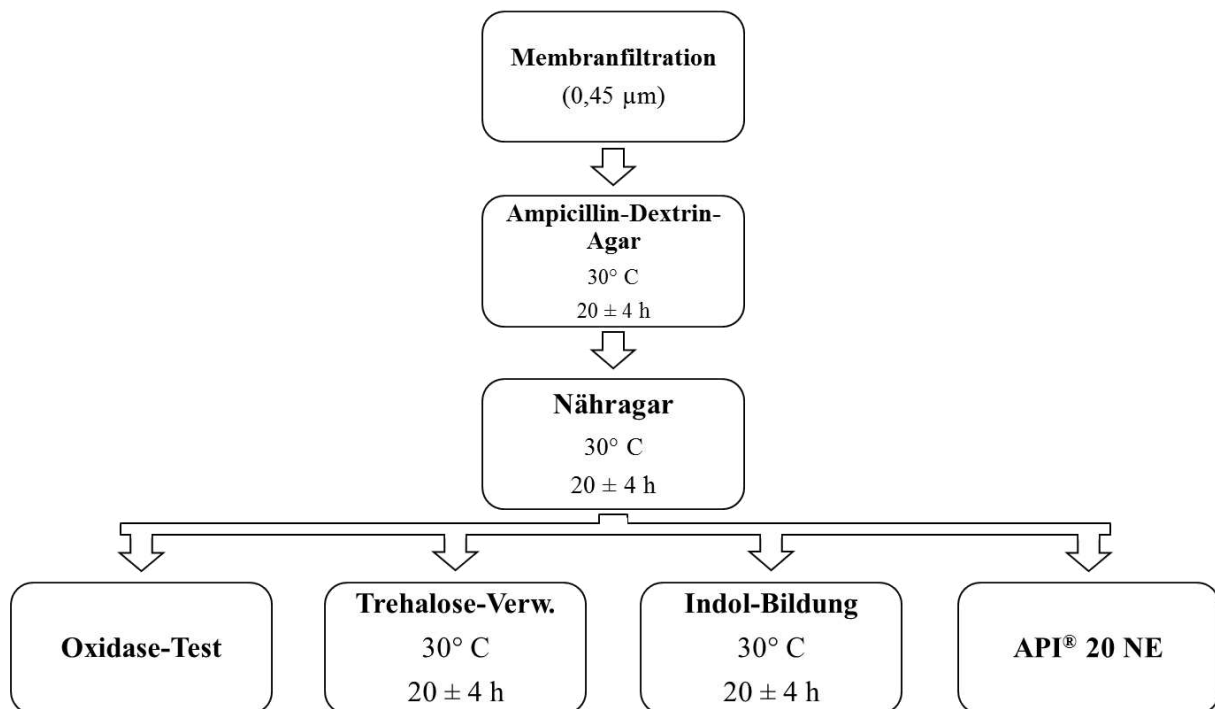
Nachweisverfahren *Aeromonas* spp.

Abbildung 7: Verfahren zum quantitativen Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwasser orientiert an Havelaar *et al.* 1987 und "Method 1605" der USEPA.

3.14.3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.14.3.1. Flüssiganreicherung nach DIN 38411-8:1982

Zur Konzentrationsermittlung wurde ein Verfahren der Flüssiganreicherung, wie in DIN 38411-8:1982 beschrieben, im MPN-Format angewandt. Die zu untersuchende Probe wurde hierfür, aufgeteilt in entsprechende Volumina (bei Oberflächenwasser meist 0,45 mL, 4,5 mL und 45 mL), direkt in Malachitgrün-Bouillon gegeben und für 44 ± 4 h bei 36°C inkubiert. Im Falle einer Trübung oder eines Farbumschlags des Ansatzes wurde dieser im Anschluss auf Cetrimid-Agar ausgestrichen und für 24 h bei 36°C inkubiert. Kam es zu keiner Veränderung der Malachitgrün-Bouillon wurde der Ansatz als negativ gewertet.

Die auf Cetrimid-Agar gewonnenen Subkulturen wurden mittels folgender Identifizierungsreaktionen auf *P. aeruginosa* überprüft: Oxidase-Test, Pigmentbildung auf *Pseudomonas*-Agar F und P sowie einer Verwertung von Acetamid.

Oxidasenegative Subkulturen wurden ohne weitere Bestätigung verworfen. Bei einer positiven Reaktion wurde je eine Kolonie auf *Pseudomonas*-Agar F und *Pseudomonas*-Agar P ausgestrichen und für bis zu 5 d bei 36°C sowie in Acetamid-Bouillon suspendiert und für 24 ± 4 h bei 36°C inkubiert. Der Ausstrich auf *Pseudomonas*-Agar P wurde auf eine typische blaugrüne (Pyocyanin) oder rotbraune (Pyorubin) Pigmentierung, der Ausstrich auf *Pseudomonas*-Agar F wurde unter einer UV-Lampe auf Fluoreszenz (Fluorescein) überprüft. Durch die Zugabe von Neßlers Reagenz zum Ansatz in Acetamid-Bouillon konnte eine Acetamidverwertung abgelesen werden. In diesem Fall bildet sich sofort ein rot-brauner Niederschlag. Blieb die Bildung von Pigmenten aus, wurde zusätzlich das Wachstum bei 42°C untersucht, das ebenfalls charakteristisch für *P. aeruginosa* ist. Dazu wurde

ein Reagenzglas mit Nährbouillon beimpft und nach 24 ± 4 h Inkubation auf eine Trübung hin abgelesen.

Aus der Anzahl und Verteilung der positiven Ansätze wurde eine MPN-Kennung ermittelt und die entsprechende Konzentration der Tabelle entnommen bzw. durch den MPN-Kalkulator ermittelt. Die Nachweisgrenze lag bei den routinemäßig für die Bestimmung in Oberflächenwasser verwendeten Volumina bei 0,4 MPN/100 mL mit einer oberen Quantifizierungsgrenze von 360 MPN/100 mL. Zur Qualitätssicherung der Analyse wurde *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 als Positivkontrolle bei allen durchgeführten Reaktionen eingesetzt, sowie unbeimpfte Medien als Negativkontrolle.

Nachweisverfahren *Pseudomonas aeruginosa*

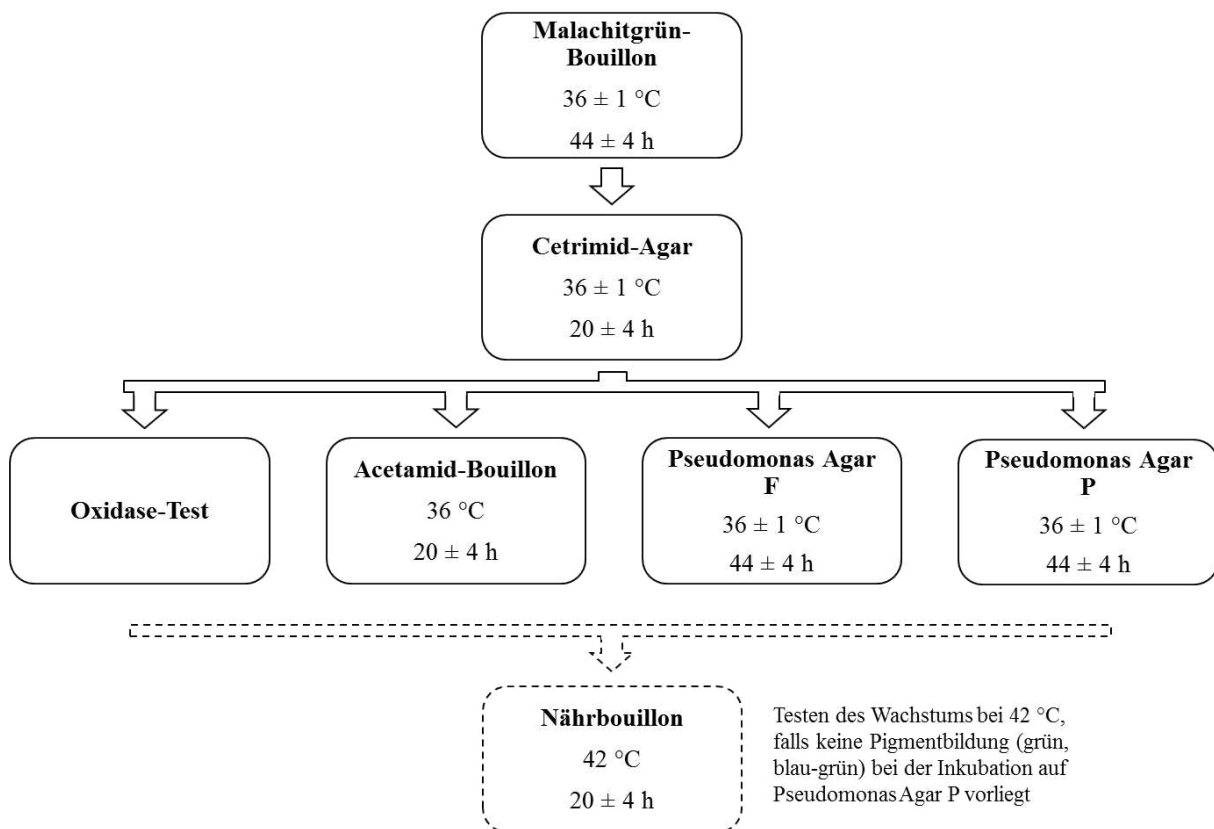


Abbildung 8: Schematische Darstellung des quantitativen Nachweises von *Pseudomonas aeruginosa* in Oberflächenwasser nach DIN 38411-8:1982

3.14.3.2. Membranfiltrationsverfahren nach DIN EN ISO 16266:2008

Die Bestimmung des Gehalts von *P. aeruginosa* in Wasserproben mittels DIN EN ISO 16266:2008 ist das aktuell gültige genormte Verfahren. Allerdings ist diese für Gewässer mit geringer Begleitflora konzipiert. Bei dem hier vornehmlich untersuchten Oberflächengewässer ist hingegen eher mit einer Vielzahl unterschiedlicher natürlicher aquatischer Bakterien zu rechnen.

Geeignete Volumen, meist 10 mL und 100 mL, wurden membranfiltriert, der Filter auf CN-Agar aufgelegt und bei 36 °C inkubiert. Jeweils nach 24 h und nach 48 h wurden die grün gefärbten Kolonien ausgezählt. Wenn möglich wurde dabei die Bestimmung nach 48 h berücksichtigt. Waren die Platten jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht mehr auswertbar, so wurde auf die Bestimmung nach 24 h zurückgegriffen. In einigen orientierenden Untersuchungen wurden, wie in der Norm empfohlen, zusätzlich fluoreszierende Kolonien subkultiviert und auf das Vorliegen von *P. aeruginosa* überprüft. Da jedoch keine der Kolonien als *P. aeruginosa* bestätigt werden konnten, wurde in den folgenden

Untersuchungen davon abgesehen. Zusätzlich war dieses Vorgehen durch einen konfluenten Bewuchs der Begleitflora erschwert.

3.14.3.3. Pseudalert®

Das Schnelltestsystem Pseudalert® der Fa. IDEXX wurde nach Herstelleranweisungen angesetzt. Dazu wurde die zugehörige Substratmischung in 100 mL der Wasserprobe gelöst. Anschließend wurde die Probe in ein Quanti-Tray überführt und versiegelt. Die Trays wurden, um größere Temperaturschwankungen zu vermeiden, im Hybridisierungssofen für 24 h bei 38 °C inkubiert.

Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht. Dabei wurden die blau fluoreszierenden Vertiefungen als positiv für *P. aeruginosa* gewertet. Zur Überprüfung der Eignung des Systems für Oberflächengewässer wurden einige Trays beprobt. Dafür wurde die Folienrückseite des Trays mit Bacillol AF desinfiziert und die zu beprobende Vertiefung mit einer sterilen Pipettenspitze aufgestochen. Routinemäßig wurden anschließend 10 µL entnommen und es wurde ein Einzelkolonieausstrich auf Nähragar bzw. Cetrimidagar angelegt. In einigen Untersuchungen wurde zusätzlich Zellsuspension zur Bestimmung der Koloniezahl und zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung entnommen.

Biochemische Identifizierung

Routinemäßig wurde ein Oxidase-Test der Subkulturen durchgeführt. Ebenfalls wurde wie in Abschnitt 3.14.3 beschrieben, die Pigmentbildung auf *Pseudomonas*-Agar F und P sowie die Acetamidverwertung und das Wachstum bei 42 °C untersucht. Zusätzlich wurden ausgewählte Isolate auf ihre Fähigkeit untersucht, Casein zu hydrolysieren. Dazu wurde ein Dreiösenausstrich auf Skim Milk Agar angelegt. Kam es zur Bildung eines klaren Hofes, wurde der Test als positiv gewertet.

3.14.3.4. Membranfiltrationsverfahren unter Verwendung von RAPID'P. aeruginosa-Agar (Bio-Rad)

Ähnlich wie bei der Konzentrationsbestimmung nach DIN EN ISO 16266:2008 wurden geeignete Volumen der Wasserprobe membranfiltriert und der Filter auf RAPID'P. *aeruginosa*-Agar aufgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 22 - 30 h bei 36 °C wurden die Kolonien je nach Färbung und Morphologie in Kategorien eingeteilt und ausgezählt. Da sich das Aussehen der Kolonien in diesem Zeitrahmen noch stark änderte, wurden in späteren Untersuchungen entweder Auswertungen zu mehreren Zeitpunkten vorgenommen oder erst nach Ablauf von 30 h. Es wurden stichprobenartig Subkulturen jedes Kolonietyps einer Probe auf Nähragar angelegt und mit unterschiedlichen Bestätigungsreaktionen auf das Vorliegen von *P. aeruginosa* getestet. Zusätzlich wurden stichprobenartig Isolate mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung identifiziert

Biochemische Identifizierung

Zur Identifizierung ausgewählter Subkulturen wurden die in Abschnitt 3.14.3 beschriebenen Bestätigungsreaktionen der Oxidase-Test, die Pigmentbildung auf *Pseudomonas*-Agar P und F sowie der Nachweis der Acetamidverwertung verwendet.

3.14.3.5. Biochemische Identifizierung mittels API® 20 NE Testsystem

Ausgewählte Isolate, gewonnen durch die in Abschnitt 3.14.3 dargestellten Nachweismethoden, wurden zusätzlich mit dem Testsystem API® 20 NE überprüft. Es wurde dabei eine Übernachtskultur auf Nähragar nach Herstellerangaben in das Testsystem eingesetzt. Eine Auswertung erfolgte mittels API®web™ Datenbank.

3.14.4. Thermotolerante *Campylobacter* spp.

Die gewählte Methode zur Quantifizierung von *Campylobacter* spp. in Oberflächengewässern orientiert sich an der Norm ISO 17995:2005. Diese wurde in einem MPN-Format umgesetzt.

Standardmäßig wurden hierbei für die Untersuchung von Oberflächengewässern Volumina von 300 mL, 30 mL und 3 mL in Dreifachansatz verwendet, was einem Gesamtvolumen von ca. 1 L entsprach. Die einzelnen Volumina wurden zunächst membranfiltriert, der Filter anschließend aufgerollt, in mit Bouillon befüllte Reagenzgläser gegeben und für 48 h bei 36 °C mikroaerophil inkubiert. Routinemäßig wurde hierzu Preston-Bouillon verwendet. In einigen detaillierteren Untersuchungen wurden für identische Proben auch parallele Ansätze in Preston- und der weniger selektiven Bolton-Bouillon angelegt. Eine mikroaerophile Atmosphäre wurde durch die Platzierung der Reagenzgläser in Anaerobiotöpfen mit Gasentwicklerpacks (Anaerocult C, CampyGen) erreicht. Im Anschluss an die Voranreicherung wurden etwa 10 µL der Bouillon knapp unterhalb der Oberfläche entnommen und ein Dreiösenausstrich auf modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate(mCCD)-Agar angelegt. Die Inkubation erfolgte bei einer erhöhten Temperatur von 41,5 °C für 48 h. Wie zuvor wurde eine mikroaerophile Atmosphäre gewährleistet. Die Ausstriche wurden auf ihre Koloniemorphologie hin untersucht und falls nötig vereinzelt, um Reinkulturen zu erhalten. Eine Einzelkolonie wurde anschließend auf zwei Aktivkohle-Agarplatten ausgestrichen. Von diesen wurde je eine mikroaerophil und die andere oxisch bei 41,5 °C inkubiert. War ein deutliches Wachstum in oxischer Atmosphäre zu erkennen, wurde der Ansatz als negativ gewertet, da dieses untypisch für *Campylobacter* spp. ist. Bei ausschließlichem Anwachsen des mikroaerophilen Ansatzes wurde ein Oxidase- sowie Katalase-Test durchgeführt. Ein Großteil der *Campylobacter*-Arten zeigt dabei eine positive Oxidase- und Katalasereaktion. Zusätzlich wurde etwas Zellmasse entnommen, in Nährbouillon (Nutrient broth No.2) suspendiert und bei 1000-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop bei Phasenkontrast mikroskopiert. Die Zellform von *Campylobacter* ist dabei typisch kornzieherartig und die Zellen besitzen die Fähigkeit, sich schnell fortzubewegen. Trafen diese Charakteristika zu, wurde der Ansatz als positiv bewertet. Aus der Anzahl und Verteilung negativer und positiver Ansätze einer Probe wurde mittels MPN-Kalkulator die wahrscheinlichste Konzentration ermittelt. Der Konzentrationsbereich, bei dem eine quantitative Bestimmung möglich war, reichte dabei von 0,1 MPN/100 mL bis 37 MPN/100 mL. Zur Qualitätssicherung der Nachweismethode wurde hier *Campylobacter coli* DSM 4689 als Referenzstamm eingesetzt und zusätzlich eine Negativkontrolle mit nicht beimpften Medien durchgeführt.

Nachweisverfahren *Campylobacter* spp.

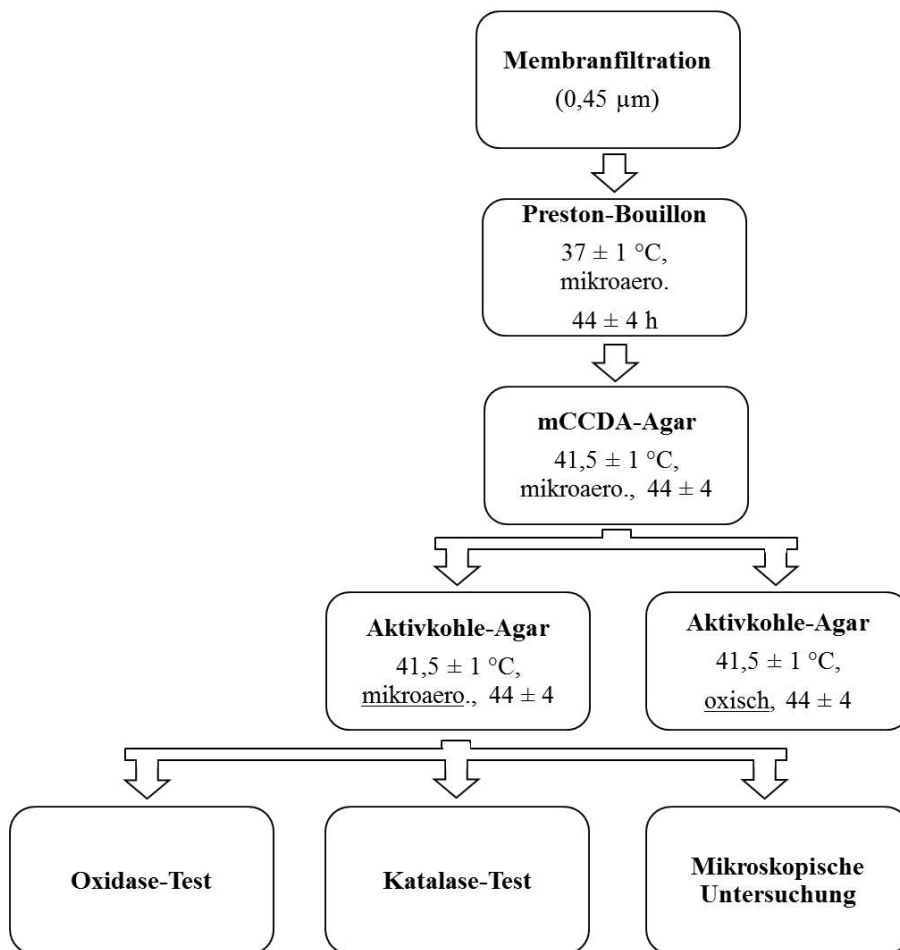


Abbildung 9: Schematische Darstellung des quantitativen Nachweises von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Oberflächenwasser, orientiert an ISO 17995:2005.

3.14.5. Salmonellen (ohne *Salmonella* Typhi)

Zur Ermittlung der Konzentration von Salmonellen im Oberflächengewässer wurde ein MPN-Verfahren, basierend auf der in DIN EN ISO 19250:2013 beschriebenen Methode angewandt. In der Norm ist hierbei als erster Schritt eine Voranreicherung in Pepton-Wasser verankert. Diese wurde nur in einigen orientierenden Probenahmen sowie zur Untersuchung von Proben mit geringen Bakterienkonzentrationen, zum Beispiel bei Beprobungen der Aufbereitungsstufen eines Wasserwerks, durchgeführt. Standardmäßig wurden verschiedene Aliquots einer Probe membranfiltriert, der aufgerollte Filter in ein Reagenzglas mit RVS-Bouillon gegeben und bei 41,5 °C für 48 h inkubiert. Bei der standardmäßigen Beprobung von Oberflächengewässern wurde circa 1 L Probe untersucht und in je drei Ansätze zu 300 mL, 30 mL und 3 mL eingeteilt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bouillons jedes Ansatzes durchmischt und sowohl auf XLD-Agar als auch auf BPLS-Agar ein Dreiösenausstrich angelegt. Die Medien wurden anschließend für 20 h bei 36 °C inkubiert. Salmonellen zeigten sich hierbei auf XLD-Agar als transparente, meist zentral geschwärzte Kolonien. Oft zeichnete sich zusätzlich ein roter Hof ab, der sich bei starkem Bewuchs des Agars auch über das ganze Medium ausbreitete. Häufig waren zudem gelblich gefärbte Kolonien zu erkennen, die von einem gelben, getrübbten Hof umgeben waren. Diese wurden aufgrund ihrer Eigenschaften ohne weitere Überprüfung als negativ für Salmonellen gewertet. Auf BPLS-Medium hingegen zeichneten sich Salmonellen durch weiß bis rosa-transparente Kolonien aus. Eine Hofbildung ist auf diesem Medium ebenfalls zu erkennen. Diese reicht von rosa-roten Höfen bei einzelnen Kolonien bis hin zu

einer kompletten Verfärbung des Mediums. Wie im Falle des XLD-Mediums waren auch bei Verwendung des BPLS-Mediums für Salmonellen untypische Kolonien vorhanden. Diese waren weißgrün gefärbt und von einem grünen Hof umgeben. Ansätze, die keine Kolonien mit dem für Salmonellen typischen Aussehen aufwiesen, wurden als negativ gewertet. Von allen anderen Kolonien wurden Subkulturen auf Nähragar angelegt und für 24 h bei 36 °C inkubiert. Es folgte eine Überprüfung mittels biochemischer Bestätigungsreaktionen.

3.14.5.1. Biochemische Identifizierung

Als erster Schritt wurde ein Oxidase-Test durchgeführt. Oxidase-positive Kolonien wurden dabei als negativ für Salmonellen gewertet. Von den oxidase-negativen Kolonien wurden Schrägagarkulturen auf Dreizucker-Eisen-Agar (TSI), Lysin-Decarboxylase-Agar und Urease-Agar angelegt. Die Subkulturen wurden als Salmonellen bestätigt, falls sie Lysin-Decarboxylase-positive und Urease-negative Reaktionen zeigten, sowie beim Wachstum auf TSI-Agar anaerob Säure und optional Sulfid bilden.

Aus dem Verhältnis der Ansätze, in denen Salmonellen nachgewiesen werden konnten, wurde ein MPN-Code ermittelt. Es war dabei unerheblich, ob der Nachweis nur bei einem oder bei beiden parallel verwendeten Selektivagarn erfolgte. Mit Hilfe eines MPN-Kalkulators wurde die wahrscheinlichste Konzentration ermittelt. Der Konzentrationsbereich, der mit der MPN-Reihe für die quantitative Bestimmung abgedeckt werden konnte, reichte hier von 0,1 MPN/100 mL bis 37 MPN/100 mL. Als Positivkontrolle wurden für alle Reaktionen des Untersuchungsganges der Stamm *Salmonella enterica* UMR1 eingesetzt sowie nicht beimpfte Medien als Negativkontrolle.

Nachweisverfahren *Salmonella enterica*

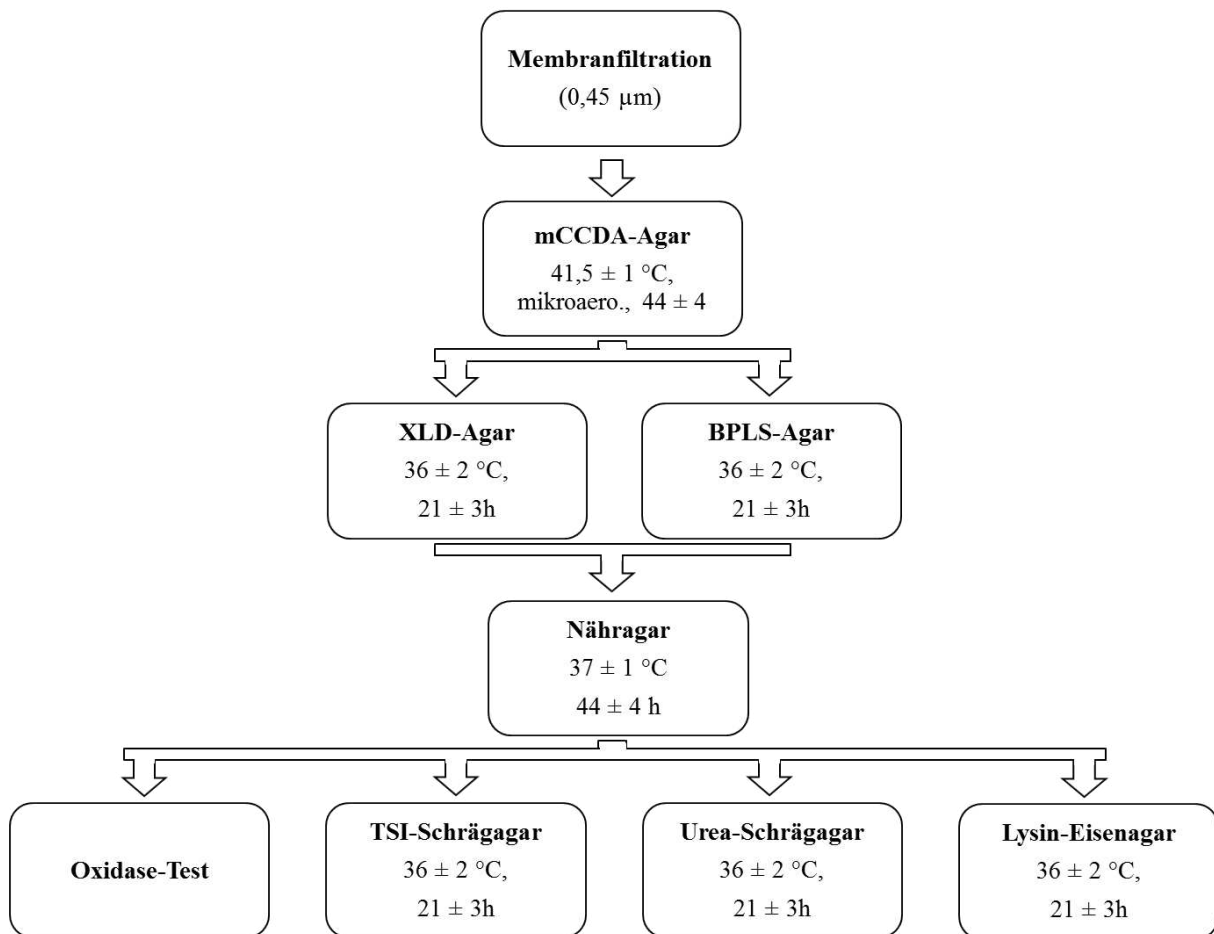


Abbildung 10: Schematische Darstellung des quantitativen Nachweises von Salmonellen in Oberflächenwasser orientiert an DIN EN ISO 19250:2013.

3.14.6. Legionellen

Die verwendete Methode berücksichtigt die in den Normen ISO 11731:1998 und DIN EN ISO 11731-2:2008 beschriebenen Grundlagen und Identifizierungskriterien. Zunächst wurden geeignete Volumina einer Probe durch einen schwarzen Zellulosenitratfilter filtriert. Der Filter wurde zur Reduktion der Begleitflora für 5 min in der Filtrationsanlage belassen und mit 20 mL eines HCl/KCl-Säurepuffers überschichtet. Anschließend wurde der Filter mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und je nach Probenart auf GVPC-Medium aufgelegt. Nach einer Inkubation von 4 – 6 d und 9 – 11 d bei 36 °C wurden die gebildeten Kolonien auf ihre Morphologie hin untersucht. Die Auswertung erfolgte dabei mittels eines Binokulars. Kolonien mit granuliertem, milchglasähnlichem Aussehen und/oder einer charakteristischen Färbung (weiß-grau-blau-violett, braun, pink, hellgrün oder dunkelrot) wurden je auf eine Platte mit cysteinhaltigen (BCYE α) und cysteinfreien (NA) Nährmedium überimpft. Kam es zu einem starken Wachstum der Subkultur auf cysteinfreiem Nährmedium, konnte ein Vorliegen von *Legionella* spp. ausgeschlossen werden. Andernfalls wurden sie als *Legionella* spp. gezählt.

Eine weitere Identifizierung der Subkulturen auf Speziesebene mittels eines Latex Agglutinationsassays entfiel hierbei, da keine geeigneten Isolate gewonnen werden konnten.

Nachweisverfahren *Legionella* spp.

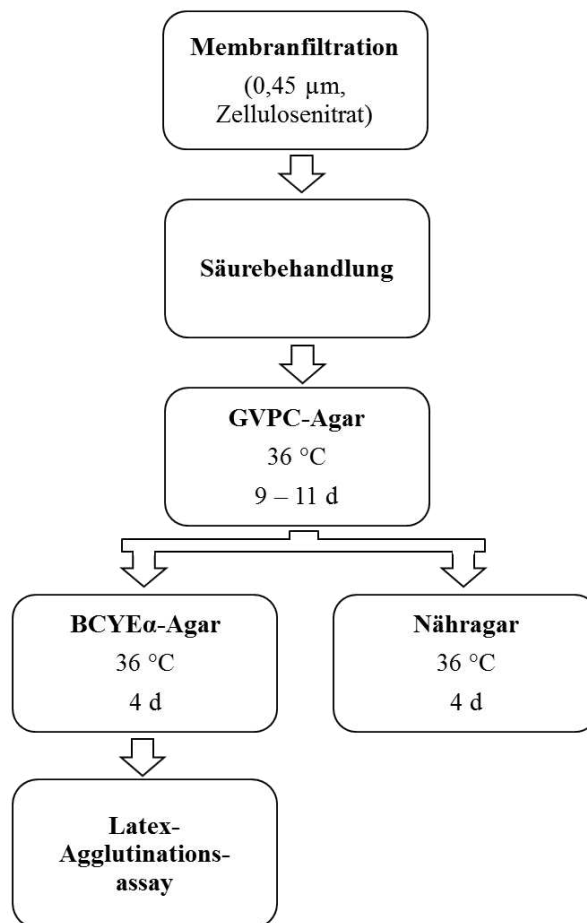


Abbildung 11: Schematische Darstellung des kulturellen quantitativen Nachweises von *Legionella* spp. in Oberflächenwasser, orientiert an ISO 11731:1998 und DIN EN ISO 11731-2:2008.

3.14.7. Allgemeine Tests zur Identifizierung von Subkulturen

3.14.7.1. Oxidase-Test

Es wurde mit einer sterilen Platin-Impföse etwas Material der zu überprüfenden Kolonie entnommen und auf einem Oxidase-Teststreifen verrieben. Nach 30-60 s wurde das Testfeld auf einen Farbumschlag hin abgelesen. Kam es zu einer rot bis blau-violetten Verfärbung, war das Ergebnis oxidase-positiv, blieb diese aus, oxidase-negativ.

3.14.7.2. Katalase-Test

Für den Katalase-Test wurde eine entsprechende Kolonie mit Wasserstoffperoxid überschichtet. Bei katalase-positiven Organismen kam es hierbei zu einer Bildung von Gasblasen an der Oberfläche der Kolonie.

3.15. Kulturunabhängige Methoden

3.15.1. Quantifizierungsmethoden basierend auf der Polymerasekettenreaktion (qPCR)

3.15.1.1. DNA-Extraktion aus Oberflächenwasser

Zur DNA-Extraktion wurde das AquaDien™-Kit der Firma Bio-Rad inklusive W2-Reagenz (Waschlösung) verwendet. Hierfür wurde 1 L einer Wasserprobe durch einen Polycarbonatfilter (0,4 µm Porengröße) filtriert und dieser dreifach gefaltet, sodass ein Trichter entstand. Dieser wurde mit der Öffnung nach unten in ein Cryotube mit 2 mL R1-Puffer gegeben. Unter Berücksichtigung, dass der Filter jederzeit komplett mit Puffer bedeckt war, wurde die Probe 20 s lang durchmischt. Anschließend erfolgte eine Hitzebehandlung im Wasserbad bei 95 °C für 15 min. Der Filter wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ausgewrungen und entfernt. Die Probe wurde in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 200 µL gekühlter Waschpuffer zugegeben. Nach einer Inkubationszeit für 15 min bei 4 °C wurde die Probe bei 12000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Von dem erhaltenen Überstand wurden zweimal 500 µL auf die Reinigungssäule gegeben und für 10 min bei 6000 x g bei 20 °C zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Auffanggefäß wurde dabei verworfen. In einem folgenden Schritt wurde die Säule mit 250 µL R2 Puffer befüllt und erneut für 5 min bei 6000 x g bei 20 °C zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden 100 µL des R2 Puffers auf die Säule gegeben. Diese wurde gedreht und mit der Öffnung nach unten in ein unbenutztes Auffanggefäß eingesteckt. Es schloss sich eine Zentrifugation für 3 min bei 1000 x g an. Die Reinigungssäule wurde verworfen und die erhaltene DNA-Probe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

3.15.1.2. Quantifizierung von intestinalen Enterokokken mittels qPCR

Herstellung von DNA-Standards

100 mL einer Him-Herz-Bouillon wurden mit etwas Zellmaterial einer Übernachtskultur von *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 auf CASO-Agar angeimpft. Die Bouillon wurde im Anschluss für 18 bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde Zellkonzentration einer 1:10 Verdünnung der Probe in PBS mittels Messung der optischen Dichte ermittelt. Wobei das folgende Verhältnis für die Zelldichte (ZD) galt:

$$ZD[mL^{-1}] = \frac{10^9 mL^{-1} \times OD_{600}}{0,19}$$

OD₆₀₀ -optische Dichte bei 600 nm

Formel 5: Berechnung der Zelldichte einer Suspension von *Enterococcus faecalis*

Es wurde ein Volumen der Flüssigkultur zur Herstellung der DNA-Standards eingesetzt, welches einer Menge von 10¹⁰ Zellen entsprach. Die DNA-Extraktion wurde dabei so durchgeführt, wie in Abschnitt 3.15.1.1 für die entsprechenden Wasserproben beschrieben. Parallel wurde eine genaue fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl durchgeführt (siehe Abschnitt 3.13.1).

Die erhaltene DNA-Lösung wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie auf ihre Reinheit und DNA-Konzentration hin überprüft. Dazu wurde ein Tecan-Reader in Kombination mit einer NanoQuant-Plate verwendet.

Die Probe galt dann als ausreichend rein, wenn:

$$\frac{OD_{260}}{OD_{280}} > 1,75$$

OD₂₆₀ -optische Dichte bei 260 nm

OD₂₈₀ -optische Dichte bei 280 nm

Der DNA-Gehalt der Probe ergab sich aus der optischen Dichte bei 260 nm:

$$c_{dsDNA}[\mu\text{g mL}^{-1}] = OD_{260} \times 50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$$

Formel 6: Berechnung des DNA-Gehaltes einer Probe

Mit einem durchschnittlichen Genomgewicht von *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 von 3,1 fg kann auf die zuvor vorhandenen Genomeinheiten geschlossen werden:

$$c_{DNAP}[GU\mu\text{L}^{-1}] = \frac{OD_{260} \times 50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}}{3,1} \times 10^6$$

Formel 7: Berechnung der Genomeinheiten von *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 aus dem DNA-Gehalt einer Probe

Es ist zu beachten, dass die Anzahl an vorhandenen Genkopien vierfach höher ist, da das Zielgen der 23S rDNA viermal im Genom vorhanden ist. Die Ausbeute, die bei der DNA-Extraktion erreicht werden konnte, ergab sich bei einem Vergleich zwischen der bei der Gesamtzellzahl ermittelten Menge an eingesetzten Zellen und der Konzentration des Eluats. Dies steht unter der Annahme, dass jeweils ein Genom pro Zelle vorhanden war.

$$A = \frac{c_{DNAP} \times V_{DNAP}}{\frac{ZD \times V}{Z}}$$

Formel 8: Berechnung der Ausbeute bei der DNA-Extraktion

A – Ausbeute

c_{DNAP} – Konzentration der DNA-Probe, des Eluats

V – Probevolumen

ZD – Zelldichte der Ausgangsprobe

Z – Z-Faktor, theoretischer Verlust der Methode

Es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10^6 Genkopien/ μL hergestellt und in Aliquots aufgeteilt, die bis zur endgültigen Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden. Eine Verdünnungsreihe der Standards von 10^6 bis 10^1 Genkopien/ μL wurde kurz vor der Verwendung hergestellt und in die qPCR eingesetzt.

Reaktionsbedingungen

Die DNA-Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Zur Bestimmung der Genomeinheiten wurden DNA-Standards im Konzentrationsbereich von 10^6 bis 10^{10} Genkopien/ μL , ebenfalls in Doppelbestimmung, verwendet. Als Reaktionsvolumen wurden $50 \mu\text{L}$ gewählt und der iQ Supermix der Firma Bio-Rad verwendet. Die Zusammensetzung kann aus Tabelle 13 ersehen werden.

Tabelle 13: Zusammensetzung der qPCR-Reaktionsmischung für den quantitativen Nachweis von intestinalen Enterokokken

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [μL]
iQ Supermix 2x	1x	25
Forward-Primer (ECST748F)	500 nM	4
Reverse-Primer (ENC854R)	500 nM	4
TaqMan-Sonde (GPL813TQ)	400 nM	4
DNA-Probe		5
Wasser für die Molekularbiologie (Bio-Rad)		8
Gesamt		50

Es wurde zunächst ein Master Mix angelegt, der alle benötigten Komponenten, mit Ausnahme der DNA-Probe, enthält. Dieser wurde in alle Vertiefungen der 96-well Platten vorgelegt. Anschließend wurden die DNA-Proben zugegeben und durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette vermischt. Die Platte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und in den PCR-Cycler eingelegt. Für die Messungen

wurde ein CFX96 Cycler der Firma Bio-Rad genutzt. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Verwendetes Temperaturprogramm für den quantitativen Nachweis von intestinalen Enterokokken

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
	50	120	
Initiale Denaturierung	95	600	
Denaturierung	95	15	} 45 x
Hybridisierung und Elongation	60	60	

Auswertung

Eine Aufzeichnung und Auswertung erfolgte durch die Software CFX Manager. Hier wurden die Fluoreszenzkurven der jeweiligen PCR-Reaktion aufgezeichnet. Das Setzen des Threshold-Wertes musste hierbei manuell erfolgen. Dabei wurde der Wert so festgelegt, dass er sich in etwa an der oberen Grenze des untersten Drittels des linearen Fluoreszenzanstiegs befand. Durch die Software wurde aus den bekannten Konzentrationen der DNA-Standardlösungen eine Kalibriergerade aufgestellt, die es ermöglichte, die Konzentrationen der unbekanntenen Proben abzuleiten. Um die Konzentration der ursprünglichen Wasserprobe zu erhalten, musste anschließend die Verdünnung der Probe und der theoretische methodischen Verlust (Z-Faktor) sowie die Ausbeute der DNA-Extraktion mit einbezogen werden.

$$c_{WP} = c_{DNAP} \times Z \times \frac{1}{A}$$

Formel 9: Berechnung der Konzentration des Zielorganismus in einer Wasserprobe aus der bekannten Konzentration einer DNA-Probe

c_{WP} – Konzentration der Wasserprobe

c_{DNAP} – Konzentration der DNA-Probe

Z – Z-Faktor

A - Ausbeute

3.15.2. Quantifizierung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* mittels (PMA-)qPCR

Herstellung von Zellkulturen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen

Es wurden Einzelkolonieausstriche von *L. pneumophila* ATCC 33152 auf BCYE α angelegt und für 4 d bei 36 °C inkubiert. Von diesen wurde etwas Material entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) bzw. in sterilem Oberflächenwasser suspendiert. Das Einstellen der Zellzahl auf 10⁶/mL erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer.

Es wurden ebenfalls inaktivierte Zellen als Kontrolle benötigt. Dazu wurde eine Zellsuspension, wie oben beschrieben, hergestellt und für 20 min einer Temperatur von 90 °C ausgesetzt. Um eine gleichbleibende Temperatur sicherzustellen, wurde hierzu ein Thermomixer[®] der Firma Eppendorf verwendet.

Lichtinduzierte Reaktion der DNA mit Propidium Monoazid (PMA)

Es wurden je 2 mL Probe in Reaktionsgefäße überführt und mit 5 μ L der PMA Stammlösung versetzt. Die Suspension wurde zunächst für 5 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte eine 5-minütige Bestrahlung mittels LED-Lampe (PhAST Blue). Im Anschluss wurde eine DNA-Extraktion, wie in Abschnitt 3.15.1.1 beschrieben, durchgeführt.

War eine Anreicherung der Probe notwendig, erfolgte zunächst eine Filtration mittels Polycarbonatfilter (0,4 µm Porengröße). Der Filter wurde anschließend in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben, in dem 10 mL physiologische Kochsalzlösung vorgelegt waren, und für 3 min durchmischt. Die Suspension der abgelösten Zellen konnte anschließend weiterverwendet werden. Zu beachten ist hierbei, dass in diesem Fall nur das Verhältnis der vitalen Zellen an den Genomeinheiten bestimmt werden kann. Um absolute Zahlen zu erhalten, ist eine zusätzliche Bestimmung der Genomeinheiten ohne den oben beschriebenen Resuspendierungsschritt notwendig.

Reaktionsbedingungen

Bei der Durchführung der qPCR wurden das iQ-Check Quanti *Legionella* spp. und das iQ-Check Quanti *L. pneumo* Kit der Firma Bio-Rad genutzt. Beide enthielten bereits gebrauchsfertige Lösungen von DNA Standards in vier verschiedenen Konzentrationen. Ein Mastermix aus Amplification Mix und der entsprechenden Sonde wurde zunächst in alle Vertiefungen einer 96-well Platte vorgelegt. Die zu analysierende Probe bzw. der Standard wurden separat hinzugegeben und mittels mehrfachen Aufziehens mit der Pipette gemischt. Die Zusammensetzung der 50 µL Reaktionen ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der qPCR-Reaktionsmischung für den quantitativen Nachweis von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila*

Komponenten	Zugabe Stammlösung [µL]
Amplification Mix	40
Fluorescent probe (TaqMan-Sonde)	5
DNA-Probe oder Quantifizierungsstandard oder Kontrolle	5
Gesamt	50

Die 96-well Platte wurde mit einer optischen Folie versiegelt. Die Messung erfolgte an einem CFX96 Touch Cyclyer der Firma Bio-Rad mit dem unten angegebenen Temperaturprogramm.

Tabelle 16: Verwendetes Temperaturprogramm für den quantitativen Nachweis von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila*

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
	50	120	
Initiale Denaturierung	95	900	
Denaturierung	95	15	} 50 x
Hybridisierung	55	30	
Elongation	72	30	

Auswertung

Das genormte Verfahren der Firma Bio-Rad ermöglichte eine automatisierte Auswertung über die Software (CFX) unter Eingabe des Probenvolumens, der Chargennummer, der DNA-Standards und des Z-Faktors der DNA-Extraktionsmethode.

3.15.3. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde sowohl zur Quantifizierung als auch zur Identifizierung von Mikroorganismen eingesetzt. Je nach Zielorganismus bzw. verwendeter Sonde wurden die Protokolle angepasst. Allen Proben gemeinsam war jedoch ein einheitliches Verfahren der Fixierung.

Fixierung der Probe

Es wurden 2 mL der zu untersuchenden Probe für 5 min bei 4 °C und 10964 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in einer Paraformaldehydlösung (4 % (w/v) in PBS)

resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation unter den zuvor genannten Bedingungen und ein zweimaliges Waschen des Pellets in PBS. Abschließend wurde das Pellet in einem adäquaten Volumen Ethanol (50 % (v/v) in PBS) resuspendiert und bis zum Schritt der Hybridisierung bei -20 °C gelagert.

Hybridisierung

Es wurden 10 µL der fixierten Probe in die Vertiefung eines epoxidbeschichteten Diagnostika Objektträgers gegeben und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine Entwässerung mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 80 %, 96 % (v/v)) durch Eintauchen des Objektträgers für je 3 min. Der Objektträger wurde erneut an der Luft getrocknet und die Vertiefung mit 10 µL der entsprechenden Gensondensuspension (siehe Tabelle 10) überschichtet. Der präparierte Objektträger wurde anschließend in eine feuchte Kammer gegeben. Dazu wurde ein Reaktorgefäß (Vermicon) zuvor mit 900 µL Hybridisierungspuffer befüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 90 min im Hybridisierungssofen bei der für alle verwendeten Gensonden idealen Temperatur von 46 °C. Im Anschluss wurde der Objektträger in ein zweites Reaktorgefäß mit 50 mL vorgewärmten Waschpuffer überführt und weitere 15 min bei 46 °C inkubiert. Der Objektträger wurde entnommen und in einem Becherglas mit kaltem Deionat gespült und mit Druckluft getrocknet. Zur Gegenfärbung wurde die Vertiefung mit 10 µL einer DAPI-Lösung überschichtet und 20 min in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde der Objektträger erneut mit kaltem Deionat gespült und mit Druckluft getrocknet. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurde der Objektträger bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Mikroskopische Auswertung

Die auszuwertende Vertiefung des Objektträgers wurde mit Citifluor AF überschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Die Betrachtung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit den voreingestellten Auswertungsmodi Cy3 (FISH-positive Zellen) und DAPI (alle Zellen) an einem Nikon Eclipse Ni-E Epifluoreszenzmikroskop.

War das Ziel der Untersuchung eine Identifizierung einer Subkultur, wurde hierbei nur qualitativ verglichen, ob die Zellen bei beiden Anregungswellenlängen identisch zu erkennen waren. War dies der Fall, wurde die Probe als positiv für den jeweiligen Zielorganismus gewertet. Es war ebenfalls eine quantitative Auswertung möglich, falls ein genauer Konzentrationsanteil von Zellen eines Zielorganismus mit intakter ribosomaler RNA an der Gesamtzellzahl zu ermitteln war. Mit Hilfe des Verhältnisses kann anschließend bei bekannter Gesamtzellzahl auf die Konzentration in der Ursprungsprobe geschlossen werden (Formel 10).

$$c_F [mL^{-1}] = \frac{\bar{x}_{ZFISH}}{\bar{x}_{ZDAPI}} \times c_{GZZ}$$

Formel 10: Berechnung der Gesamtzellzahl (fluoreszenzmikroskopische Bestimmung)

3.15.4. Coliguard®

Neben den klassisch kulturellen Nachweismethoden und der quantitativen Erfassung mittels qPCR wurden an zwei der acht routinemäßig überwachten Probenahmestellen semikontinuierliche Messungen durch das Gerät Coliguard® der Firma mbonline vorgenommen. Hierbei wurden täglich automatisch Proben zur Bestimmung des Gehaltes an coliformen Bakterien sowie *E. coli* im Speziellen entnommen. Die Bestimmung erfolgte hierbei über einen fluoreszenzspektroskopischen Nachweis der β-Galaktosidase (coliforme Bakterien) beziehungsweise der β-D-Glukuronidase (*E. coli*). Die Messung fand hierbei in einer temperierten Quarzmesskammer im Inneren des Messgerätes statt, in der die Wasserprobe zuvor mit einem fluorogenen Medium vermischt wurde. Nach jeder Messung wurde ein anschließender Reinigungsschritt durchgeführt, bei der die Messkammer mit einer chlorbasierten Reinigungslösung gespült und stark erhitzt wurde. Die Messwerte wurden online an einen Server übermittelt und konnten anschließend abgerufen werden.

3.16. Bestimmung des pathogenen Potentials und Populationsanalysen ausgewählter Isolate

3.16.1. Erfassung ausgewählter Pathogenitätsfaktoren von *Aeromonas* spp. mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Extraktion

Einige Kolonien einer Übernachtskultur (Nähragar, 30 °C) des zu untersuchenden Isolats wurden in 100 µL Wasser für die Molekularbiologie suspendiert und für 5 min im Thermocycler auf 94 °C erhitzt. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 2 min bei 13000 x g wurden 50 µL des Überstandes abgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwertung bei – 20 °C gelagert.

PCR-Reaktion

Für die PCR wurden die Komponenten des Master Mix und jeweils 1 µL der DNA-Probe zum Erreichen der in Tabelle 17 angegebenen Konzentration vermischt. Es wurde hierbei der 2,5x MasterMix der Firma 5 Prime eingesetzt. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden Proben des Referenzstamms *Aeromonas hydrophila* DSM 30187 sowie Wasser für die Molekularbiologie verwendet. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.9.2 aufgelistet.

Tabelle 17: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsmischung für den Nachweis ausgewählter Virulenzgene von *Aeromonas* spp.

Komponenten	Endkonzentration	Zugabe Stammlösung [µL]
MasterMix 2,5x (5 Prime)	1x	20
Taq DNA Polymerase	1,25 U	
KCl	50 mM	
dNTP je	200 µM	
Tris-HCl (pH 8,3)	30 mM	
Mg(OAc) ₂	1,5 mM (Mg ²⁺)	
Igepal®-CA360	0,1 %	
Forward-Primer	200 pM	2
Reverse-Primer (ENC854R)	200 pM	2
DNA-Probe		1
Wasser für die Molekularbiologie (Bio-Rad)		25
Gesamt		50

Die Reaktion lief nach dem in Tabelle 18 beschriebenen Temperaturprotokoll ab. Das PCR-Produkt wurde bis zur Auswertung mittels Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert.

Tabelle 18: Verwendetes Temperaturprogramm für den Nachweis ausgewählter Virulenzgene von *Aeromonas* spp.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min:s]	
Initiale Denaturierung	95	5:00	
Denaturierung	95	0:25	} 40 x
Annealing	55	0:30	
Elongation	72	1:00	
Finale Elongation	70	5:00	
Kühlung	4	Bis zur endgültigen Lagerung	

Agarose-Gelelektrophorese

Es wurde ein Agarosegel (2 % in TAE) hergestellt und in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Laufpuffer gegeben. Je 10 µL der zu untersuchenden Probe wurden mit 2 µL Loading Dye vermischt und vorsichtig in die Taschen des Gels gefüllt. Mittig wurde in einer Tasche nur ein Marker (DNA-Ladder) verwendet. Es wurde für 50 min eine elektrische Spannung von 100 Vcm⁻² an die Kammer angelegt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/mL) gefärbt und der Überschuss durch ein kurzes Waschen für 1 min in deionisiertem Wasser entfernt. Das Gel wurde in einer Dokumentationseinheit (GelDoc™, Bio-Rad) unter UV-Bestrahlung fotografiert. Eine Auswertung erfolgte durch Vergleich der gebildeten Banden mit dem verwendeten Marker als Referenz.

3.16.2. Bestimmung der Hämolyseaktivität ausgewählter *Aeromonas* spp. Isolate

Ausgewählte Isolate von *Aeromonas* spp. wurden auf ihre Fähigkeit zur Hämolyse untersucht. Dazu wurde von je einer Kolonie einer Übernachtskultur (NA, 30 °C) ein Dreiönsausstrich auf Columbia Blutagar angelegt. Nach einer Inkubation von 24 h und 48 h wurden die Ausstriche ausgewertet. Trat dabei eine grüne Verfärbung auf, hervorgerufen Reduktion des Hämoglobins zu Biliverdin, war eine α-Hämolyse vorhanden. Eine vollständige Lyse, erkennbar an klaren Höfen, wird hingegen als β-Hämolyse bezeichnet (Madigan *et. al* 2000). War keine der beiden Veränderungen zu beobachten wurde dieses als γ-Hämolyse vermerkt.

3.16.3. Latex-Agglutinationsassay der *Campylobacter* spp. Isolate

Um die Identifizierung der mit Hilfe der in Abschnitt 3.14.4 beschriebenen Methode gewonnenen Isolate zu bestätigen, wurde zusätzlich ein Latex-Agglutinationsassay durchgeführt. Hierbei wurde das Dry Spot *Campylobacter* Test Kit der Firma Oxoid verwendet.

3.16.4. Identifizierung der *Campylobacter* spp. Isolate auf Speziesebene mittels API® Campy

Für eine Identifizierung der nach der in Abschnitt 3.14.4 beschriebenen Methode gewonnenen Isolate auch auf Speziesebene wurde das Testsystem API® Campy der Firma bioMérieux eingesetzt. Da das Wachstum der Subkulturen sehr gering war, wurden hierzu jeweils zwei Ausstriche auf Columbia Blutagar angelegt und bis zum Erreichen einer für den Test ausreichenden Zellmenge maximal 48 h bei 36 °C und mikroaerophiler Atmosphäre inkubiert. Die Zellmasse wurde mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und ein Inokulum zum Ansetzen der Testreaktionen nach Herstellerinformationen verwendet. Für die Auswertung wurde die API® web™ Datenbank genutzt.

3.17. Risikobewertung

Zur Einordnung des Vorkommens der Pathogene in einen Kontext wurde eine quantitative Risikobewertung genutzt. Eine häufig angewandte Herangehensweise zur Beurteilung der Daten ist

das Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA). Dazu ist es jedoch nötig, den genauen Infektionsweg des Zielorganismus zu kennen. Zusätzlich wird außerdem eine bekannte epidemiologische Dosis-Wirkungsbeziehung benötigt.

Die Daten der Gastroenteritiserreger *Campylobacter* spp. und *Salmonella enterica* eignen sich sehr gut zur Analyse mittels QMRA. Eine Infektion mit diesen Erregern erfolgt ausschließlich über den Weg der Ingestion. Ebenfalls stehen für *Salmonella enterica* und *Campylobacter jejuni* ausreichend epidemiologische Daten zur Verfügung.

Black *et al.* führten im Jahre 1988 Infektionsstudien von *Campylobacter jejuni* durch, bei denen Freiwillige den Zielorganismus suspendiert in Milch oder einer Bicarbonatlösung aufnahmen. Dabei wurden Infektionsdosen von 8×10^2 bis 2×10^9 Organismen getestet. Bereits die niedrigste getestete Dosis führte bei 50 % der Testpersonen zu einer Infektion. Nicht jede Infektion wurde dabei auch von Symptomen begleitet. Der Anteil Erkrankten betrug lediglich 22 %. Aus Daten der Infektionsstudie leitete Medema *et al.* 1996 eine Dosis-Infektionsbeziehung ab, die einer β -Poisson Verteilung folgt, mit:

$$P_{inf} = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$$
$$\alpha = 0.145; \beta = 7.59$$

Formel 11: Berechnung der Infektionswahrscheinlichkeit mit *Campylobacter jejuni*

P_{inf} – Wahrscheinlichkeit der Infektion

N – Dosis (Zellzahl der Zielorganismen)

α, β – Konstanten

Die Dosis, ab der die Aufnahme von *Salmonella enterica* zu einer Infektion führt, ist generell sehr stark abhängig vom jeweiligen Serovar (USEPA 2010). McCullough und Eisele führten 1951 mehrere Studien zur Infektiösität verschiedener Serovare durch. Diese Daten wurden von Haas *et al.* (1999) gepoolt, um eine Dosis-Wirkungsbeziehung beruhend auf einer β -Poisson Verteilung ableiten zu können mit:

$$P_{inf} = 1 - \left(1 + \frac{N}{\beta}\right)^{-\alpha}$$
$$\alpha = 0.3126; \beta = 2884$$

Formel 12: Berechnung der Infektionswahrscheinlichkeit mit *Salmonella enterica*

Anhand von Daten einiger Ausbruchssituationen zeigte sich eine wesentlich geringere Infektionsdosis. Daher wurden die Konstanten von McBride *et al.* (2013) basierend auf Rose und Gerba (1991) und Bollaerts *et al.* (2008) modifiziert zu:

$$\alpha = 0.33; \beta = 139.9$$

Formel 13: Angepasste Konstanten zu Berechnung der Infektionswahrscheinlichkeit mit *Salmonella enterica*

4. Ergebnisse

Für diese Arbeit wurde eine Bestandsaufnahme sowie eine Quantifizierung der wichtigsten bekannten wasserbürtigen Pathogene in der Ruhr durchgeführt. Methodisch gestaltet sich dies als anspruchsvoll, da die Zielorganismen häufig nur einen geringen Anteil der Gesamtzellzahl einer Wasserprobe darstellen. Zusätzlich erschweren wechselnde Zusammensetzungen der Probenmatrix Oberflächenwasser einen optimalen Nachweis. Bestehende Nachweismethoden sind daher einerseits häufig nicht für den Einsatz zur Untersuchung von Oberflächenwasser optimiert worden oder andererseits sehr aufwendig. Um die hygienische Situation des Gewässers möglichst realitätsnah abbilden zu können, wurden die verwendeten Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Pathogene daher auf ihre grundsätzliche Eignung zur Anwendung auf Oberflächenwasser der Ruhr überprüft.

4.1. Optimierung und Evaluierung des Nachweises von hygienisch relevanten Bakterien im Oberflächenwasser

4.1.1. Nachweis von *Aeromonas* spp.

Der Nachweis von *Aeromonas* spp. im Oberflächengewässer orientierte sich an der von Havelaar *et al.* (1987) beschriebenen Methode. Auf dem verwendeten Selektivmedium, Ampicillin-Dextrin-Agar (ADA), werden *Aeromonas* spp. mittels eines durch Säurebildung bedingten Farbumschlags des enthaltenen Indikators Bromthymolblau von blau zu gelb hin sichtbar. Dabei wurde die Probe durch eine Membran aus Cellulosemischester (Porengröße 0,45 µm) filtriert, die anschließend auf das Nährmedium aufgelegt und inkubiert wurde. Bei der Auswertung der Ansätze aus Oberflächenwasser nach dem von Havelaar *et al.* (1987) beschriebenen Verfahren zeigte sich jedoch nicht ein einziger charakteristischer gelber Kolonietyp auf dem Membranfilter, sondern unterschiedliche Gruppen von Kolonien mit verschiedener Koloniemorphologie und Ausprägung der Färbung (Abbildung 12). Es kristallisierten sich dabei vier als positiv gewertete gelbe Kolonietypen (I. dunkel gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt; II. hell gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt; III. blass gelb, mucoid; IV. gleichmäßig gelb-orange, oft mit rauer Oberfläche) heraus, die gleichbleibend bei einer Inkubation bei 30 °C für 20 h aufzufinden waren. Ebenfalls waren durchgängig transparente, farblose Kolonien vorhanden, die als unverdächtig eingestuft wurden. Durch die Variationen im Erscheinungsbild der Kolonien war eine eindeutige Auswertung der Proben erschwert. Daher wurden Subkulturen jedes Kolonietyps angelegt und biochemischen Bestätigungstests unterzogen, um falsch-positive oder negative Ergebnisse auszuschließen. In orientierenden Untersuchungen wurde getestet, ob die Ausbeute von *Aeromonas* spp. bei einer veränderten Inkubationstemperatur (20 °C für bis zu 48 h sowie 28 °C, 30 °C und 36 °C für je 20 h) erhöht werden kann (Tabelle 45 im Anhang). Diese konnte jedoch durch eine Variation der Temperatur nicht gesteigert werden. Auch durch eine Verkürzung der Lagerungszeit auf maximal zwei Stunden gegenüber einer üblichen Lagerungszeit von etwa 20 h bis zur Bearbeitung der Probe konnte keine Verbesserung erzielt werden (Abbildung 58 im Anhang).

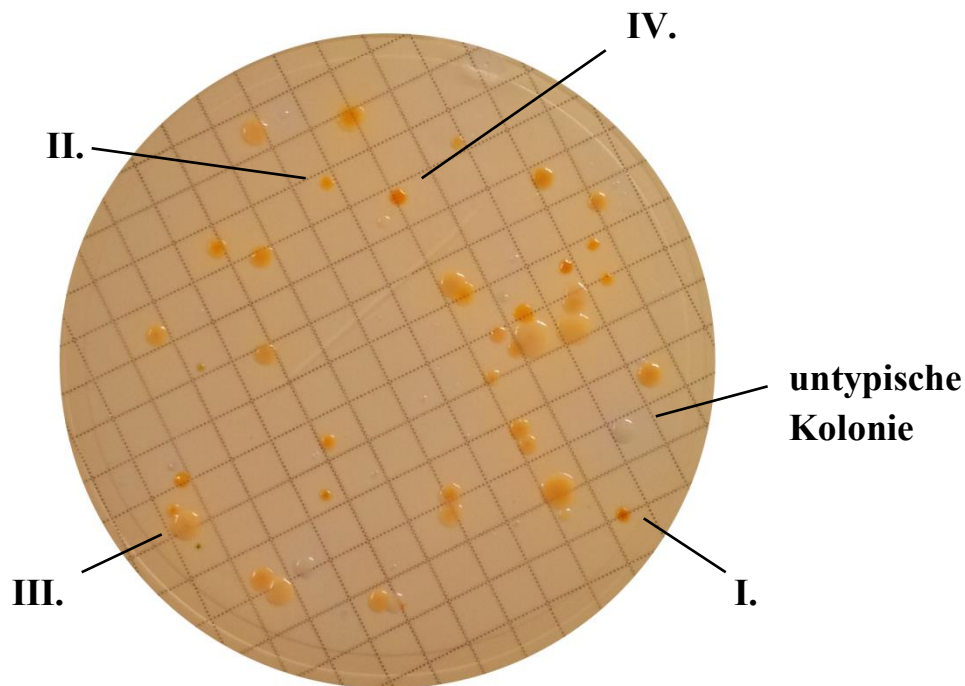


Abbildung 12: Unterschiedliche Koloniemorphologien auf der Oberfläche eines Membranfilters beim Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwasser und einer Inkubation für 20 h bei 30 °C auf ADA. Grundsätzlich wurde zwischen vier typischen, gelben Kolonietypen unterschieden: I. dunkel gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt; II. hell gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt; III. blass gelb, mucoid; IV. gleichmäßig gelb-orange, oft mit rauer Oberfläche. Es waren auch untypische farblose, transparente Kolonien vorhanden, die als unverdächtig eingestuft wurden.

4.1.1.1. Vorkommen und Identifizierung unterschiedlicher Kolonietypen

Die einzelnen Kolonietypen lagen nicht mit gleicher Häufigkeit vor. Eine Auswertung von 161 Wasserproben ergab die in Tabelle 19 dargestellte Häufigkeitsverteilung. Es zeigte sich, dass die meisten Kolonien (56 %) eine hell gelb-orange Färbung (Typ II) mit einem abgegrenzten, kräftiger gefärbten Zentrum aufwiesen. Etwas weniger häufig waren dunkel gelb-orange Kolonien mit abgegrenztem Zentrum (Typ I, 23 %) sowie größere blass gelb gefärbte, mucoide Kolonien (Typ III, 17 %). Seltener traten gleichmäßig gelb-orange Kolonien (Typ IV) auf (5 %). Die homogene Färbung war häufig auch verbunden mit einer rauen Oberfläche. Zusätzlich traten mit einem Anteil von weniger als einem Viertel an der Gesamtkoloniezahl farblose, sehr transparente Kolonien auf, die hier nicht weiter berücksichtigt wurden, da sie aufgrund einer fehlenden Gelbfärbung nicht den Kriterien des Nachweises von *Aeromonas* spp. entsprechen.

Tabelle 19: Vorkommen unterschiedlicher Kolonietypen beim Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwasser (161 Proben) auf ADA-Medium

Kolonietyp	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
I: dunkel gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt	3404	22,8 %
II: hell gelb-orange, Zentrum kräftiger gefärbt	8329	55,8 %
III: glass gelb, mucoid	2530	16,9 %
IV: gleichmäßig gelb-orange, oft mit rauer Oberfläche	676	4,5 %
Gesamtheit ausgewerteter Kolonien	14939	100 %

Die Morphologien der einzelnen Kolonietypen unterschieden sich stark. Daher wurden weitere Bestätigungsreaktionen von Isolaten aus 161 verschiedenen Oberflächenwasserproben durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den in der Auswertung als positiv gewerteten Kolonien tatsächlich um *Aeromonas* spp. handelt. Zu diesem Zweck wurden die in der Methode 1605 der US EPA empfohlenen Bestätigungsreaktionen genutzt.

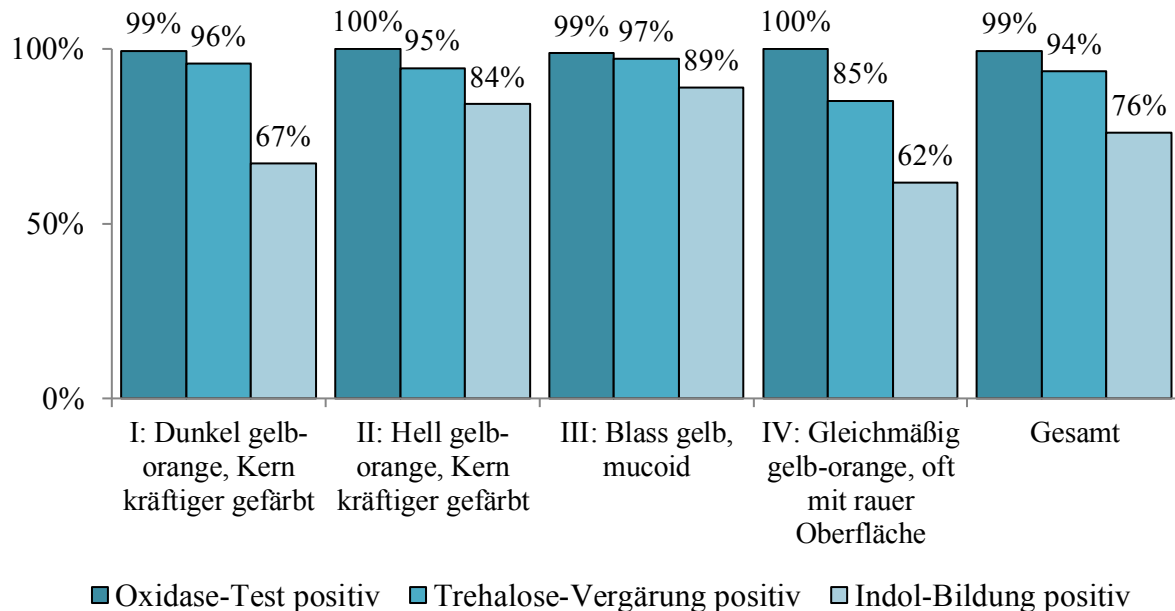


Abbildung 13: Biochemische Identifizierung von Subkulturen isoliert aus Oberflächenwasser. Als positiv für *Aeromonas* spp. gelten hierbei Oxidase-positive, Trehalose vergärende und Indol bildende Subkulturen. Die Anzahl der getesteten Subkulturen lag dabei pro Kolonietyp I-IV bei 120 bis 154 (gesamt 560).

Bei der überwiegenden Mehrheit der Kolonien fielen die Bestätigungsreaktionen positiv aus. Auffällig war hierbei, dass die Anteile der Oxidase-positiven sowie Trehalose-vergärenden Subkulturen mit 99 % und 94 % viel höher waren als der Anteil der Indol-bildenden mit 76 % (Abbildung 13). Das Verhalten der einzelnen Kolonietypen war hierbei nicht homogen. Es zeigte sich vor allem bei Kolonietyp I und IV ein niedrigerer Anteil von Indol-bildenden Subkulturen. Die Rate an positiven Bestätigungsreaktionen des häufigsten Kolonietypen II sowie von Kolonietyp III lagen hierbei bei allen untersuchten Merkmalen bei über 80 %.

Fasst man alle drei Bestätigungsreaktionen zusammen, lagen die Bestätigungsraten der Subkulturen bei 60 % bis 86 %, je nach Kolonietyp (Abbildung 14). Das Hauptausschlusskriterium, durch das eine Bestätigung nicht erfolgte, war dabei die fehlende Bildung von Indol. Unter Berücksichtigung der Häufigkeit der einzelnen Typen bei der Untersuchung der Wasserproben ergäbe sich der gewichtete Gesamtanteil bestätigter Subkulturen von 77 %. Die Subkulturen, die nicht durch die oben genannten Reaktionen als *Aeromonas* spp. bestätigt werden konnten, wurden zusätzlich durch die Verwendung des API® 20 NE-Testsystems überprüft. Dabei war es auffällig, dass häufig trotz fehlender Indol-Bildung eine Zuordnung zum Genus *Aeromonas* erfolgte.

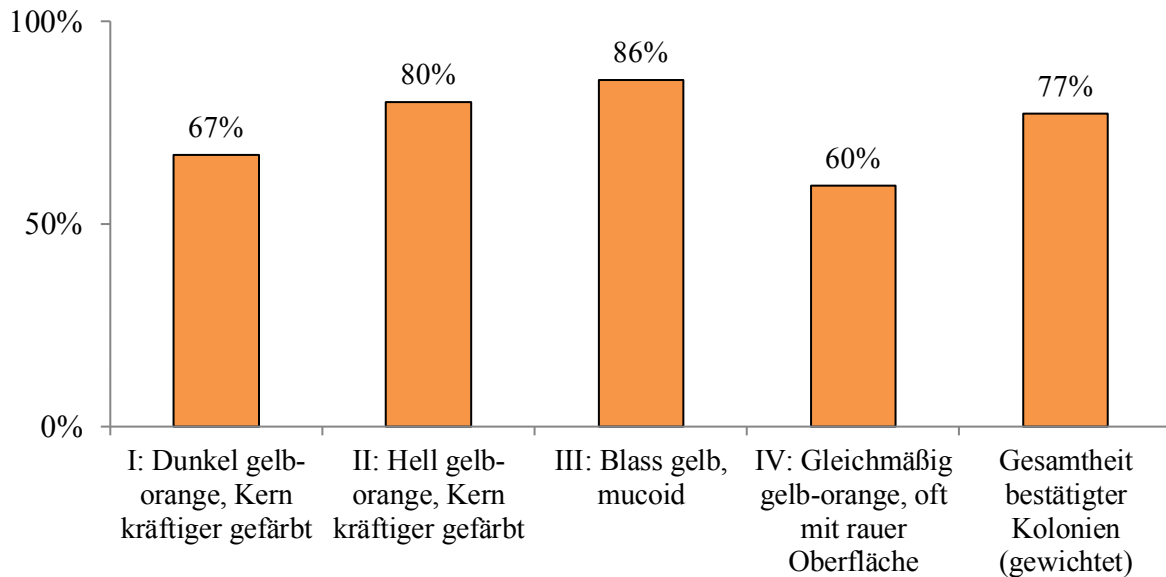


Abbildung 14: Bestätigungsraten getesteter Subkulturen aus Oberflächenwasser mit folgenden Charakteristika: Oxidase-positiv, Trehalose-vergärend und Indol-bildend. Die Anzahl der getesteten Subkulturen lag dabei pro Kolonietyp I - IV bei 120 bis 154 (gesamt 560). Der Gesamtanteil bestätigter Kolonien ist gewichtet nach dem in Tabelle 19 aufgelisteten Vorkommen der einzelnen Kolonietypen.

Da sich eine Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der Bestätigung nach US EPA-Methode 1065 und dem API® 20 NE-Testsystem zeigte, wurde eine kleinere Gesamtauswahl weiterer Subkulturen einer neuen, zusätzlichen Versuchsreihe genauer charakterisiert. Die Isolate hierzu wurden aus drei zusätzlichen Proben der PN-Stelle BarCelona gewonnen. Die Charakterisierung erfolgte -wie zuvor- mittels der Kriterien der EPA Methode 1065, sowie in ausgewählten Fällen parallel mit dem Verfahren der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Eine Identifizierung der Subkulturen wurde ebenfalls mit dem API® 20 NE-Testsystem durchgeführt.

In dieser weitergehenden Untersuchung wurden Subkulturen von 202 *Aeromonas*-typischen gelb gefärbten Kolonien und 48 von untypischen farblosen, transparenten Kolonien angelegt. Um eine Spezifität der Methode festlegen zu können, wurden dabei alle typischen Kolonien der Ansätze sowie eine repräsentative Stichprobe gleichförmiger untypischer Kolonien ausgewählt. Eine Überprüfung mittels der Bestätigungsreaktionen nach Methode 1065 zeigte, wie auch in den zuvor dargestellten Bestätigungsreaktionen, einen Ausschluss vor allem durch eine fehlende Indol-Bildung (Tabelle 20). Im Falle der untypischen Kolonien waren die Anteile positiver Bestätigungsreaktionen ebenfalls hoch, jedoch war eine Kombination mehrerer positiver Ergebnisse nur sehr selten vertreten. Bei Einbezug der Indol-Bildung konnten 82 % der typischen Kolonien bestätigt werden. Schließt man diese aus, ergibt sich eine entsprechend höhere Bestätigungsrate von 94 %.

Tabelle 20: Bestätigung von Subkulturen *Aeromonas*-typischer und –untypischer Kolonien isoliert aus Oberflächenwasser mit den in der US EPA-Methode 1065 vorgegebenen Reaktionen. Es wurden 202 Subkulturen typischer und 48 Subkulturen untypischer Kolonien untersucht.

Bestätigungsreaktionen	Anteil bei <i>Aeromonas</i>-typischen gelben Kolonien	Anteil bei <i>Aeromonas</i>-untypischen farblosen Kolonien
Oxidase-Test positiv	98 %	66 %
Trehalose-Vergärung positiv	95 %	32 %
Indol-Bildung positiv	83 %	77%
Alle Tests positiv	82 %	4 %
Oxidase-Test und Trehalose-Vergärung positiv	94 %	8 %

Dieselben Subkulturen wurden auch mit dem API[®] 20 NE-Testsystem untersucht. Dies konnte wegen mangelnder weiterer Kultivierbarkeit allerdings nur für 180 von 202 Subkulturen typischer und 45 von 48 untypischer Kolonien realisiert werden. Da dieses System eine deutlich höhere Bandbreite von 21 Stoffwechselreaktionen berücksichtigt und auf einer großen Datenbank an Stoffwechselprofilen beruht, gilt eine Identifizierung als zuverlässig und ist größtenteils bis hin zur Speziesebene möglich. Mit diesem Testsystem als Referenz konnte mit 90 % ein ähnliche hoher Anteil der typischen Kolonien bestätigt werden (Tabelle 21). Der Anteil der falsch-positiven Kolonien belief sich dabei auf 8 %. Ebenso konnten einige Subkulturen untypischer Kolonien als *Aeromonas* spp. identifiziert werden. Der Anteil der falsch negativen Kolonien betrug 13 % (Tabelle 22).

4. Ergebnisse

Tabelle 21: Identifizierung von Subkulturen aller 180 *Aeromonas*-typischen gelben Kolonien aus drei Oberflächenwasserproben mit dem API® 20 NE-Testsystem.

Ergebnis der Identifizierung <i>Aeromonas</i>-<u>typischer</u> Kolonien mittels API® 20 NE	Anzahl der Identifizierungsergebnisse
<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	100
<i>Aeromonas sobria</i>	39
Identifizierung auf Genusebene: <i>Aeromonas</i> spp.	23
<i>Aeromonas</i> spp. gesamt	162 (90 %)
<i>Acinetobacter junii / johnsonii</i>	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
<i>Pseudomonas putida</i>	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1
<i>Vibrio cholerae</i>	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	1
nicht als <i>Aeromonas</i> spp. identifiziert gesamt	15 (8 %)
Keine Identifizierung möglich	3 (2 %)
Insgesamt getestet	180 (100 %)

Tabelle 22: Identifizierung von Subkulturen aller 45 *Aeromonas*-untypischen farblosen Kolonien aus drei Oberflächenwasserproben mit dem API® 20 NE-Testsystem.

Ergebnis der Identifizierung <i>Aeromonas</i>-<u>untypischer</u> Kolonien mittels API® 20 NE	Anzahl der Identifizierungsergebnisse
<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	3
<i>Aeromonas sobria</i>	3
<i>Aeromonas</i> spp. gesamt	6 (13 %)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
<i>Acinetobacter junii / johnsonii</i>	5
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Pseudomonas putida</i>	2
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>	1
<i>Comamonas testosteroni / Pseudomonas alcaligenes</i>	1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	1
nicht als <i>Aeromonas</i> spp. identifiziert gesamt	31 (69 %)
Keine Identifizierung möglich	8 (18 %)
Insgesamt getestet	45 (100 %)

Zur Absicherung der Methode wurde eine Teilmenge von 56 der 225 identifizierten Subkulturen sowie alle mit auffälligen Identifizierungsergebnissen zusätzlich mittels FISH untersucht. Dabei wurde die für *Aeromonas* spp. spezifische Sonde AERBOMO verwendet, die in Bomo *et al.* (2004) beschrieben ist. Es zeigte sich, dass mit dem API® 20 NE-Identifizierungsergebnis bei der untersuchten Stichprobe übereinstimmender typischer sowie untypischer Koloniemorphologie immer eine Bestätigung des Ergebnisses erzielt wurde (Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ausgewählter, identifizierter Subkulturen *Aeromonas*-typischer und untypischer Kolonien

Kategorien Koloniemorphologie und Identifizierung durch API® 20 NE	Anzahl untersuchter Kolonien	FISH-positiv (Anzahl Isolate)	FISH-negativ (Anzahl Isolate)
<i>Aeromonas</i> - <u>typisch</u> und identifiziert als <i>Aeromonas</i> spp.	19	19	0
<i>Aeromonas</i> - <u>typisch</u> und <u>nicht</u> identifiziert als <i>Aeromonas</i> spp.	9	2	7
<i>Aeromonas</i> - <u>typisch</u> und eindeutige Identifizierung nicht möglich	1	1	0
<i>Aeromonas</i> - <u>untypisch</u> und identifiziert als <i>Aeromonas</i> spp.	5	3	2
<i>Aeromonas</i> - <u>untypisch</u> und <u>nicht</u> identifiziert als <i>Aeromonas</i> spp.	12	0	12
<i>Aeromonas</i> - <u>untypisch</u> und eindeutige Identifizierung nicht möglich	10	0	10
Funktionskontrollen	Gegenfärbung mit DAPI, um ein Vorhandensein von ausreichend Zellmaterial anzuzeigen, war bei allen Subkulturen positiv Als Positivkontrolle bei jeder Hybridisierung wurde der Referenzstamm <i>Aeromonas hydrophila</i> DSM 30187 eingesetzt		

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der überwiegende Anteil der als typisch bewerteten, gelb gefärbten Kolonien auch mit Hilfe der gewählten Tests bestätigt wurde. Da diese sowohl auf molekularbiologischen Techniken als auch umfangreichen biochemischen Reaktionsprofilen basierten, kann das Ergebnis hierbei als sicher eingestuft werden. Neben dem geringen Anteil an falsch-positiven Befunden, war auch ein kleiner Anteil falsch-negativer Ergebnisse zu verzeichnen. Da die Anteile der beiden Gruppen falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse beide nur einen kleinen Anteil der Gesamtanzahl ausmachen und sich zudem noch in einer ähnlichen Größenordnung bewegen, ist insgesamt nicht mit einer erheblichen Über- oder Untererfassung zu rechnen. Eine Verbesserung der Wiederfindung mittels Variationen der Lagerzeit der Proben oder Anpassung der Inkubationsbedingungen konnte nicht erzielt werden, sodass die Methode wie zuvor geplant mit einer Höchstlagerungsdauer der Proben von 24 h und einer Inkubation über 20 ± 4 h bei 30°C bei Oberflächengewässern weiter angewendet werden konnte.

4.1.2. Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Oberflächengewässern

Anders als bei *Aeromonas* spp. existierte für *Pseudomonas aeruginosa* zum Untersuchungszeitpunkt in Deutschland ein in DIN EN ISO 16266:2008 festgelegtes genormtes Verfahren zum quantitativen Nachweis. Diese Norm wurde jedoch vor allem im Hinblick auf die Untersuchung von Mineral- und Tafelwässern sowie anderer Wässer mit niedriger Keimbelastung entwickelt (siehe Anwendungsbereich DIN EN ISO 16266:2008). In der Anwendung der Methode auf Oberflächenwasser zeigte sich, dass das verwendete Selektivmedium CN-Agar keine ausreichende Unterdrückung der Begleitflora für diesen Verwendungszweck bieten konnte (Kapitel 4.1.2.1).

Insgesamt wurden daher parallel vier verschiedene Methoden zur quantitativen Erfassung von *P. aeruginosa* angewendet. Neben der genormten Methode DIN EN ISO 16266:2008 waren dies eine MPN-basierte Methode, Pseudalert® der Firma IDEXX, eine weitere Membranfiltrationsmethode mit

Verwendung des Selektivmediums RAPID[®]*P.aeruginosa*-Agar der Firma Bio-Rad sowie eine zusätzliche MPN-basierte Methode, beruhend auf der inzwischen zurückgezogenen Norm DIN 38411-8:1982. Zum Vergleich der Methoden wurden insgesamt 34 Proben an den beiden Probenahmestellen Seaside Beach und Fischereiverein über einen Zeitraum von 12 Monaten untersucht.

Die beiden genormten Verfahren nach DIN EN ISO 16266:2008 und DIN 38411-8:1982 zeigten dabei eine gute Korrelation ($r^2 = 0,8$) (Abbildung 15). Die parallel ermittelten Werte derselben Proben lagen ebenfalls alle in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich. Bei einer analogen Auftragung der Werte -ermittelt nach DIN 38411-8:1982- gegen die MPN-Konzentration ermittelt durch das Pseudalert[®]-System (Abbildung 16) zeigte sich zwar ein gemeinsamer Trend, es fällt jedoch auf, dass die mit dem Pseudalert[®]-System ermittelten Werte um ein Vielfaches höher lagen. Bei einem Vergleich der Referenzmethode mit dem Verfahren der Firma Bio-Rad hingegen zeichneten sich weder allgemeine Trends ($r^2 = 0,0$) noch ähnliche Konzentrationsbereiche gleichermaßen ab (Abbildung 17).

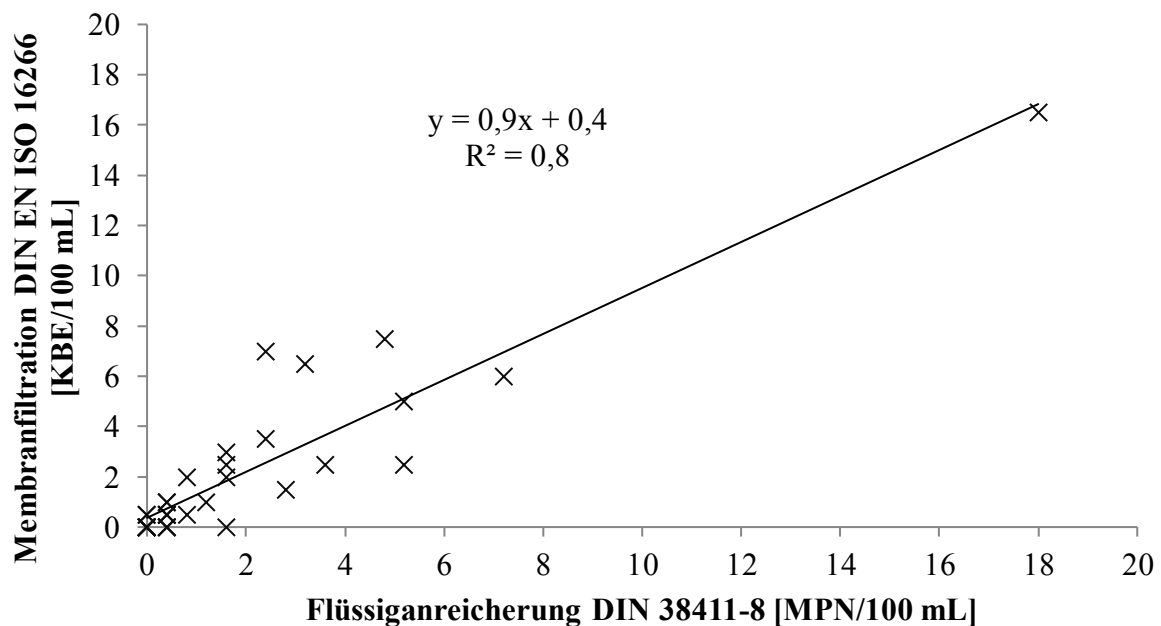


Abbildung 15: Beziehung der ermittelten Konzentrationen von *P. aeruginosa* nach dem in DIN 38411-8:1982 festgelegten MPN-Verfahren der Flüssiganreicherung in Malachitgrünbouillon gegen die Konzentrationen derselben Proben mit dem in DIN EN ISO 16266:2008 festgelegten Verfahren der Membranfiltration unter Verwendung von CN-Agar. Die 34 untersuchten Wasserproben wurden an zwei Probenahmestellen (Fischereiverein, Seaside Beach) entlang der Ruhr über einen Zeitraum von 12 Monaten entnommen.

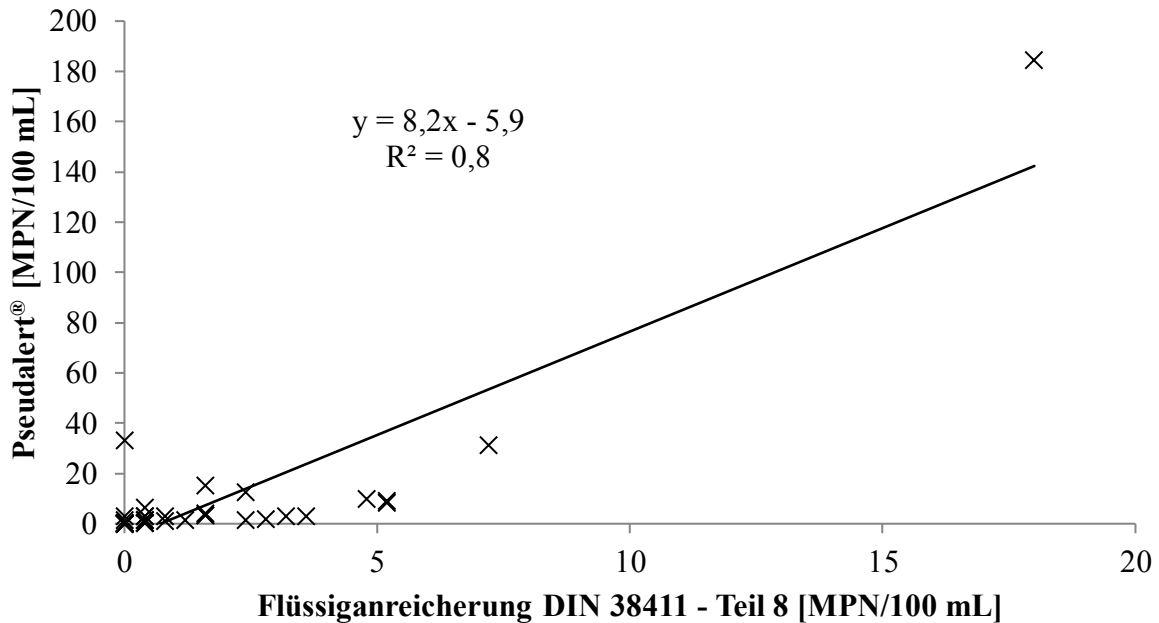


Abbildung 16: Beziehung der ermittelten Konzentrationen von *P. aeruginosa* nach dem in DIN 38411-8:1982 festgelegten MPN-Verfahren der Flüssiganreicherung in Malachitgrünbouillon gegen die Konzentrationen derselben Proben mit dem kommerziellen MPN-Testsystem Pseudalert® der Firma IDEXX. Die 34 untersuchten Wasserproben wurden an zwei Probenahmestellen (Fischereiverein, Seaside Beach) entlang der Ruhr über einen Zeitraum von 12 Monaten entnommen.

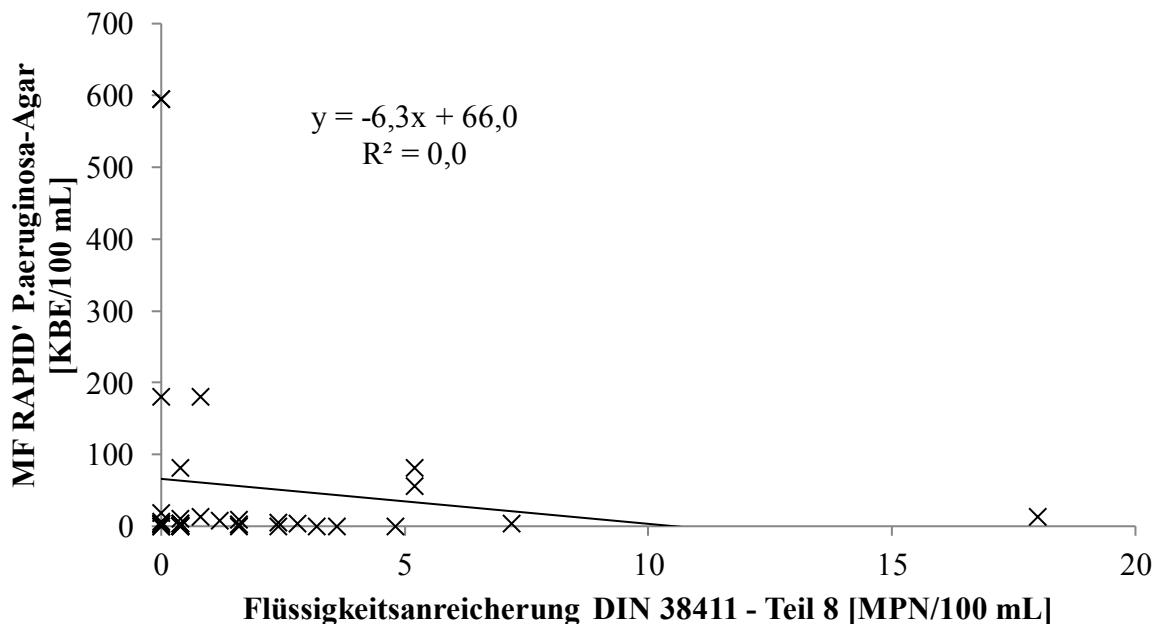


Abbildung 17: Auftragung der ermittelten Konzentrationen von *P. aeruginosa* nach dem in DIN 38411-8:1982 festgelegten MPN-Verfahren der Flüssiganreicherung in Malachitgrünbouillon gegen die Konzentrationen derselben Proben unter Verwendung des RAPID'*P.aeruginosa*-Agars der Firma Bio-Rad mit vorheriger Membranfiltration (MF). Die 34 untersuchten Wasserproben wurden an zwei Probenahmestellen (Fischereiverein, Seaside Beach) entlang der Ruhr über einen Zeitraum von 12 Monaten entnommen.

4.1.2.1. Eignung des Membranfiltrationsverfahrens DIN EN ISO 16266:2008 zum quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* in Oberflächenwasser

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben liefert das Membranfiltrationsverfahren nach DIN EN ISO 16266:2008 vergleichbare Ergebnisse zur MPN-Methode nach DIN 38411-8:1982. Der Nachweis von *P. aeruginosa* erfolgt nach DIN EN ISO 16266:2008 über die Pyocyanin- bzw. Pyorubinbildung auf dem Selektivmedium Ceftrimid-Nalidixinsäure(CN)-Agar. Dadurch können typische Kolonien anhand einer grünen oder braun-roten Färbung identifiziert werden. Entsprechend dieser Norm sind auch fluoreszierende, farblose Kolonien auf *P. aeruginosa* zu überprüfen. In der Umsetzung bei der Analyse von Oberflächenwasserproben konnte dieses jedoch nicht realisiert werden. Ein Grund hierfür waren flächiger Bewuchs, vor allem bei höheren Volumina von 100 mL (Abbildung 18), der eine Subkultivierung einzelner Kolonien erheblich erschwerte.

Von einer Oberflächenwasserprobe mit 10 mL Probevolumen wurden repräsentativ alle fluoreszierenden Kolonien subkultiviert, wobei keine der 17 untersuchten Kolonien mittels Oxidase-Tests und Acetamidverwertung als *P. aeruginosa* identifiziert werden konnte. Daher wurden bei den folgenden Beprobungen lediglich Kolonien ausgezählt, die eine entsprechende Bildung blau-grüner Pigmente aufwiesen. Dieses Vorgehen entspricht ebenfalls der Empfehlung der Schwimm- und Badebeckenwasserkommission des Umweltbundesamtes (2009) für Kleinbadeteiche. Hierbei war jedoch stets ein konfluenter Bewuchs, hervorgerufen durch die Begleitflora, zu verzeichnen.

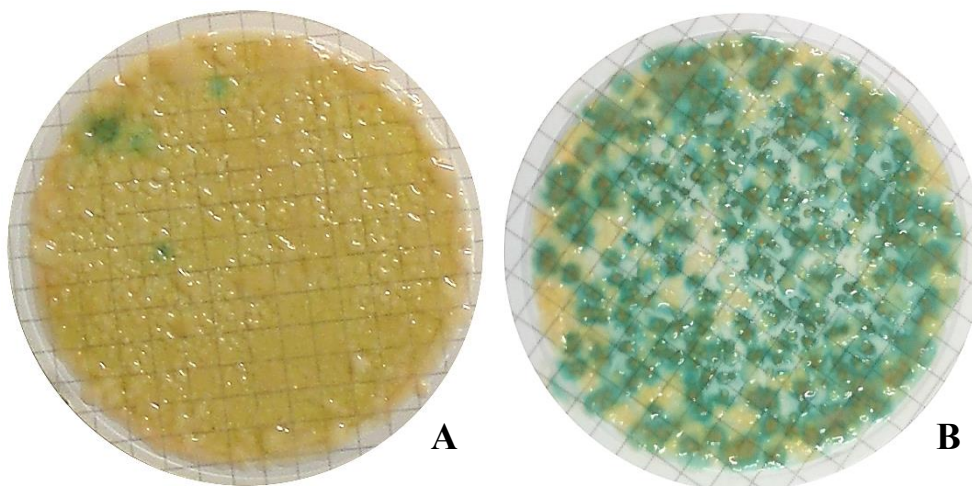


Abbildung 18: Bewuchs auf einem Membranfilter auf CN-Agar bei der Untersuchung von 100 mL einer Oberflächenwasserprobe mit einem niedrigen (A) und einem hohen (B) Gehalt an *P. aeruginosa* nach DIN EN ISO 16266:2008.

4.1.2.2. Eignung des MPN-Verfahrens DIN 38411-8:1982 zum quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* in Oberflächenwasser

Diese Methode wurde wegen des in der Norm angegebenen Anwendungsbereichs als Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung von *P. aeruginosa* ausgewählt. Beim Vergleich der ermittelten Konzentrationen mit den Ergebnissen durch das derzeit gültige Verfahren DIN EN ISO 16266:2008 zeigt sich, dass beide vergleichbare Werte liefern. Hierbei erfolgte eine Identifizierung gewonnener Isolate durch die Anwendung unterschiedlicher Bestätigungsreaktionen (Oxidase-Test, Bildung eines blauen oder grünen Pigments (PAP), Bildung von Fluorescein (PAF), Acetamid-Verwertung und optional das Wachstum bei 42 °C). Zusätzlich wurden Isolate unterschiedlicher Phänotypen zur Identifizierung in das API® 20 NE-Testsystem eingesetzt. Insgesamt konnten alle 187 getesteten und nach dem Untersuchungsgang als positiv zu wertenden Ansätze, auch mittels API® 20

NE-Testsystem bestätigt werden (Tabelle 24). Ebenso wurden einige Isolate zusätzlich überprüft, deren Phänotyp *P. aeruginosa* entsprach, die aber aufgrund des fehlenden Wachstums bei 42 °C ausgeschlossen worden waren. Es konnte bei dieser sehr kleinen Anzahl an Isolaten in drei von fünf Fällen *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Hier ist zu beachten, dass diese Kombination der Testergebnisse im Vergleich zu den anderen Kategorien nur sehr selten auftrat.

Tabelle 24: Überprüfung von mittels Nachweisverfahren nach DIN 38411-8:1982 gewonnener Isolate mit Hilfe des kommerziellen Testsystems API® 20 NE. Die Kategorie gibt an, ob das Isolat gemäß der Nachweismethode als positiv oder negativ zu werten ist. Die Zahl in Klammern entspricht der Häufigkeit des Identifizierungsergebnisses. (PAP – *Pseudomonas*-Agar P; PAF – *Pseudomonas*-Agar F)

Kategorie	Phänotyp Isolat	Anzahl getestet	Ergebnis der Identifizierung mittels API® 20 NE
1 (positiv)	Bildung eines blauen oder grünen Pigments (PAP), Bildung von Fluorescein (PAF), Acetamid-Verwertung positiv	83	<i>P. aeruginosa</i> (83)
2 (positiv)	Bildung eines blauen oder grünen Pigments fehlt (apyocyanogen, PAP), Bildung von Fluorescein (PAF), Acetamid-Verwertung positiv, Wachstum bei 42 °C	101	<i>P. aeruginosa</i> (101)
3 (positiv)	Bildung eines roten oder rotbraunen Pigments (PAP), Bildung von Fluorescein (PAF), Acetamid-Verwertung positiv, Wachstum bei 42 °C	3	<i>P. aeruginosa</i> (3)
4 (negativ)	Bildung eines blauen oder grünen Pigments fehlt (PAP), Bildung von Fluorescein (PAF), Acetamid-Verwertung positiv, kein Wachstum bei 42 °C	5	<i>P. aeruginosa</i> (3) <i>P. putida</i> (2)

4.1.2.3. Eignung des kommerziellen MPN-Systems Pseudalert® zum quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* in Oberflächenwasser

Das von der Firma IDEXX entwickelte System Pseudalert® basiert auf dem MPN-Konzept. Die zu untersuchende Wasserprobe wird hierbei mit einem speziellen Selektivmedium vermischt und in einen versiegelbaren Folienträger (Tray) mit unterschiedlichen Vertiefungen eines definierten Volumens gegeben. Das Nährmedium enthält ein fluorogenes Substrat, das von einem für *P. aeruginosa* spezifischen Enzym gespalten wird. Dadurch können nach der Inkubation die Vertiefungen, die den Zielorganismus enthalten, unter UV-Licht ermittelt werden. Das Verhältnis positiver und negativer Vertiefungen ermöglicht anschließend die Ermittlung der ursprünglichen Konzentration anhand einer MPN-Tabelle. Laut Herstellerangaben werden alle Vertiefungen, die eine bläuliche Fluoreszenz aufweisen, als positiv bewertet. Eine schwache grüne Fluoreszenz sei hingegen bei Abwesenheit des Zielorganismus zu beobachten. Eine solche war jedoch bei der Auswertung der Oberflächenwasserproben nicht zu beobachten.

Hier zeigte stets das gesamte Tray eine leicht weißlich-bläuliche Grundfluoreszenz, aus der einige Vertiefungen mit höherer Intensität hervorstachen. Die Ausprägung des Fluoreszenzanstiegs war dabei nicht einheitlich. Einen Eindruck der Auswertungssituation vermittelt Abbildung 19. Eine Einteilung in positive Vertiefungen war somit nicht eindeutig möglich, da unklar war, ab wann eine erhöhte Fluoreszenz als positiv zu werten ist bzw. wodurch die Hintergrundfluoreszenz hervorgerufen wird.

Ein vollkommen anderes Bild zeigte sich bei der Analyse von Wasserproben, die aus dem Prozess der Trinkwasseraufbereitung gewonnen wurden. Hier entsprach das Aussehen der Vertiefungen denen der Negativkontrolle.

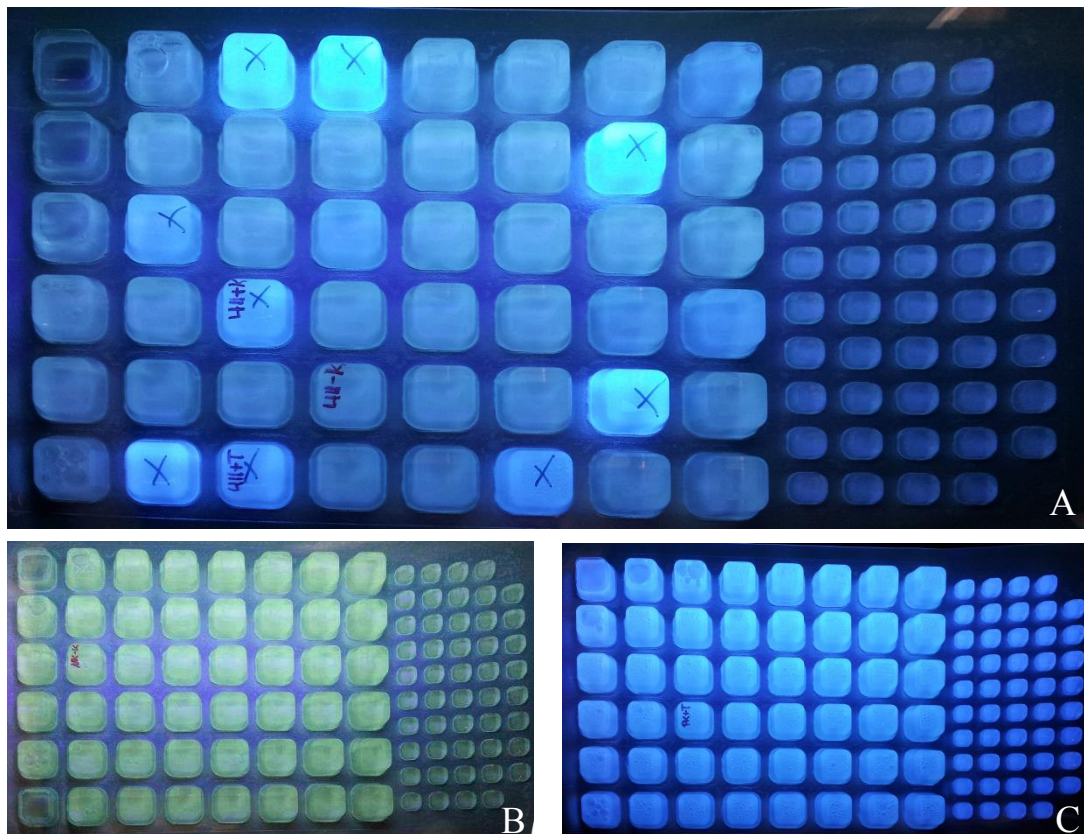


Abbildung 19: Auswertung versiegelter Folienträger beim quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* mit dem kommerziellen MPN-System Pseudalert® (IDEXX). A zeigt das Ergebnis beim Einsetzen einer Oberflächenwasserprobe in das Testsystem, B entspricht der Negativkontrolle (steriles Deionat), C entspricht der Positivkontrolle (Zellsuspension von *P. aeruginosa* 50071 in sterilem Deionat)

Verglichen mit anderen hier berücksichtigten Methoden wichen die mit dem MPN-System Pseudalert® erhaltenen Konzentrationen häufig stark nach oben hin ab. In einer ersten Untersuchung wurden daher ausgewählte als positiv bzw. negativ gewertete Vertiefungen beprobt sowie solche, bei denen nicht klar war, ob die Fluoreszenz bereits als positiv zu werten ist. Dazu wurde etwas Zellsuspension entnommen und sowohl auf Cetrimid- als auch auf Nähragar ausgestrichen. Die Subkulturen wurden anschließend, falls Oxidase-positiv, entweder anhand des API® 20 NE-Testsystems oder mittels der in DIN EN ISO 16266:2008 vorgesehenen Reaktionen identifiziert. Dabei konnte aus 16 % der stark fluoreszierenden (6 von 37) und 75 % der schwächer fluoreszierenden (6 von 8) Vertiefungen *P. aeruginosa* isoliert werden. Demgegenüber konnten aber auch bei 5 % der Vertiefungen (2 von 41), die einer Hintergrundfluoreszenz zugeordnet wurden, *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Die stichprobenartige Identifizierung zeigte bei Abwesenheit des Zielorganismus unter anderem *Aeromonas hydrophila* und *Comamonas testosteroni* / *Pseudomonas alcaligenes* auf.

Zur Überprüfung, ob andere *Pseudomonas*-Arten oder *A. hydrophila* ebenfalls eine Fluoreszenz hervorrufen können, wurden Suspensionen entsprechender Referenzstämme von 10^3 Zellen/100 mL in das Testsystem eingesetzt. Eine genaue Auflistung der Stämme ist Tabelle 47 im Anhang zu entnehmen. Hierbei war bei allen sieben getesteten *Pseudomonas*-Arten lediglich beim Zielorganismus und dessen Umweltisolat eine blaue Fluoreszenz ablesbar. Auch bei *A. hydrophila* blieb diese aus, obwohl diese Spezies zuvor aus einer fluoreszierenden Vertiefung isoliert werden konnte.

Um einen Eindruck von der Wiederfindungsrate des Quantifizierungssystems und der Wachstumsentwicklung innerhalb der Vertiefungen gewinnen zu können, wurde eine definierte Zellzahl des *P. aeruginosa*-Referenzstamms DSM 50071 in einem weiteren Experiment in das Quantifizierungssystem eingesetzt. Die Zellzahl wurde dazu mittels Thoma Zählkammer auf etwa 30 Zellen pro 100 mL Probe eingestellt. Um eine niedrige Bestätigungsrate durch Hemmstoffe des Selektivmediums sowie die Inkubationsbedingungen auszuschließen, wurde zusätzlich die kulturunabhängige Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) angewandt. Dazu wurde steril ein Aliquot von 1 mL aus der zu testenden Vertiefung entnommen und direkt weiterverarbeitet. Parallel erfolgte eine Bestimmung der Koloniezahl mittels Ausplattieren auf dem Selektivmedium Cetrimidagar sowie auf Nähragar als auch eine fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Wie auch bei den untersuchten Umweltproben zeigten sich bei der Auswertung unter UV-Licht Variationen in der Fluoreszenzintensität. Es konnten jedoch Vertiefungen abgegrenzt werden, die nach Herstellerangaben eindeutig als negativ einzustufen waren (Abbildung 59 im Anhang). Darüber hinaus waren auch unterschiedlich starke Trübungen zu erkennen. Dabei konnte in allen Vertiefungen, auch wenn diese eindeutig als negativ zu werten waren, mit kulturabhängigen sowie unabhängigen Methoden ein Wachstum des Zielorganismus nachgewiesen werden. Allerdings waren hierbei die Konzentrationen der Gesamtzellzahl mit etwa 10^6 bis 10^7 Zellen/mL um eine bis zwei Zehnerpotenzen geringer als bei einer positiven Fluoreszenz. Die Intensität stand ebenfalls in Zusammenhang mit einem erhöhten Anstieg der Konzentration. Die Kultivierbarkeit lag, gemessen an der jeweiligen Gesamtzellzahl, bei den gewählten Medien bei mindestens 17 %, wobei in den fluoreszierenden Vertiefungen durchschnittlich ein höherer Anteil an kultivierbaren Zellen vorhanden war (Details können Tabelle 25 entnommen werden). Ein Einfluss durch eine Kontamination der Probe kann ausgeschlossen werden, da der Anteil der FISH-positiven Zellen bei allen getesteten Vertiefungen stets 100 % betrug.

Tabelle 25: Beprobung ausgewählter Vertiefungen einer Pseudalert® Bestimmung mit Einsatz einer Zellsuspension des Referenzstamms *P. aeruginosa* DSM 50071 von ca. 30 Zellen/100 mL. Eine Inkubation sowie eine Auswertung unter UV-Licht (365 nm) erfolgte nach Herstellerangaben. Die Bestimmung der Koloniezahl erfolgte durch Ausplattieren auf Nähragar (NA) und Cetrimidagar (Cet), die der Gesamtzellzahl durch Fluoreszenzmikroskopie.

* Geschätzter Wert, Konzentration lag unterhalb der Quantifizierungsgrenze

#	Auswertung der Vertiefung unter UV-Licht		Koloniezahl [KBE/mL]	Gesamtzellzahl [KBE/mL]	Kultivierbarkeit	Anteil FISH positiv
	Fluoreszenz	Trübung				
1	stark blau	deutlich	2,0 x 10 ⁸ (NA)	2,1 x 10 ⁸	95 % (NA)	100 %
			2,2 x 10 ⁸ (Cet)		105 % (Cet)	
2	stark blau	deutlich	4,8 x 10 ⁷ (NA)	7,4 x 10 ⁷	65 % (NA)	n. b.
			6,0 x 10 ⁷ (Cet)		80 % (Cet)	
3	stark blau	deutlich	8,0 x 10 ⁷ (NA)	1,5 x 10 ⁸	54 % (NA)	100 %
			1,2 x 10 ⁸ (Cet)		79 % (Cet)	
4	schwach blau	schwach	7,7 x 10 ⁷ (NA)	9,4 x 10 ⁷	82 % (NA)	n. b.
			7,0 x 10 ⁷ (Cet)		74,6 % (Cet)	
5	schwach blau	schwach	4,7 x 10 ⁷ (NA)	8,2 x 10 ⁷	58 % (NA)	100 %
			4,6 x 10 ⁷ (Cet)		56 % (Cet)	
6	keine, blass grün	stark	1,1 x 10 ⁷ (NA)	2,6 x 10 ⁷	42 % (NA)	100 %
			1,8 x 10 ⁷ (Cet)		69 % (Cet)	
7	keine, blass grün	keine	2,4 x 10 ⁷ (NA)	2,9 x 10 ⁷	82 % (NA)	100 %
			5,0 x 10 ⁶ (Cet)		17 % (Cet)	
8	keine, blass grün	keine	2,5 x 10 ⁵ (NA)	1,0 x 10 ^{6*}	25 % (NA)	100 %
			2,5 x 10 ⁵ (Cet)		25 % (Cet)	

In einer tiefergründigen Prüfung der Spezifität bei Umweltproben wurde eine größere Menge an Vertiefungen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Zum einen wurde eine Stichprobe von 183 Subkulturen gewonnen aus 63 unterschiedlichen Vertiefungen mehrerer Proben nach den vom Hersteller vorgeschlagenen Kriterien (Oxidase-Test, Acetamid-Verwertung, Hydrolyse von Casein, und Wachstum bei 42 °C) untersucht. Dabei konnte *P. aeruginosa* in 27 % (14 von 51) der untersuchten positiven, fluoreszierenden Vertiefungen und keiner der 12 negativen Vertiefungen nachgewiesen werden. Zum anderen erfolgte auch eine Identifizierung von 46 weiteren Isolaten aus Vertiefungen anderer Ansätze von Oberflächenwasser-Proben nach den Bestätigungsreaktionen gemäß DIN EN ISO 16266:2008. In der Stichprobe wurde hierbei auch ein höherer Anteil negativer Vertiefungen berücksichtigt. Es konnten in diesem Fall ähnliche Ergebnisse reproduziert werden. Ein Nachweis von *P. aeruginosa* konnte nur in 25 % (6 von 24) der positiven Vertiefungen erzielt werden. Demgegenüber konnte aus einer der 22 untersuchten negativen Vertiefungen eine als *P. aeruginosa* identifizierte Subkultur gewonnen werden.

4.1.2.4. Eignung des Selektionsmediums RAPID'*P. aeruginosa*-Agar zum quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* in Oberflächenwasser

Grundlage dieser Methode ist eine Membranfiltration und die Auflage des Filters auf das Medium RAPID'*P. aeruginosa*-Agar, das Kolonien von *P. aeruginosa* durch Verwertung eines chromogenen Substrats sichtbar machen soll. Diese zeichnen sich nach Herstellerangaben anschließend durch eine blaue bis blaugüne Färbung aus und heben sich dadurch von den farblosen Kolonien der Begleitflora

ab. Bei dem Einsatz des Selektivmediums zur Analyse von Oberflächenwasser trat jedoch eine Variation verschiedener bläulich gefärbter Kolonietypen auf (Abbildung 20). Diese bildeten drei wesentliche phänotypische Gruppen: I blass grün-blau-graue Kolonien, zentral gefärbt, II kräftiger türkise, eher kleine Kolonien, III dunkel grün-blaue Kolonien, eher groß, komplett gefärbt. Zusätzlich trat eine Vielzahl von kleinen farblosen Kolonien auf, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Bei vereinzelt Proben zeigte sich eine andere Farbverteilung, wobei sich lediglich kleine, hellgrüne und große, dunkelgrüne Kolonien abhoben. Kolonietyp I trat dabei mit etwa 20 - 500 KBE/100 mL am häufigsten auf. Kolonien des Typs II waren nur mit einer niedrigen ein- bis zweistelligen Anzahl pro 100 mL Probe vertreten. Bei Kolonietyp III waren die Werte noch etwas geringer und dieser kam nicht bei jeder untersuchten Probe vor. Nach Anweisungen des Herstellers soll die Gesamtkoloniezahl pro Ansatz jedoch 100 KBE nicht überschreiten.

Da die Analyseergebnisse sich je nach Ausschluss unterschiedlicher Kolonietypen stark unterscheiden, wurden stichprobenartig Kolonien jedes Typs mittels API® 20 NE Identifizierungssystem überprüft. Dies lieferte ein grobes Werkzeug zur Einordnung der Ergebnisse, da keine der überprüften Kolonien der Typen I (0 von 8) und II (0 von 9), jedoch alle überprüften Kolonien des Typs III (6 von 6), als *P. aeruginosa* bestätigt werden konnten. Im Falle der Proben mit seltenen auftretenden hell- und dunkelgrünen Kolonien zeigte sich ein heterogeneres Bild. Hier konnten keine der hellgrünen Kolonien (0 von 4) und eine der beiden getesteten dunkelgrünen Kolonien als *P. aeruginosa* identifiziert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden bei quantitativen Analysen mit diesem Verfahren alle Kolonien des Typs III und alle dunkelgrünen Kolonien berücksichtigt. Da sich die Ergebnisse jedoch nicht mit denen anderer Verfahren deckten (Kapitel 4.1.2), wurde eine tiefergehende Evaluierung des Verfahrens durchgeführt.

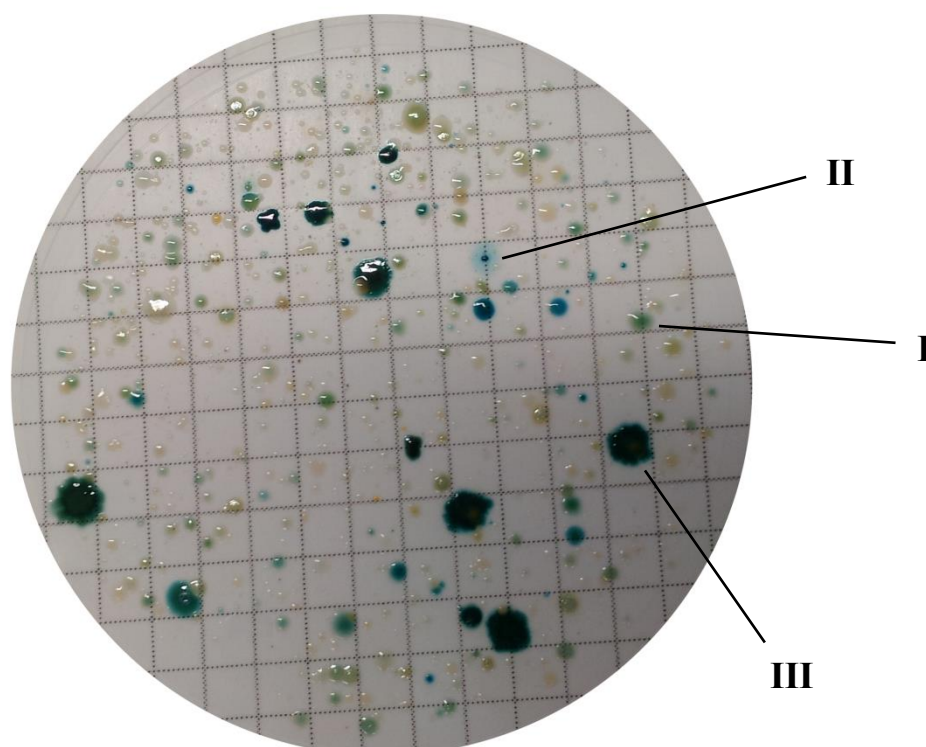


Abbildung 20: Unterschiedliche Kolonietypen auf einem Membranfilter beim quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* mittels RAPID'*P.aeruginosa*-Agar (Bio-Rad). Es zeigten sich drei Haupttypen von gefärbten Kolonien: I blass grün-blau-graue Kolonien, zentral gefärbt, II kräftiger türkise, eher kleine Kolonien, III dunkel grün-blaue Kolonien, eher groß, komplett gefärbt. Daneben traten auch kleine, farblose Kolonien auf, die nach Angaben des Herstellers nicht als *P. aeruginosa* zu werten sind. (Probe – 100 mL Oberflächenwasser)

Generell sind mehrere Faktoren einzubeziehen, die Einfluss auf die Ausprägung der Koloniefärbung und somit auf die Güte der Auswertung haben können. Zum einen gibt der Hersteller für die Analyse ein Inkubationsintervall von 22 bis 30 h bei 36 ± 2 °C an. Bei der Untersuchung der Wasserproben zeigte sich, dass sich die Farbintensität innerhalb dieser Zeitspanne noch stark verändert, was die Einstufung in unterschiedliche Kategorien deutlich beeinflussen kann (Abbildung 60 im Anhang). Nach 22 h war die Färbung nur schwach ausgeprägt und die Kolonietypen kaum zu unterscheiden. Bei einer weiteren Inkubation bis zu 28 h intensivierte sich die Färbung stetig. Über diesen Zeitpunkt hinaus war bis zu einer Inkubationszeit von 48 h keine wesentliche Veränderung der Koloniemorphologie und -färbung mehr zu beobachten. Beruhend darauf wurde die zuvor angestrebte Inkubationszeit von 28 h bis 30 h als angemessen gewertet und beibehalten.

Zusätzlich wurde überprüft, ob sich unterschiedliche Stämme von *P. aeruginosa* beim Wachstum auf RAPID'*P.aeruginosa*-Agar in ihrer Färbung und Morphologie der Kolonien unterscheiden. Es wurden dazu bewusst unterschiedliche Referenzstämme der DMSZ sowie Umweltisolate unterschiedlicher Charakteristika ausgewählt. Diese wurden als Suspensionen von 10 bis 100 Zellen pro Probe in das Untersuchungsverfahren eingesetzt sowie direkt auf dem Nährmedium ausgestrichen. Bei der Auswertung nach 20 h und 40 h zeigte sich eine Grün- oder Blaufärbung der Kolonien und Ausstriche aller Referenzstämme und Umweltisolate mit Ausnahme der mucoiden Stämme. Diese waren beim ersten Ablesen nach 20 h zunächst farblos, mit der Zeit entwickelte sich eine braune Färbung. Eine Übersicht der getesteten Stämme gibt Tabelle 48 (Anhang). Die vorherigen orientierenden Untersuchungen zeigten, dass nicht alle Kolonien, die auf dem Medium eine bläuliche Färbung hervorriefen, als *P. aeruginosa* bestätigt werden konnten. Daher wurden ebenfalls einige *Pseudomonas*-Arten, die nicht dem nachzuweisenden Zielorganismus entsprachen, sowie *Aeromonas hydrophila* auf ihre Fähigkeit zum Wachstum auf RAPID'*P.aeruginosa*-Agar überprüft. Die detaillierten Ergebnisse und getesteten Stämme sind in Tabelle 49 im Anhang aufgelistet. Von den getesteten *Pseudomonas* Referenzstämmen (*P. alcaligenes*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. putida* und *P. stutzeri*) war lediglich *P. putida* in der Lage, bei einer erniedrigten Inkubationstemperatur von 30 °C zu wachsen, allerdings ohne das chromogene Substrat umzusetzen. Im Falle von *A. hydrophila* war, obwohl zuvor bei der Untersuchung von Oberflächenwasserproben bereits nachgewiesen, ebenfalls kein Wachstum zu verzeichnen.

Zur Bestimmung der Spezifitätsrate wurde eine größere Stichprobe von 91 als positiv sowie 50 als negativ hinsichtlich *P. aeruginosa* gewerteter Kolonien drei verschiedener Oberflächenwasserproben subkultiviert und identifiziert. Dabei wurde, basierend auf den zuvor gewonnenen Erkenntnissen, nur eine kräftigere blaue oder grüne Färbung als verdächtig auf *P. aeruginosa* gewertet, wobei zwischen blauen (0,6 % der gesamten Kolonien) und dunkleren blau-grünen Kolonien (1,0 % der gesamten Kolonien) unterschieden werden konnte (Abbildung 61 im Anhang). Der Anteil an untypischen Kolonien ohne charakteristische Färbung war somit mit 98,4 % äußerst hoch. Eine Überprüfung der Subkulturen erfolgte mit den in DIN EN ISO 16266:2008 vorgeschriebenen Bestätigungsreaktionen. Insgesamt ließen sich 41 der 91 als positiv für *P. aeruginosa* gewerteten Kolonien bestätigen. Aufgeteilt auf die verschiedenen Kategorien entsprechen die Bestätigungsraten 19 % (10 von 54) im Falle der blauen Kolonien und 86 % (31 von 36) der dunkler blau-grünen Kolonien. Gewichtet mit den jeweiligen Häufigkeiten ergibt sich damit eine Gesamtbestätigungsrate von etwa 44 %. Bei allen Subkulturen der als negativ gewerteten Kolonien konnte ein Vorliegen von *P. aeruginosa* ausgeschlossen werden.

4.1.3. Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Oberflächengewässern

Zum quantitativen Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. im Oberflächenwasser ist im Gegensatz zu den zuvor genannten Zielorganismen ein mehrstufiges Verfahren nötig. In einem ersten Schritt erfolgt dabei eine Voranreicherung in einer selektiven Nährbouillon. Die momentan gültige

Norm ISO 17995:2005 sieht dazu den parallelen Einsatz zweier unterschiedlicher Anreicherungsbouillons vor, der Preston-Bouillon und der weniger selektiven Bolton-Bouillon. Die Norm beschreibt allerdings nur einen qualitativen Nachweis in 100 mL Probe. Um den Konzentrationsbereich weiter eingrenzen zu können und eine geringere Nachweisgrenze zu erreichen, wurde die Voranreicherung im MPN-Format mit einem Probevolumen von einem Liter umgesetzt. Dazu wurde die Probe auf verschiedene parallele Ansätze aufgeteilt und membranfiltriert. Der Filter wurde in die entsprechende Bouillon zur Anreicherung gegeben. Nach mikroaerophiler Inkubation erfolgte ein Ausstrich der Bouillon auf dem Selektivmedium mCCDA.

Die Menge der Ansätze im MPN-Format war dabei sehr umfangreich. Zusätzlich war der Nachweis durch eine starke Begleitflora erschwert. Daher wurde überprüft, ob die routinemäßige Anreicherung in Preston-Bouillon ausreichend ist oder die zusätzliche Verwendung der Bolton-Bouillon die Wiederfindung des Zielorganismus verbessert. Weil äußerst geringe Konzentrationen des Zielorganismus in den Umweltproben zu erwarten waren, wurden die Proben aus dem Oberflächengewässer dazu auf eine Zellzahl an *Campylobacter* von etwa 10^4 /L aufgestockt.

Bei der Auswertung der Proben zeigte sich, dass bei einem Ausstrich der Voranreicherung auf mCCDA bei Verwendung der Bolton-Bouillon durchschnittlich aus einer größeren Menge von Ansätzen Kulturen isoliert werden konnten (Tabelle 26). Es konnte jedoch keines der Isolate als *Campylobacter* spp. bestätigt werden. Dabei war es unerheblich, ob diese aus der Voranreicherung mittels Preston- oder Bolton-Bouillon stammten bzw. ob die Probe zuvor mit einem Referenzstamm aufgestockt worden war.

Tabelle 26: Detaillierte Auflistung der Auswertung beim quantitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. in Oberflächenwasser bei paralleler Voranreicherung in Bolton- und Preston-Bouillon. Das Probevolumen von 1 L pro Anreicherung wurde in unterschiedliche Ansätze aufgeteilt. Zusätzlich wurde die Probe auf eine theoretische Konzentration an *Campylobacter* von 10^4 Zellen/L aufgestockt. Angegeben sind die Ansätze, die nach Dreiösenausstrich der Voranreicherung auf dem Selektivmedium mCCDA und Inkubation ein sichtbares Wachstum aufwiesen.

Ansätze mit nachgewiesenem Bewuchs nach Voranreicherung									
Dreifach- ansatz	Oberflächen- wasser #1		Oberflächen- wasser #1 Aufgestockt mit <i>C. jejuni</i> (Umweltisolat)		Oberflächen- wasser #2		Oberflächen- wasser #2 Aufgestockt mit <i>C. coli</i> DSM 4689		
	Volumen Probe	Preston- Bouillon	Bolton- Bouillon	Preston- Bouillon	Bolton- Bouillon	Preston- Bouillon	Bolton- Bouillon	Preston- Bouillon	Bolton- Bouillon
300 mL	3	3	3	3	2	3	3	3	
30 mL	2	3	1	3	0	2	0	1	
3 mL	0	1	0	0	0	0	0	1	
0,3 mL	n. b.	n. b.	0	1	n. b.	n. b.	0	1	
Anteil FISH positiver Zellen der Probe									
Catherm	0 %		n. b.		0 %		95 %		
Cajej	0 %		n. b.		0 %		0 %		
Bei allen Negativkontrollen:					Kein Bewuchs nach Voranreicherung				
Bei allen Positivkontrollen:					Metallisch glänzender Bewuchs auf Selektivmedium mCCDA nach Voranreicherung				
Die Subkulturen aller Ansätze zeigten ein starkes aerobes Wachstum, was ein Vorliegen von <i>Campylobacter</i> spp. ausschließt.									

Trotz des vorherigen Nachweises des Zielorganismus *Campylobacter* spp. mittels FISH in der aufgestockten Wasserprobe konnte dieser mit der kulturabhängigen Nachweismethode nicht gefunden werden. Bei einer direkten Suspension unterschiedlicher Referenzstämmen in Preston-Bouillon war ein kultureller Nachweis hingegen in allen Fällen möglich. Dies legt nahe, dass die Probenmatrix eine Inhibition des Wachstums von *Campylobacter* spp. bewirkt.

Bei einem Großteil der Ansätze trat ein Bewuchs des mCCD-Agars mit untypischen weißen, matten Kolonien auf. Zur besseren Einschätzung, welche Organismen sich somit störend auf den Nachweis von *Campylobacter* spp. auswirken, wurden einige zufällig ausgewählte Subkulturen mittels API® 20 E identifiziert (Tabelle 27). Es zeigte sich ein Vorliegen von coliformen Bakterien, wobei drei Subkulturen der Art *Escherichia coli* und eine der Art *Klebsiella pneumoniae* zugeordnet werden konnten. Bestätigt wurde das Ergebnis ebenfalls durch eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der entsprechenden Isolate.

Tabelle 27: Repräsentative Identifizierung von Subkulturen der Begleitflora, die häufig beim quantitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. in Oberflächenwasser nachgewiesen wurden. Die für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendeten Sonden waren spezifisch für *Klebsiella pneumoniae* (KPN) oder *Escherichia coli* (Colinsitu).

Probe Oberflächenwasser	Identifizierung der Subkultur mittels API® 20 E	FISH bei Verwendung der Sonde (Anteil positiver Zellen)	
		KPN	Colinsitu
Anreicherung in Bolton- Bouillon, nicht aufgestockt	<i>Escherichia coli</i>	0 %	88 %
Anreicherung in Bolton- Bouillon, aufgestockt mit <i>C. jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i>	1 %	81 %
Anreicherung in Preston- Bouillon, nicht aufgestockt	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	72 %	0 %
Anreicherung in Preston- Bouillon, aufgestockt mit <i>C. jejuni</i>	<i>Escherichia coli</i>	7 %	89 %

Neben Proben aus Oberflächenwasser wurden in weiteren Experimenten auch Proben aus Kläranlagenabläufen sowie künstlichem Regenwasser untersucht (Daten hier nicht weiter aufgeführt). Da auch hier - trotz der höheren zu erwartenden Konzentrationen - der Nachweis wiederholt negativ ausfiel, wurde eine Probe aus künstlichem Regenwasser mittels der FISH untersucht. Dazu wurde die Probe fixiert und mit dem DNA-Farbstoff DAPI eingefärbt und mit der fluoreszenzmarkierten Sonde Catherm hybridisiert. Diese bindet spezifisch an die 16S rRNA thermotoleranter *Campylobacter* spp.. Bei einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Probe zeigte sich eine Vielzahl verschiedener, mit DAPI angefarbter Zellen. Einige wenige dieser Zellen konnten ebenfalls mit der spezifischen, Cy3 markierten Sonde Catherm angefarbt werden (Abbildung 21). Zusätzlich spricht die leicht gekrümmte Zellform für ein mögliches Vorliegen von *Campylobacter* spp..

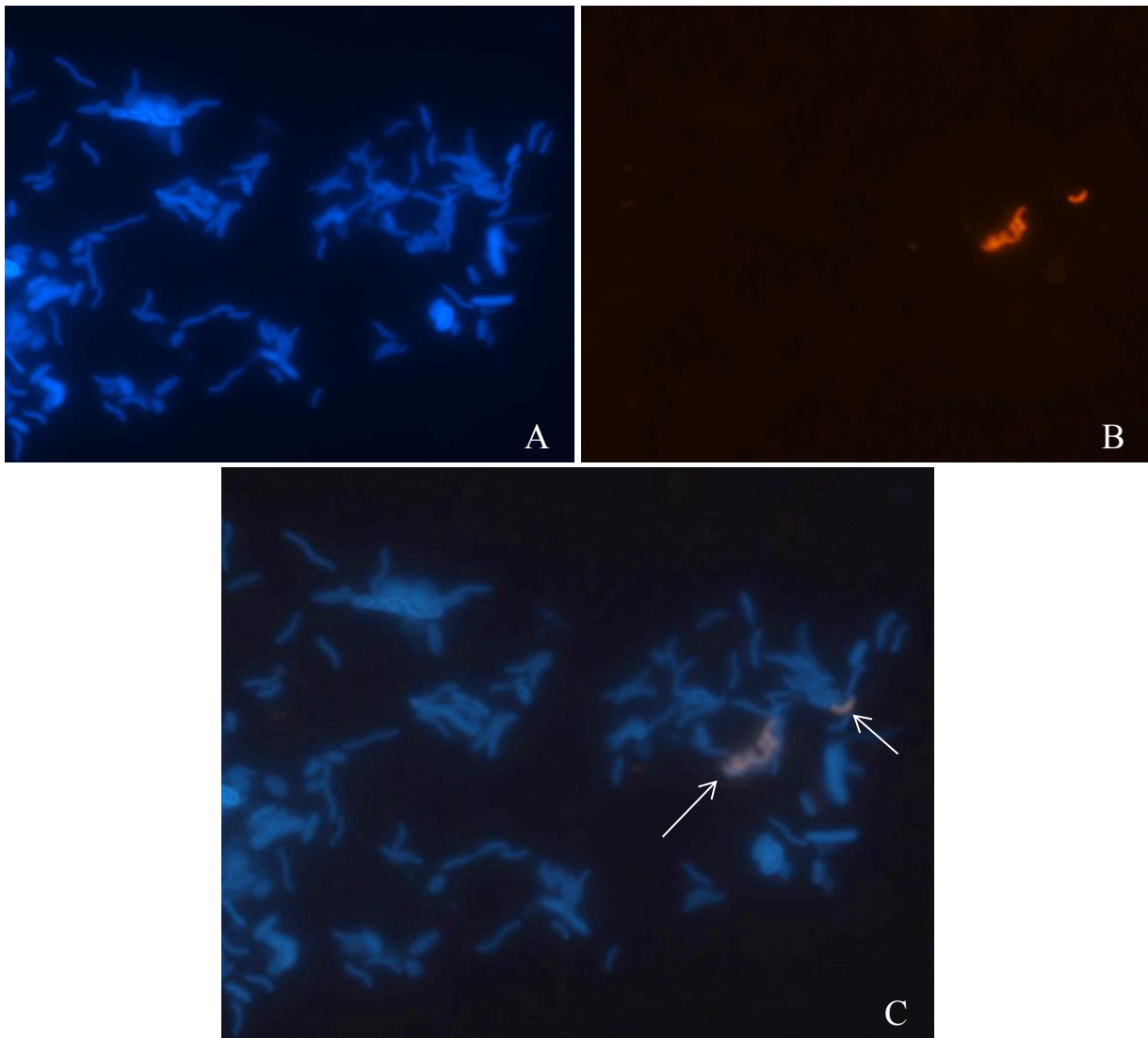


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mittels DAPI und FISH angefärbten Probe aus künstlichem Regenwasser. Als Sonde wurde Catherm verwendet, die spezifisch für thermotolerante *Campylobacter* spp. ist. A zeigt die Fluoreszenz des Farbstoffs DAPI (alle Zellen); B zeigt die Fluoreszenz der -mit der Cy3 markierten Sonde- spezifisch angefärbten Zellen (potenziell *Campylobacter* spp.); C stellt die Fluoreszenz beider Farbstoffe gemeinsam dar. Die Pfeile markieren die Lage der spezifisch angefärbten Zellen

4.1.4. Nachweis von *Salmonella enterica* in Oberflächengewässern

Ähnlich wie beim Nachweis von *Campylobacter* spp. wurde ein MPN-basiertes Verfahren eingesetzt. Die Probe musste dazu ebenfalls zuerst, aufgeteilt in unterschiedliche Ansätze, per Membranfiltration angereichert werden, bevor der Filter in eine Anreicherungsbouillon gegeben wurde. Zur Voranreicherung wurde hierbei eine Rappaport-Vassiliadis-Soja-Pepton-Bouillon verwendet, die durch ihren hohen Gehalt an Salzen das Wachstum der Begleitflora unterdrücken soll. Dennoch zeigte sich bei den Ausstrichen der Ansätze aus Oberflächenwasser ein starker Bewuchs der Selektivmedien XLD-Agar und BPLS-Agar mit Kolonien unterschiedlicher Morphologie. Dies machte oft eine Vereinzelung von Kolonien vor der weiteren Untersuchung nötig. In der gültigen Norm DIN EN ISO 19250:2013 wird eine zusätzliche erste Voranreicherung angeraten, um eventuell nicht mehr kultivierbare Zellen wieder zurück in den kultivierbaren Zustand zu überführen. Da dies jedoch zu einer noch stärker ausgeprägten Beeinflussung der Analyse durch die Begleitflora führte, wurde diese initiale Voranreicherung nur bei der Untersuchung von Proben aus dem Prozess der Trinkwasseraufbereitung genutzt.

Neben den in der Norm angegebenen Reaktionen zur biochemischen Identifizierung (Oxidase-, Urease- und Lysin-Decarboxylaseaktivität) wurde parallel eine Identifizierung mittels API® 20 E-Testsystem durchgeführt. Hierbei konnten bis auf eine Probe alle normgerechten Identifizierungen bestätigt werden. Verschiedene Subkulturen der einzigen abweichenden Probe wurden hingegen als *Edwardsiella tarda* identifiziert. Auffällig war bei dieser Probe zusätzlich, dass nur mittels Ausstrich auf XLD-Agar, nicht aber BPLS-Agar Kolonien mit einer *Salmonella*-typischen Morphologie erhalten wurden.

4.1.5. Nachweis von *Legionella* spp. in Oberflächengewässern

4.1.5.1. Kulturabhängiger Nachweis von *Legionella* spp.

Der kulturelle Nachweis von *Legionella* spp. wurde hauptsächlich am IWW Zentrum Wasser durchgeführt. Das Prinzip der Methode hierzu ist im Grundsatz in den Normen ISO 11731:1998 und DIN EN ISO 11731-2:2008 festgelegt, es können jedoch für die Probenart passende Modifikationen vorgenommen werden. Da hauptsächlich Proben aus Oberflächenwasser mit einer starken Begleitflora untersucht wurden, wurde der etwas stärker selektiv wirkende GVPC-Agar verwendet. Zusätzlich wurde eine Säurebehandlung der Probe eingesetzt, um eine noch bessere Selektivität zu erreichen. Hingegen wurde zur Untersuchung von Proben aus dem Prozess der Wasseraufbereitung das weniger selektive Medium BCYE α verwendet.

Im Untersuchungszeitraum gelang es nur sporadisch, *Legionella* spp. aus Oberflächenwasser isolieren. Dabei war es bei Proben aus Oberflächenwasser nicht möglich, den Nachweis durch eine Erhöhung des Probevolumens zu verbessern oder ein weniger selektives Medium zu verwenden. Hier war bereits ein starker Bewuchs des Mediums mit untypischen Kolonien zu erkennen, der anderenfalls das Medium komplett überwachsen hätte.

4.1.5.2. Kulturunabhängiger Nachweis von *Legionella* spp.

Parallel zum kulturabhängigen Verfahren zur Quantifizierung von *Legionella* spp. wurde ebenfalls ein Nachweis erprobt, der auf der quantitativen PCR (qPCR) beruht. Hierbei werden jedoch nicht nur intakte Zellen, sondern unter Umständen auch freie DNA-Fragmente nachgewiesen. Um zu unterscheiden, welcher Anteil der Zellen über eine intakte Zellmembran verfügt, wurde der Probe der Farbstoff Propidium Monoazid (PMA) zugesetzt. Dieser soll unter Lichteinfluss an freie DNA binden und so eine Replikation während der PCR verhindern. Intakte Zellmembranen sind für PMA so gut wie undurchlässig. Damit dieses Prinzip störungsfrei ablaufen kann, ist aber eine Optimierung der Reaktionsbedingungen nötig.

In der Literatur wird ein Konzentrationsbereich von 6,25 μ M bis 50 μ M als geeignet für die Reaktion von PMA mit freier oder in geschädigten Zellen vorliegender DNA angesehen. Zusätzlich wird im Falle von anzureichernden Wasserproben eine PMA-Behandlung direkt auf dem Filter vorgeschlagen (Slimani *et al.* 2012). Bei der Anpassung der PMA-Konzentration zeigte sich, dass eine hohe Konzentration von 50 μ M eingesetzt werden muss, um einen gewünschten Abnahmeeffekt bei der hitzegeschädigten Kontrolle (20 min bei 95 °C) zu erreichen. Diese betrug etwa 3 log-Stufen für *Legionella pneumophila* und 1 log-Stufe für *Legionella bozmannii* (Abbildung 22). Eine PMA-Behandlung direkt auf dem zur Anreicherung-verwendeten Filter durchzuführen, erwies sich zudem als ungeeignet, da hier kaum eine Reduktion der nachgewiesenen Zellen bei der hitzebehandelten Kontrolle zu beobachten war (Abbildung 23 A). Eine Variation der Bestrahlungsdauer führte dabei zu keiner Verbesserung der Reaktion (Abbildung 23 B).

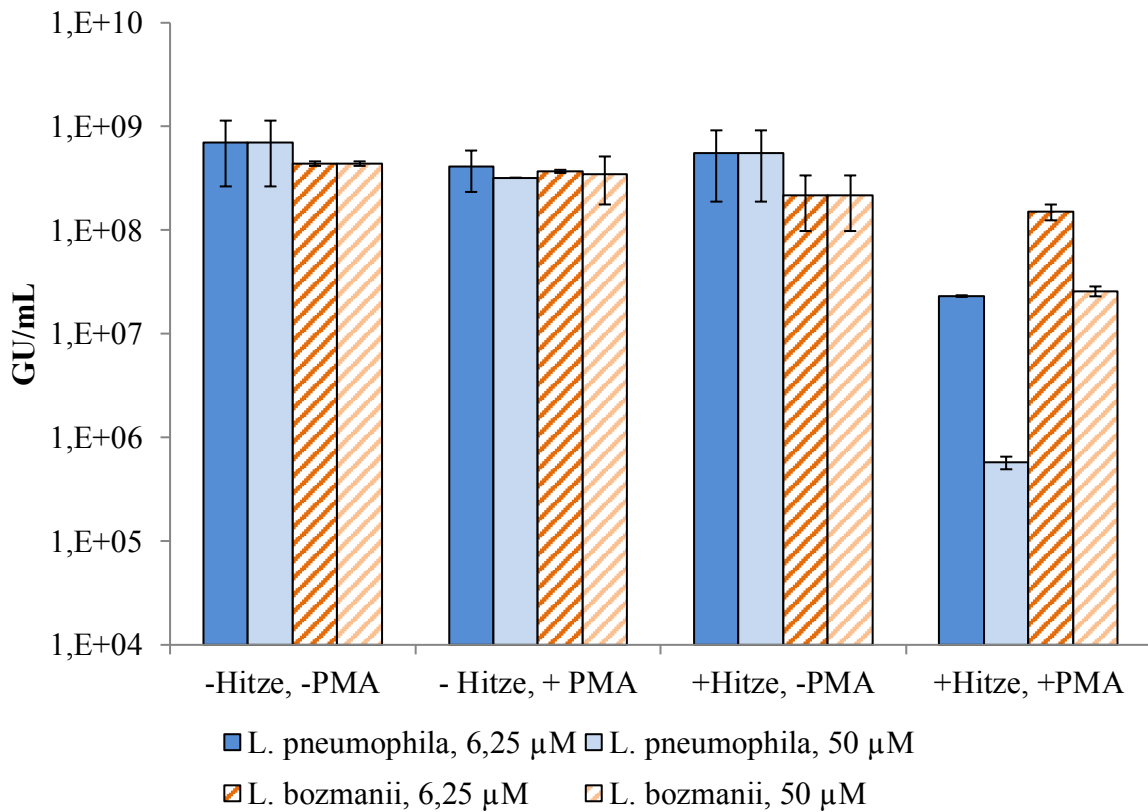


Abbildung 22: Optimierung der PMA-qPCR von *Legionella* spp. mit Variationen der Zugabe von PMA in dem von Slimani *et al.* (2012) angegebenen Konzentrationsbereich von 6,25 µM bis 50 µM. Die Optimierungen wurden mit *Legionella pneumophila* und *Legionella bozmannii* d. Als Kontrolle wurden die Suspensionen für 20 min auf 95 °C erhitzt.

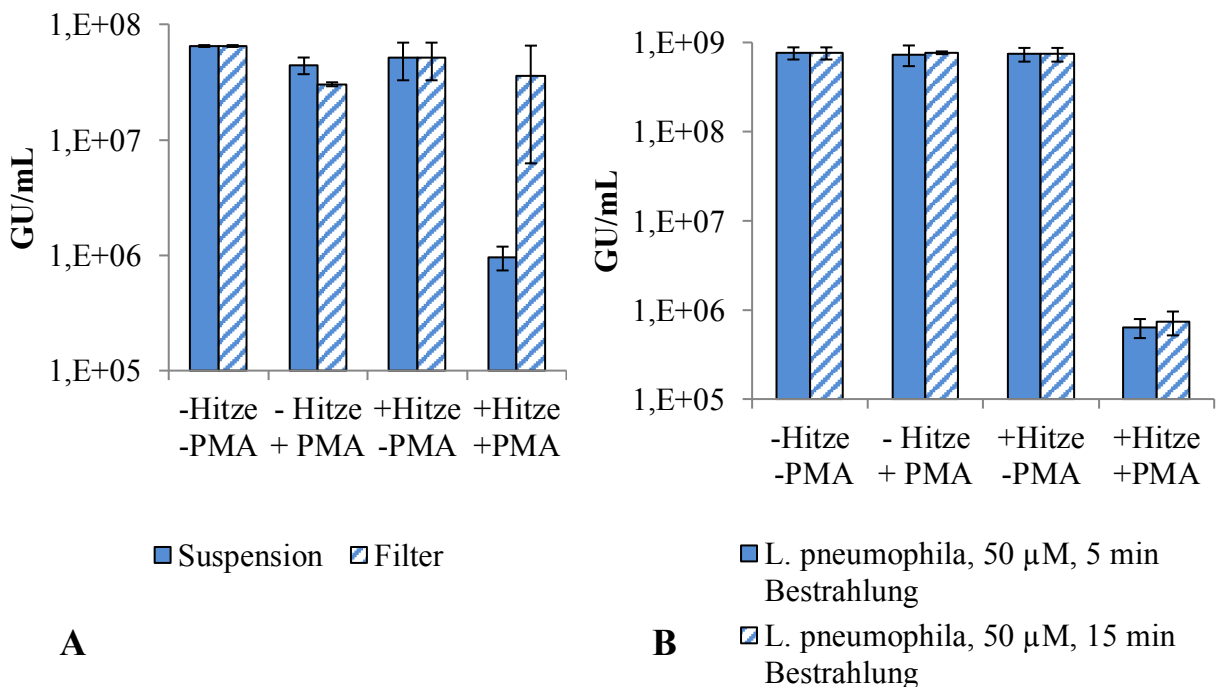


Abbildung 23: A Optimierung der PMA-qPCR von *Legionella* spp. mit Untersuchung der PMA-Behandlung direkt auf dem zur Anreicherung verwendeten Membranfilter nach Slimani *et al.* (2012). Die Dunkel- und Lichtreaktion mit PMA (50 µM) betrug dabei 5 min. B Untersuchung des Einflusses einer Verlängerung der Lichtreaktion von 5 min auf 15 min. Standardmäßig wurden dazu 50 µM PMA eingesetzt mit einer vorherigen Inkubation in Dunkelheit von 5 min.

Neben einer möglichen Differenzierung von intakten und geschädigten Zellen war aber auch ein direkter Einfluss von PMA auf die Kultivierbarkeit zu beachten. So zeigte sich bei Kontrollen häufig, dass eine Abnahme von ca. einer log-Stufe ebenfalls bei einem kulturabhängigen Nachweis zu verzeichnen war, wenn PMA zugegeben wurde. Durch eine Bestrahlung allein zeigte sich dieser Effekt jedoch nicht (Abbildung 24).

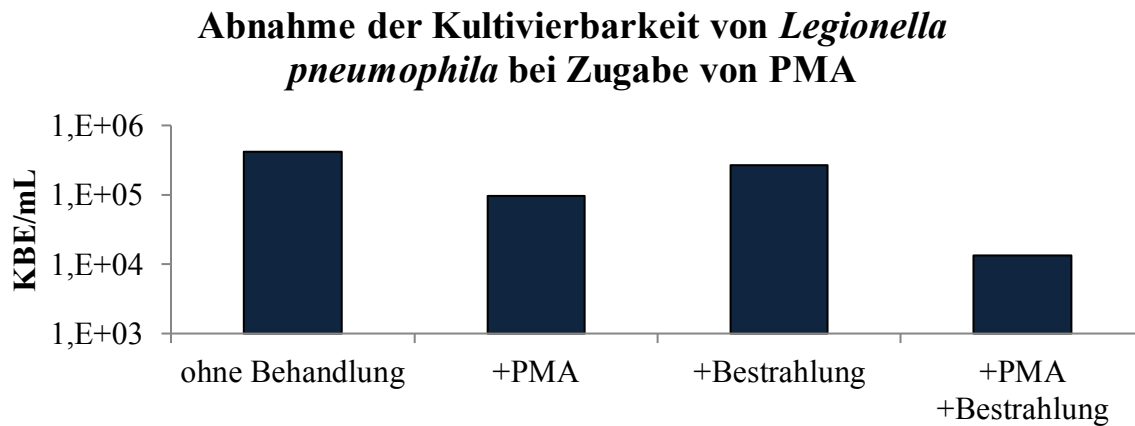


Abbildung 24: Bestimmung der Kultivierbarkeit bei Zugabe von PMA (50 μM) zu einer Suspension von 10^6 Zellen/mL von *Legionella pneumophila* oder einer Bestrahlung (PhastBlue-Belichtungssystem) von 5 min sowie einer Kombination der beiden Faktoren. Es sind die kulturell ermittelten Konzentrationen unter Verwendung von BCYE α -Nährmedium und einer Inkubationszeit von 5 d aufgetragen.

4.2. Bestandsaufnahme der hygienisch relevanten Zielorganismen im Fließgewässer Ruhr

Um ein Gewässer hygienisch zu bewerten, werden meist Indikatorbakterien verwendet. Diese sollen eine Belastung mit pathogenen Bakterien oder anderen pathogenen Mikroorganismen repräsentieren. Für diese Arbeit wurden jedoch ausgewählte Pathogene direkt in der entsprechenden Wasserprobe nachgewiesen und neue Verfahren zum schnelleren Nachweis von Indikatorbakterien erprobt. Dadurch kann überprüft werden, ob die Ergebnisse ausreichend gut auf die ausgewählten fakultativ pathogenen Organismen (*Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* spp.) und obligat pathogenen Organismen (*Campylobacter* spp. und *Salmonella enterica*) übertragbar sind. Die neuen Ansätze zum Nachweis von Indikatorbakterien werden zudem auf ihre Eignung als Parameter für ein mögliches Frühwarnsystem getestet, das zeitnah vor einem Gesundheitsrisiko durch eine Verschlechterung der mikrobiologischen Qualität warnen soll.

Für die Untersuchungen wurden über einen Zeitraum von 26 Monaten Proben an für die Freizeitnutzung charakteristischen Stellen der Ruhr entnommen (Abbildung 5). Die Beprobung wurde zunächst an allen Stellen durchgeführt und anschließend auf zwei Stellen (Fischereiverein und Seaside Beach) begrenzt, an denen Schnelldiagnostik der Indikatorbakterien erprobt wurden.

4.2.1. Physikalisch-chemische Begleitparameter

Da diese Arbeit im Rahmen eines Verbundprojektes durchgeführt wurde, kann zusätzlich auf weitere physikalisch-chemische Parameter zurückgegriffen werden. Diese wurden entweder direkt vor Ort bestimmt (Trübung, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt, elektrische Leitfähigkeit) oder durch die Abteilung für Instrumentelle Analytik des IWW Zentrum Wasser gemessen (SAK 254 nm, 436 nm, SSK 254 nm, Ammonium, Nitrat, Nitrit, Gesamtphosphor, Orthophosphat, gesamter organischer Kohlenstoff TOC, gelöster organischer Kohlenstoff DOC). Zusätzlich konnten allgemeine Wetterdaten über die Datenbank WESTE XL des Deutschen Wetterdienstes bezogen werden. Die Abflussraten konnten den Ruhrgüteberichten 2012 bis 2014 entnommen werden.

Allgemein waren bei den untersuchten Parametern keine Auffälligkeiten hinsichtlich der Lage der Probenahmestellen zu erkennen. Die jahreszeitlichen Schwankungen entsprachen den für Fließgewässer bekannten und typischen Verläufen.

Bei den vor-Ort-Parametern zeigte sich eine erhöhte Trübung sowie ein Maximum des Gehaltes an gelöstem Sauerstoff im Frühjahr. Der Sauerstoffgehalt sank anschließend zum Sommer hin auf ein Minimum und stieg bis zum Winter wieder an. Beim pH-Wert war ebenfalls ein Peak im Frühjahr zu beobachten. Bei der Betrachtung der elektrischen Leitfähigkeit hingegen zeigten sich zwar leichte Schwankungen zwischen den einzelnen Terminen, die jedoch keinem jahreszeitlichen Trend unterlagen.

Auch die spektralen Absorptions- (SAK 254 nm, SAK 436 nm) und Schwächungs-Koeffizienten wiesen in den Wintermonaten niedrigere und weniger breit gestreute Werte auf. Ebenso wurden im Winter niedrigere Werte des gesamten Phosphors sowie im Speziellen von Orthophosphat im Frühjahr und Winter gemessen. Die Mediane über den Untersuchungszeitraum von 18 Monaten lagen dabei für den gesamten Phosphorgehalt bei 0,1 mg/L und für den Anteil von Orthophosphat bei 0,2 mg/L. Die Bestimmung von Nitrat mit einem Median von 10,4 mg/L und Nitrit, Median 0,06 mg/L, hingegen lieferte im Winter leicht höhere Werte. Die Konzentration von Ammonium war durchgängig mit Werten um 0,06 mg/L sehr niedrig. Wie allgemein bei Fließgewässern zu erwarten, stieg der Gehalt an gesamten (TOC) und gelösten (DOC) organischen Kohlenstoffverbindungen im Frühjahr an und sank im Jahresverlauf wieder auf ein Minimum im Winter ab.

4.2.2. Mikrobiologische Begleitparameter

Neben gewonnenen Erkenntnissen über das Vorkommen potenziell pathogener Bakterien im Fließgewässer wurde in dieser Arbeit auch die Relation zu häufig routinemäßig untersuchten Bakterien überprüft. Diese werden stellvertretend betrachtet, da sie methodisch einfacher zu quantifizieren sind und tendenziell in höheren Konzentrationen vorkommen als die eigentlichen Zielorganismen. Diesem Konzept liegt jedoch das Prinzip zu Grunde, dass sich die Indikator- und Zielorganismen in ihren Eintragswegen sowie Eigenschaften, z. B. den Eliminationsraten während der Desinfektion, möglichst ähnlich sind. Die Daten zum Vorkommen von Indikatororganismen wurden durch das IWW Zentrum Wasser zur Verfügung gestellt. Als Indikatorparameter für bakterielle Pathogene wurden coliforme Bakterien mit *Escherichia coli* im Speziellen, intestinale Enterokokken und *Clostridium perfringens* gewählt. Zudem wurden allgemeinere Indikatoren wie die Gesamtzellzahl und die Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C ermittelt.

Bei einer Auswertung der Gesamtzellzahl und der Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C war in dieser Studie kein Einfluss auf die Konzentration durch die Lage der Probenahmestellen und somit mögliche Punktquellen zu erkennen. Im Verlauf des Untersuchungszeitraums von 13 Monaten blieb das Grundniveau der Konzentrationen relativ konstant mit einer leichten Abnahme im Winter. Unterbrochen war dies durch einige höhere Ausreißer (Abbildung 25).

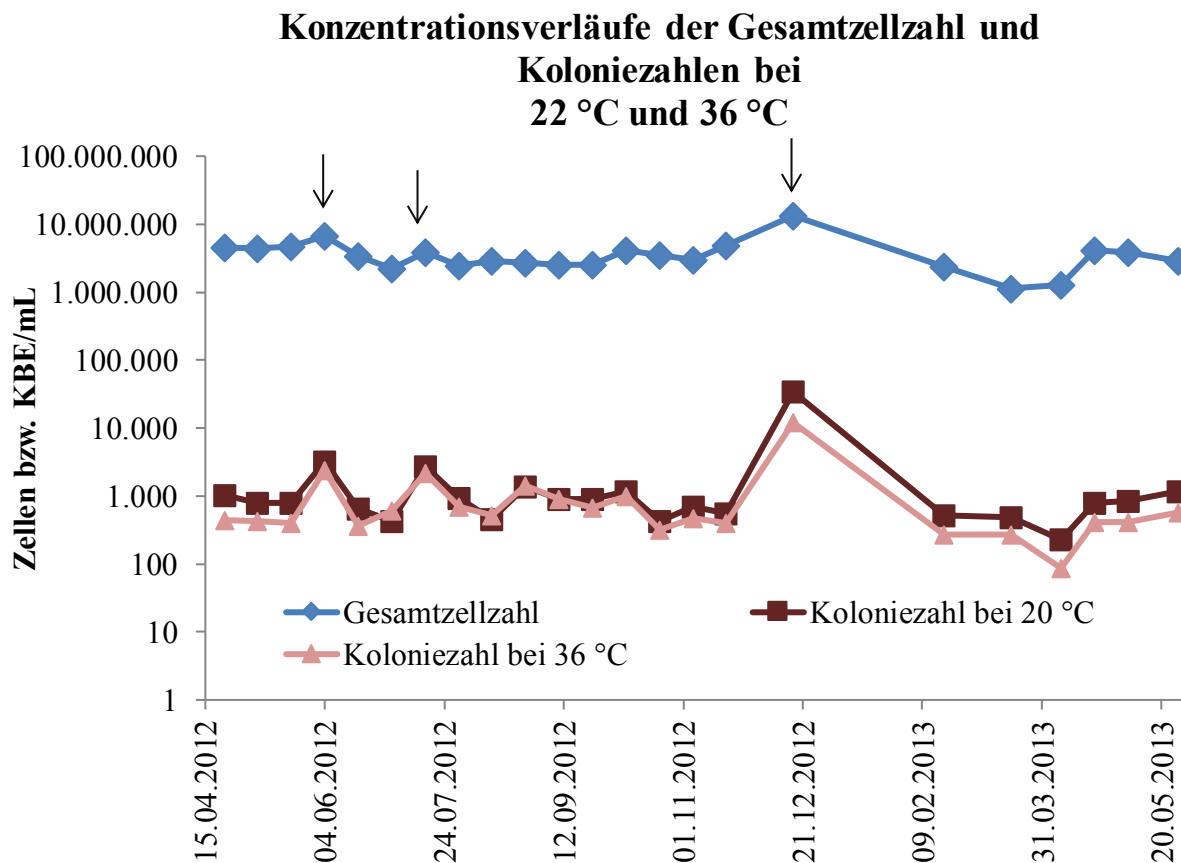


Abbildung 25: Auftragung der Mediankonzentrationen (8 Probenahmestellen) der Gesamtzellzahl sowie der Koloniezahlen bei 22 °C und 36 °C über einen Untersuchungszeitraum der Ruhr von 13 Monaten. Ausreißer der Konzentrationen sind durch Pfeile markiert.

Zusammengefasst deckten die gemessenen Konzentrationen der Gesamtzellzahl im Untersuchungszeitraum einen Bereich von 4×10^5 Zellen/mL bis 2×10^7 Zellen/mL ab, mit einem Median von 3×10^6 Zellen/mL. Im Falle der Koloniezahlen bei 22 °C bzw. 36 °C entsprachen diese Spannen 119 KBE/mL bis $4,5 \times 10^4$ KBE/mL (Median: 785 KBE/mL) bzw. 41 KBE/mL bis $3,9 \times 10^4$ KBE/mL (Median: 495 KBE/mL).

Im Gegensatz zu diesen allgemeinen mikrobiologischen Parametern deutet *E. coli* konkret auf einen kürzlich zurückliegenden Eintrag von fäkal belastetem Wasser hin. *E. coli* wurde im vorliegenden Gewässer insgesamt in 173 von 184 Proben in Konzentrationen von bis zu $3,5 \times 10^4$ MPN/100 mL nachgewiesen. Der Median lag bei 190 MPN/100 mL. Die Gruppe der coliformen Bakterien, von denen *E. coli* eine Teilmenge darstellt, können ebenfalls als Hinweis für Verunreinigungen genutzt werden. Da einige der inbegriffenen Spezies aber auch natürlicherweise in der Umwelt vorkommen können, kann dabei nicht ohne weiteres auf eine fäkale Belastung des Wassers rückgeschlossen werden. Der Konzentrationsbereich lag mit 20 MPN/100 mL bis $6,5 \times 10^4$ MPN/100 mL daher etwas höher als bei *E. coli*. Coliforme Bakterien waren dabei in allen 184 untersuchten Proben nachweisbar. Die Präsenz von intestinalen Enterokokken in einer Wasserprobe weist ebenso wie *E. coli* auf einen Eintrag von fäkal belastetem Wasser hin. Jedoch sind intestinale Enterokokken im Allgemeinen widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einflüssen und können daher auch längere Zeit nach der Verschmutzung nachgewiesen werden. Auch diese Gruppe von Bakterien konnte in der überwiegenden Mehrheit von 180 der 183 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Mit einem Maximum von 1600 KBE/100 mL und einem Median von 23 KBE/100 mL lag das Konzentrationsniveau dabei unterhalb von *E. coli*.

C. perfringens wird ebenfalls ein Status als Indikatororganismus zugeschrieben. Ein Nachweis war mit 11 KBE/100 mL bis zu 810 KBE/100 mL und einem Median von 74 KBE/100 mL in jeder Probe möglich.

Abbildung 26 stellt das Vorkommen aller Indikatorbakterien zusammengefasst dar. Neben der Rolle als Stellvertreter für schwieriger nachweisbare Pathogene ist von einigen Spezies der zuvor genannten Bakteriengruppen bekannt, dass diese selbst Infektionen bei immungeschwächten Personen hervorrufen. Daher kann unter Umständen ein hoher Gehalt dieser Bakterien selbst auch ein gesundheitliches Risiko darstellen.

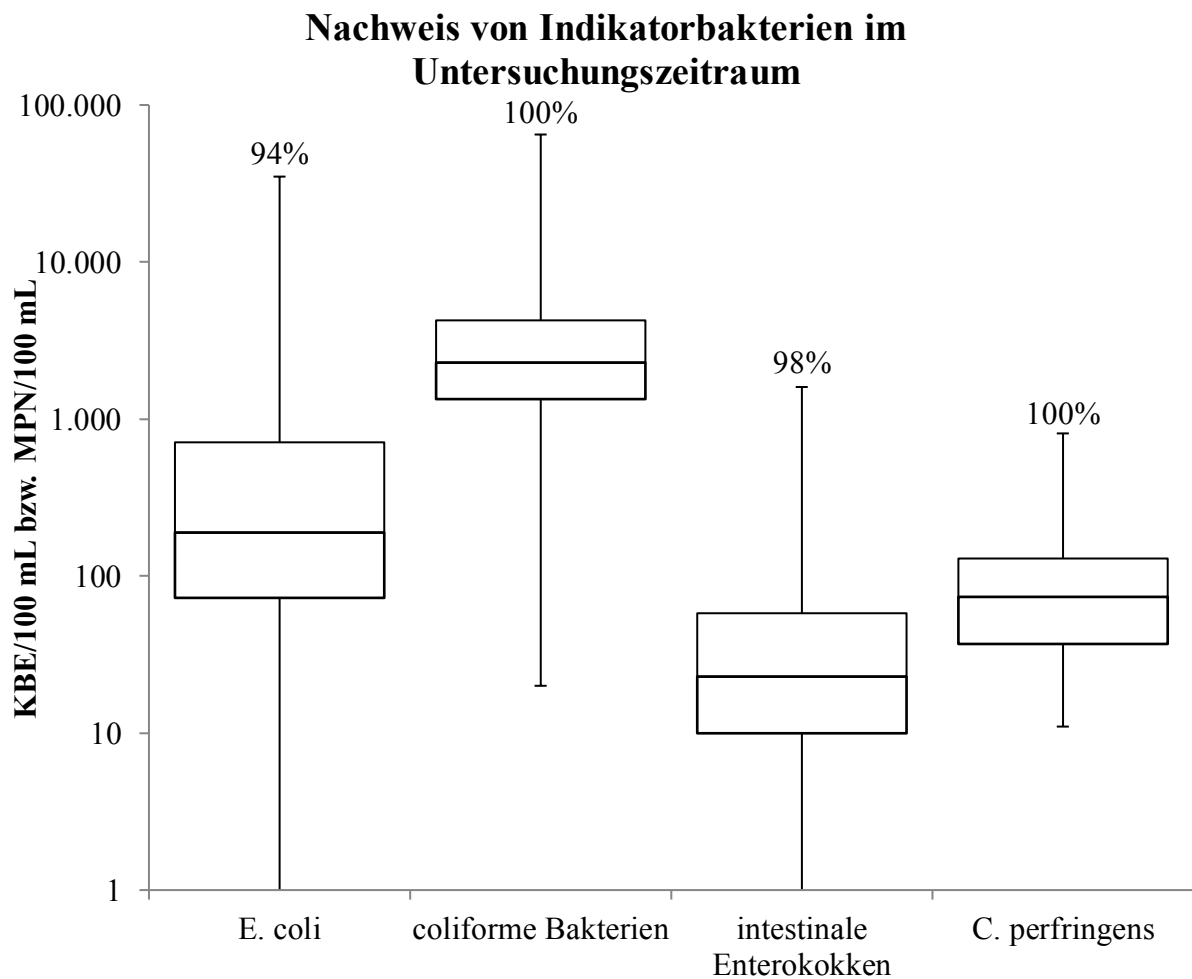


Abbildung 26: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von ausgewählten Indikatorbakterien (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 13 Monate untersucht. Zusätzlich ist die Häufigkeit des positiven Nachweises in Prozent angegeben.

Hinsichtlich der unterschiedlichen Eintragspfade, die durch die Lage der einzelnen Probenahmestellen abgebildet werden sollten, konnten keine Besonderheiten festgestellt werden. Auch nach Einleitung einer Kläranlage waren die Gehalte von *E. coli* und coliformen Bakterien im Allgemeinen nur minimal erhöht. Betrachtet man parallel die Konzentrationsverläufe einzelner bakterieller Indikatoren, so zeigt sich, dass Spitzenwerte gleichermaßen abgebildet werden konnten (Abbildung 27). Besonders ausgeprägt war dieser Zusammenhang bei *E. coli* und den intestinalen Enterokokken, wobei die Konzentration der intestinalen Enterokokken stets etwas geringer war. Vernachlässigt man den einzelnen Spitzenwert am 17. Dezember, bei dem eine Assoziation zu einem Hochwasserereignis vorlag, ließ sich ein leichter Rückgang der Werte zum Winter und Frühjahr beobachten.

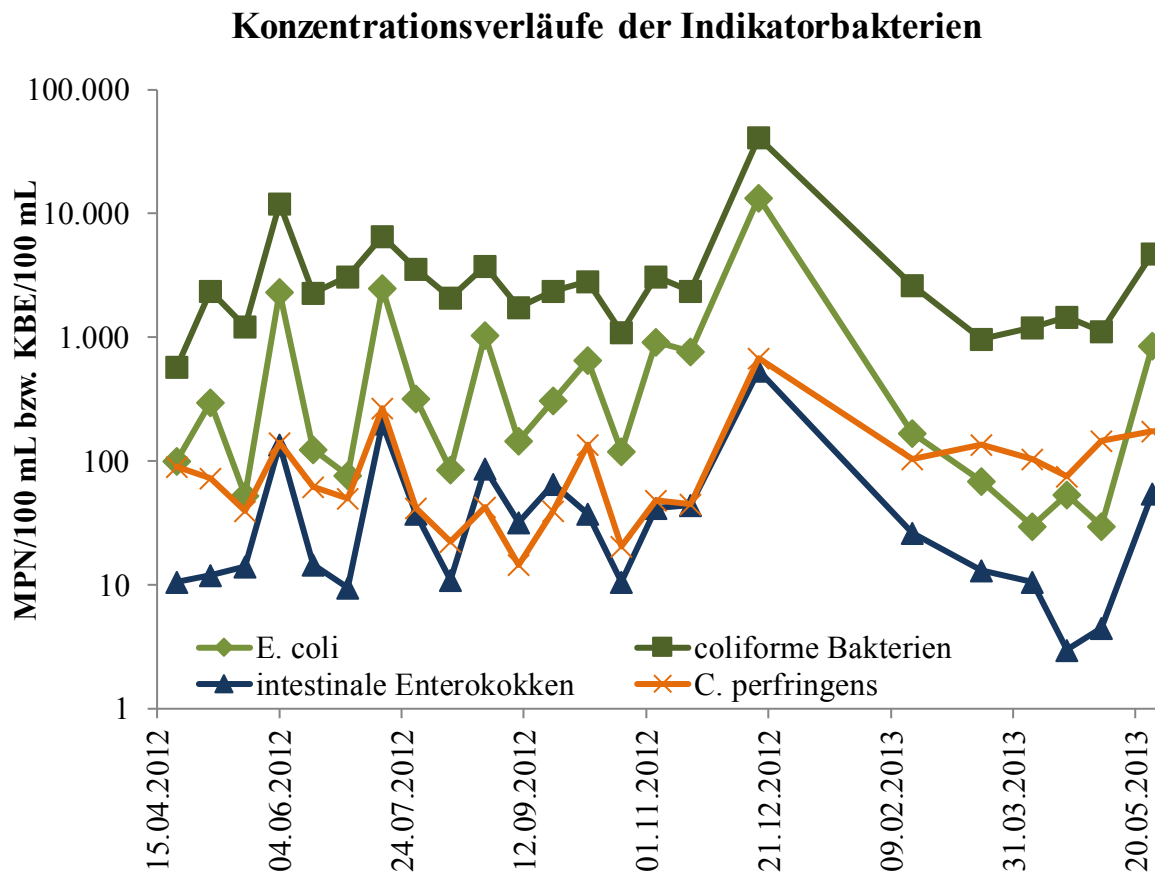


Abbildung 27: Auftragung der Mediankonzentrationen (8 Probenahmestellen) der Indikatorbakterien über einen Untersuchungszeitraum der Ruhr von 13 Monaten.

4.2.3. Vorkommen von *Aeromonas* spp. im Fließgewässer Ruhr

Unter den untersuchten bakteriellen Zielorganismen sind *Aeromonas* spp. in den höchsten Konzentrationen nachgewiesen worden. Die maximale Konzentration lag bei $7,7 \times 10^5$ KBE/100 mL und die geringste Konzentration bei $2,3 \times 10^3$ KBE/100 mL mit einem Median von $2,1 \times 10^4$ KBE/100 mL. Somit konnte in jeder der 218 untersuchten Wasserproben *Aeromonas* spp. in sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dabei hatten die äußeren Faktoren, die durch die Auswahl der Probenahmestellen abgebildet werden sollten (z.B. Kläranlagenablauf), keinen erkennbaren Einfluss auf den Gehalt an *Aeromonas* spp. (siehe Abbildung 28). Die Probenahmestellen Seaside Beach sowie Fischereiverein wurden über einen längeren Zeitraum von zwei Jahren, gegenüber einem Jahr an den restlichen Stellen, untersucht. Es zeigte sich, dass diese Erweiterung des Untersuchungszeitraums die Verteilung nur gering beeinflusste.

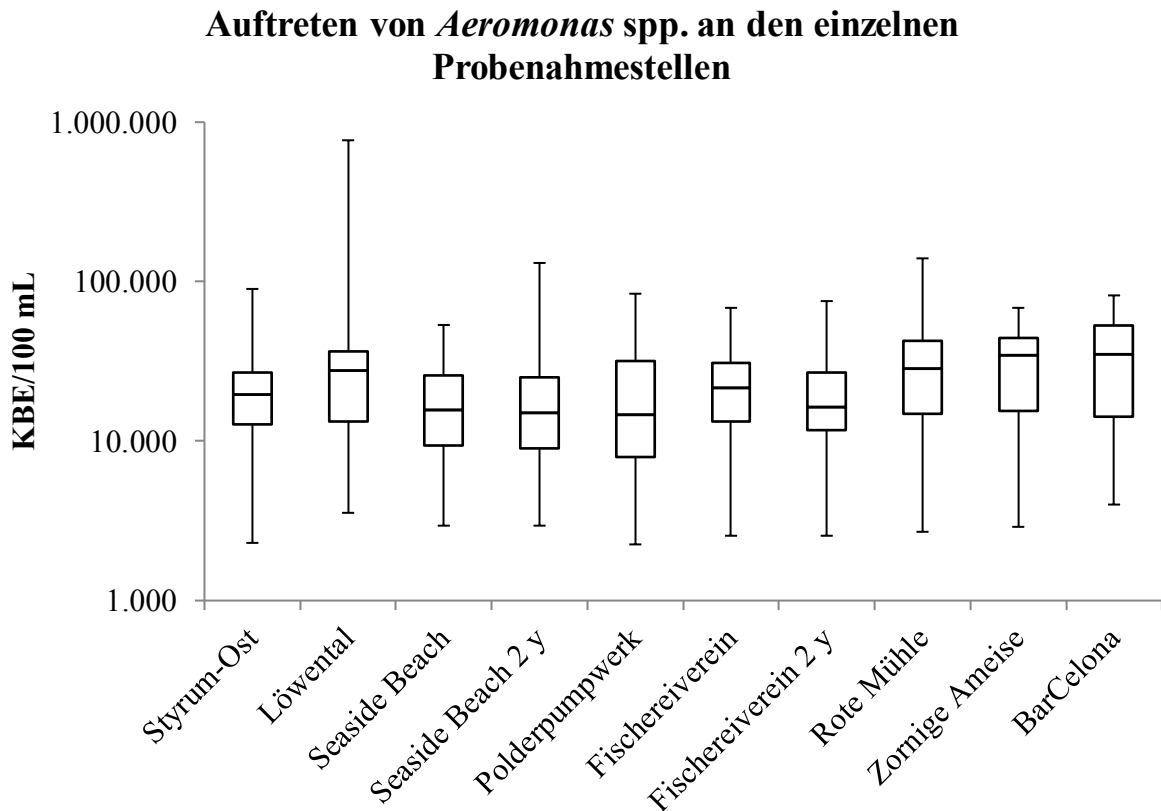


Abbildung 28: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Aeromonas* spp. an den einzelnen Probenahmestellen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden pro Probenahmestelle je 23 Wasserproben über einen Zeitraum von 13 Monaten ausgewertet, die Darstellungen Seaside Beach 2 y und Fischereiverein 2 y schließen 17 zusätzliche Probenahmen mit ein (Untersuchungszeitraum 26 Monate, insgesamt je 40 Proben).

Betrachtet man den Konzentrationsverlauf an den einzelnen Probenahmeterminen in Abbildung 29, so ergibt sich ein homogenes Bild mit etwas niedrigeren Werten in den Wintermonaten. Es ist ein Ausreißer mit um etwa eine log-Stufe erhöhten Werten vorhanden, der sich auch bei den anderen untersuchten bakteriellen Parametern wiederfindet und verbunden war mit einem Hochwasserereignis (Ruhrgütebericht 2013, S.20).

Konzentrationsverlauf von *Aeromonas* spp. über einen Beobachtungszeitraum von 18 Monaten

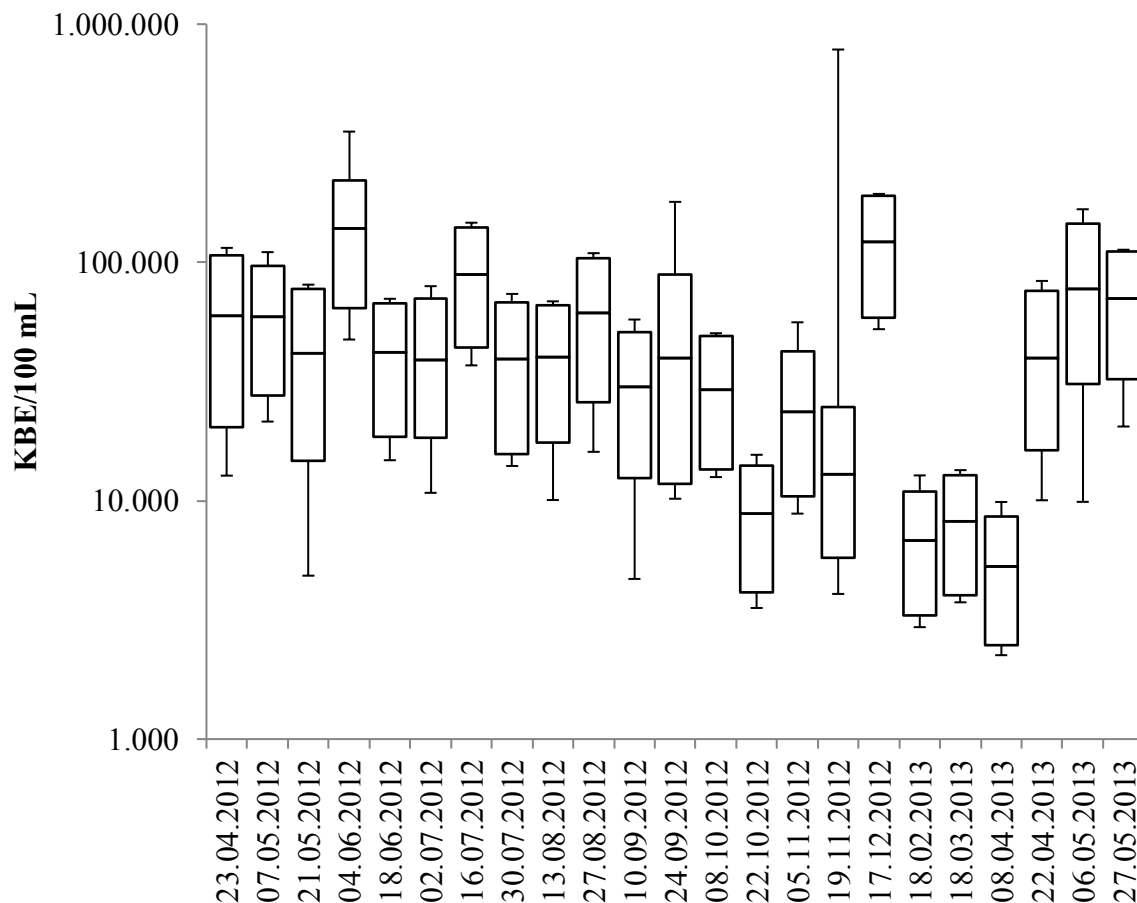


Abbildung 29: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Aeromonas* spp. an den einzelnen Probenahmeterminen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 13 Monate untersucht.

4.2.4. Anreicherung von *Aeromonas* spp. im Flusssediment

Da ein Infektionsrisiko nicht nur durch die Wasserphase, sondern auch durch Kontakt mit dem Sediment besteht, wurde untersucht, ob *Aeromonas* spp. dort unter Umständen sogar in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden können. Dies wurde bereits für Indikatorbakterien im Untersuchungsbereich gezeigt (Balzer *et al.*, 2006). Auch eine erhöhte Konzentration innerhalb der Uferzone war denkbar und ist in anderen Studien für Indikatorbakterien dokumentiert (ADAC Badegewässer-Test 2013). Dazu wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen eingesetzt. Zum einen wurde eine routinemäßige Beprobung des Gewässers nach DIN EN ISO 19458:2006 durchgeführt mit zusätzlicher Probenahme innerhalb des Uferbereichs (Wassertiefe ca. 30 cm) jeweils vor und nach dem Aufwirbeln des Sediments. Zum anderen wurden in weiteren Untersuchungen, die epilithischen Biofilme sowie das Flusssediment direkt beprobt und mit den Werten der jeweiligen Wasserphase verglichen.

Vergleicht man die Konzentrationen an *Aeromonas* spp. in der Wasserphase des Uferbereichs mit der einer Probe, die in weiterer Entfernung zum Ufer und bei größerer Wassertiefe entnommen wurde, zeigt sich in zwei von drei Fällen eine leichte Erhöhung der Werte (Tabelle 28). Eine Mobilisierung des Sediments an derselben Stelle führte in den Untersuchungen wiederum zu einem weiteren

Anstieg der Konzentrationen. Die Probenahmetermine wurden innerhalb der Badesaison gewählt, um ein möglichst realistisches Abbild eines Badebetriebes abzubilden.

Tabelle 28: Quantitativer Nachweis von *Aeromonas* spp. im Fließgewässer (Probenahme nach DIN EN ISO 19458:2006) und Uferbereich (Wassertiefe ca. 30 cm) der Probenahmestelle Löwental. Zusätzlich wurden im Uferbereich nach Aufwirbeln des Sediments Proben entnommen.

Konzentration der jeweiligen Probenart [KBE/100 mL]	09.09.2013	19.05.2014	14.07.2014
Wasserprobe nach DIN EN ISO 19458:2006	72.500	7.950	47.000
Wasserprobe Uferbereich	45.000	11.000	56.000
Wasserprobe Uferbereich nach Aufwirbeln von Sediment	162.250	62.000	68.500

Wesentlich deutlichere Unterschiede konnten bei der Auswertung der Proben festgestellt werden, die direkt aus dem epilithischen Biofilm und dem Sediment an der Probenahmestelle BarCelona gewonnen wurden (Tabelle 29). Die Biofilmp Proben hatten alle einen sehr hohen und vergleichbaren Wassergehalt von etwa 80 %. Es war durchgängig eine starke Anreicherung gegenüber der Wasserphase zu erkennen, mit durchschnittlich circa 6000-fach höheren Gehalten an *Aeromonas* spp.. Die Proben, die aus dem Sediment gewonnen wurden, zeigten sich inhomogener, was aus den stark schwankenden Wassergehalten abgeleitet werden kann. Eine Anreicherung kann aber auch hier beobachtet werden. Mit durchschnittlich etwa 200-fach höheren Werten fällt diese jedoch deutlich geringer aus.

Tabelle 29: Anreicherung von *Aeromonas* spp. im epilithischen Biofilm und Sediment der Probenahmestelle BarCelona.

Datum	Konzentrationen				
	Wasserprobe [KBE/100 mL]	Epilithischer Biofilm [KBE/100 g FG]	Wassergehalt Biofilm	Flusssediment [KBE/100 g FG]	Wassergehalt Sediment
18.03.2013	2.600	34.000.000	77 %	145.000	23 %
27.10.2014	7.650	39.650.000	81 %	1.900.000	50 %
03.11.2014	46.000	153.000.000	82 %	325.000	22 %
10.11.2014	5.500	23.100.000	80 %	2.165.000	34 %
Durchschnittlicher Anreicherungsfaktor von <i>Aeromonas</i> spp.		Epilithischer Biofilm		Flusssediment	
		6.447 x		176 x	

4.2.5. Pathogenität der Umweltisolate von *Aeromonas* spp.

Die Virulenz der einzelnen *Aeromonas*-Isolate und auch das damit verbundene gesundheitliche Risiko hängen stark vom Vorliegen entsprechender Virulenzfaktoren ab. Diese wurden auf genotypischer Ebene durch die Detektion bekannter Virulenzgene mit Hilfe der PCR und Gelelektrophorese ermittelt. Sie codieren jeweils eine Elastase (ahyB), Lipasen (lip, pla, lipH3, alp-1) und Enterotoxine (act, aerA, hlyA, alt, ast). Ebenso wurde das phänotypische Merkmal der Hämolyse durch einen Ausstrich auf Blutagar untersucht.

Es wurden 34 Umweltisolate ausgewählt, die aus Oberflächenwasser und dem dazugehörigen epilithischen Biofilm sowie Sediment stammen. Eine detaillierte Auflistung hierzu findet sich in Tabelle 46 im Anhang. Von diesen wurden 33 mittels API® 20 NE-Testsystem als *Aeromonas* spp. identifiziert und erwiesen sich somit als geeignet für die weitere Untersuchung. Es konnten alle Pathogenitätsfaktoren bei einem Teil der Isolate nachgewiesen werden. Während die Probenart – Wasserphase, Biofilm, Sediment – keinen Einfluss auf die anteilmäßige Verteilung der Pathogenitätsfaktoren zu haben schien, ergaben sich bei der Aufstellung nach Koloniemorphologie einige Verschiebungen (Tabelle 30). Ebenfalls verfügten einzelne Isolate über alle bzw. keine der gesuchten Faktoren.

Tabelle 30: Vorkommen bekannter Pathogenitätsfaktoren von *Aeromonas* spp. bei aus dem Fließgewässer Ruhr und dessen Sedimenten und Biofilmen gewonnen Umweltisolaten. Die Art der Hämolyse wurde durch Ausstrich des Isolats auf Columbia-Blutagar und Inkubation für bis zu 48 h ermittelt. Ob die Gene der Pathogenitätsfaktoren vorlagen, wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern und anschließende Gelelektrophorese aufgedeckt.

Herkunft	Gene der Pathogenitätsfaktoren					Hämolyse	
	<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i> , <i>pla</i> , <i>lipH3</i> , <i>alp-1</i>	<i>ahyB</i>	α	β
Wasserphase Ruhr	45 % (5/11)	9 % (1/11)	18 % (2/11)	73 % (8/11)	55 % (6/11)	45 % (5/11)	27 % (3/11)
epilithischer Biofilm Ruhr	33 % (4/12)	17 % (2/12)	8 % (1/12)	58 % (7/12)	50 % (6/12)	67 % (8/12)	33 % (4/12)
Sediment Ruhr	40 % (4/10)	10 % (1/10)	10 % (1/10)	70 % (7/10)	60 % (6/10)	70 % (7/10)	30 % (3/10)
Gesamt	39 % (13/33)	12 % (4/33)	12 % (4/33)	61 % (20/33)	55 % (18/33)	64 % (21/33)	24 % (8/33)

Kolonie-morphologie	Gene der Pathogenitätsfaktoren					Hämolyse	
	<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i> , <i>pla</i> , <i>lipH3</i> , <i>alp-1</i>	<i>ahyB</i>	α	β
orange	13 % (1/8)	0 % (0/8)	13 % (1/8)	63 % (5/8)	50 % (4/8)	100 % (8/8)	0 % (0/8)
oranges Zentrum	13 % (1/8)	0 % (0/8)	0 % (0/8)	50 % (4/8)	50 % (4/8)	75 % (6/8)	0 % (0/8)
helles Zentrum	75 % (6/8)	25 % (2/8)	25 % (2/8)	88 % (7/8)	75 % (6/8)	13 % (1/8)	75 % (6/8)
gelb-orange	56 % (5/9)	22 % (2/9)	11 % (1/9)	44 % (4/9)	44 % (4/9)	66 % (6/9)	22 % (2/9)
Gesamt	39 % (13/33)	12 % (4/33)	12 % (4/33)	61 % (20/33)	55 % (18/33)	64 % (21/33)	24 % (8/33)

4.2.6. Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* im Fließgewässer Ruhr

Im Gegensatz zu *Aeromonas* spp. trat die ebenfalls fakultativ pathogene Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* nur in einem geringen Konzentrationsbereich mit einem Median von 1,6 MPN/100 mL auf, wenige Konzentrationsspitzen überschritten jedoch die obere

Quantifizierungsgrenze von 360 MPN/100 mL. Ein positiver Nachweis war hierbei mit 81 % bei der Mehrzahl der untersuchten Wasserproben (170 von 210 Proben) möglich.

Ein signifikanter Unterschied kann aus den Verteilungen an den einzelnen Probenahmestellen nicht abgeleitet werden (Abbildung 30). Auch eine Ausdehnung des Untersuchungszeitraums von einem auf zwei Jahre an den Probenahmestellen Seaside Beach und BarCelona trug kaum zu einem Unterschied bei.

Auftreten von *Pseudomonas aeruginosa* an den einzelnen Probenahmestellen

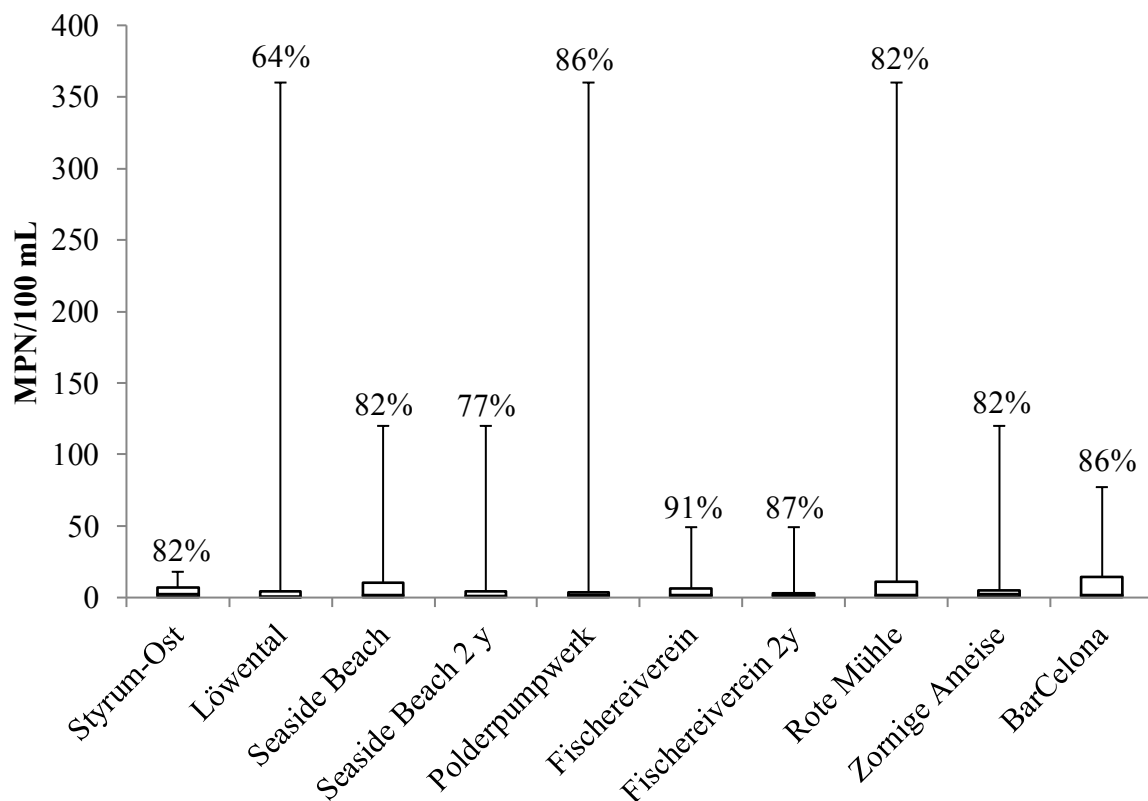


Abbildung 30: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa* an den einzelnen Probenahmestellen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden pro Probenahmestelle je 22 Wasserproben über einen Zeitraum von 13 Monaten ausgewertet, die Darstellungen Seaside Beach und Fischereiverein schließen 17 zusätzliche Probenahmen mit ein (Untersuchungszeitraum 26 Monate, insgesamt je 39 Proben). Die Nachweishäufigkeit an den einzelnen Stellen ist in Prozent angegeben.

Die Auftragung der Gehalte an *P. aeruginosa* zu den einzelnen Probenahmeterminen (Abbildung 31) offenbart einen leichten Anstieg sowohl der Nachweishäufigkeiten als auch der Konzentrationen im Sommer. Eine Ausnahme bildet auch hier der Termin am 17.12.2012, der eine Konzentrationsspitze zum Zeitpunkt eines Hochwasserereignisses zeigt.

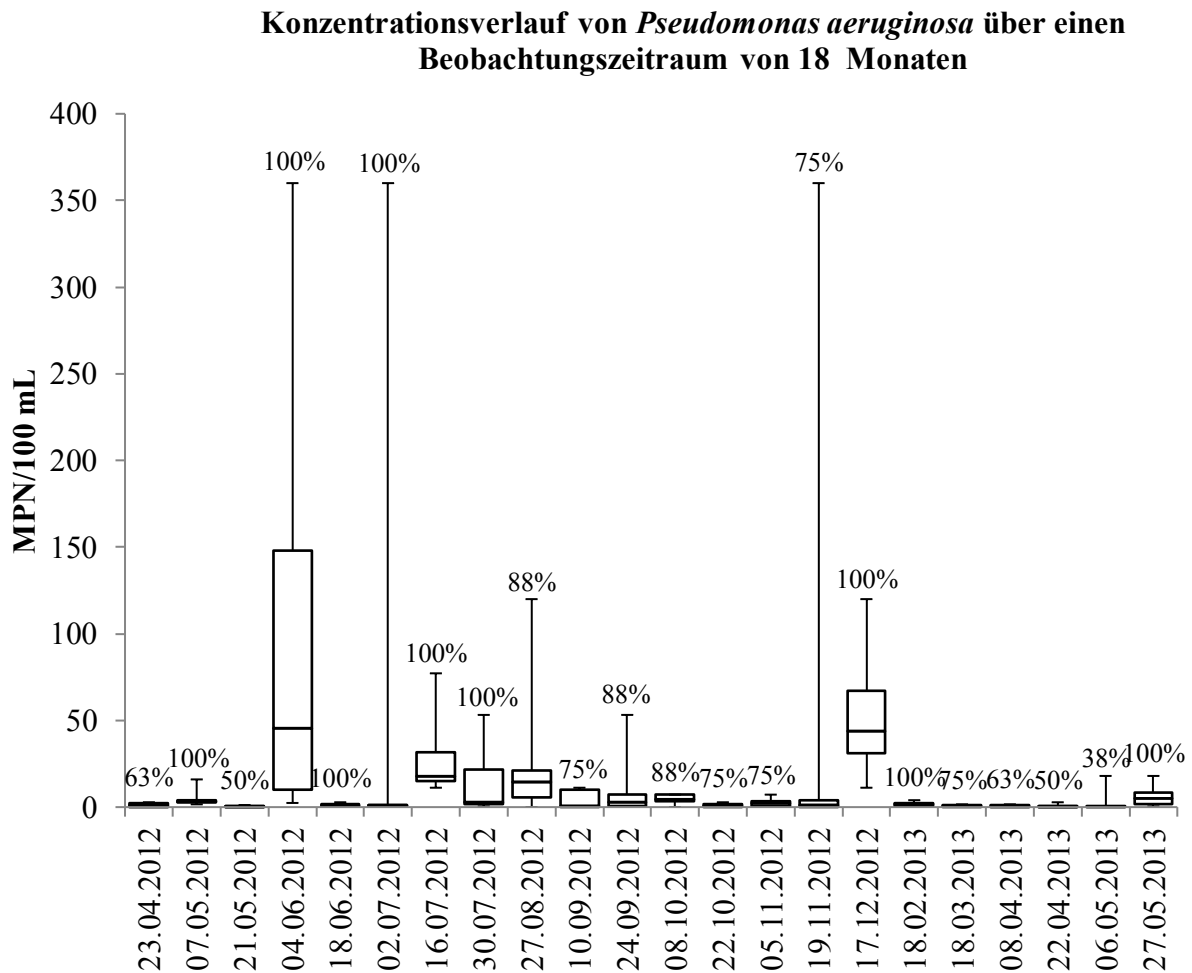


Abbildung 31 Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa* an den einzelnen Probenahmeterminen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 13 Monate untersucht. Die Nachweishäufigkeit an den einzelnen Terminen ist in Prozent angegeben.

4.2.7. Anreicherung von *Pseudomonas aeruginosa* im Flusssediment

Eine mögliche Anreicherung von *P. aeruginosa* war insgesamt schwieriger zu dokumentieren als in Kapitel 4.2.4 für *Aeromonas* spp. dargestellt, da hier die Ausgangswerte in der Wasserphase sehr gering waren und die Nachweisgrenze der Konzentration im Biofilm bzw. in den Sedimenten um ein Vielfaches höher liegt.

Bei dem Vergleich der Konzentration von *P. aeruginosa* im Uferbereich mit dem Oberflächengewässer in einiger Entfernung zum Ufer zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tabelle 31). Lediglich konnte beim Aufwirbeln der Sedimente im Uferbereich bei zwei der drei Probenahmen ein leichter Konzentrationsanstieg nachgewiesen werden.

Etwas deutlicher zeigte sich die Anreicherung von *P. aeruginosa* bei einer direkten Beprobung des epilithischen Biofilms und des feinkörnigeren Sediments (Tabelle 32). Im Biofilm konnte in allen drei Proben eine deutliche Erhöhung der Werte mit einem durchschnittlichen Anreicherungsfaktor von etwa 500 festgestellt werden. Im Falle der Sedimente sind die Werte nicht so eindeutig, da die Konzentration bei zwei der drei Proben unter der hohen Nachweisgrenze lag. Somit war hier nur in einem Fall eine 300-fache Anreicherung zu beobachten.

Tabelle 31: Quantitativer Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* im Fließgewässer (Probenahme nach DIN EN ISO 19458:2006) und Uferbereich (Wassertiefe ca. 30 cm) der Probenahmestelle Seaside Beach. Zusätzlich wurden im Uferbereich nach Aufwirbeln des Sediments Proben entnommen.

Konzentration der jeweiligen Probenart [MPN/100 mL]	09.09.2013	19.05.2014	14.07.2014
Wasserprobe nach DIN EN ISO 19458:2006	18,0	< 0,4	7,2
Wasserprobe Uferbereich	29,2	< 0,4	4,0
Wasserprobe Uferbereich nach Aufwirbeln von Sediment	38,0	< 0,4	11,2

Tabelle 32: Anreicherung von *Pseudomonas aeruginosa* im epilithischen Biofilm und Sediment der Probenahmestelle BarCelona.

Datum	Konzentrationen				
	Wasserprobe [MPN/100 mL]	Epilithischer Biofilm [MPN/100 g FG]	Wasser- gehalt Biofilm	Flusssediment [MPN/100 g FG]	Wasser- gehalt Sediment
27.10.2014	1,2	930	81 %	360	50 %
03.11.2014	11,2	930	82 %	< 310	22 %
10.11.2014	1,2	740	80 %	< 310	34 %
Durchschnittlicher Anreicherungsfaktor von <i>P. aeruginosa</i>		Epilithischer Biofilm 492 x		Flusssediment < 28 - 300 x	

4.2.8. Vorkommen von *Campylobacter* spp. im Fließgewässer Ruhr

Die Anwesenheit von *Campylobacter* spp. wurde mit einer MPN-basierten Methode unter Verwendung von Preston-Bouillon als primäres Anreicherungsmedium sowie mCCD-Agar als Selektivmedium untersucht. Der ermittelte Konzentrationsbereich war mit einem Maximum von 15 MPN/100 mL dabei äußerst niedrig. Ähnliches traf auch für die Nachweisrate zu, die mit etwa 35 % ebenfalls sehr gering war. Betrachtet man die Aufschlüsselung auf die einzelnen Probenahmestellen (Abbildung 32), so ergibt sich kein eindeutig homogenes Bild, wie bei den bisher beschriebenen Organismen. Die Probenahmestelle Polderpumpwerk sticht sowohl bei der Nachweishäufigkeit als auch bei den ermittelten Konzentrationen deutlich heraus. Obwohl diese ursprünglich wegen des benachbarten Vogelschutzgebietes ausgewählt wurde, um den vermehrten Eintrag unter anderem von *Campylobacter* durch Wildvögel abzubilden, lagen sowohl die Nachweisrate als auch der ermittelte Konzentrationsbereich ein Vielfaches unter dem der anderen untersuchten Probenahmestellen. Diese restlichen Probenahmestellen unterschieden sich nicht signifikant in ihren Verteilungen. Bei der Ausweitung des Untersuchungszeitraums auf zwei Jahre an den Stellen Seaside Beach und Fischereiverein ergaben sich eine Ausdehnung des Konzentrationsbereiches sowie eine gestiegene Nachweisrate durch höhere Werte im zweiten Jahr der Untersuchungen.

Der in Abbildung 33 dargestellte Konzentrationsverlauf des ersten Jahres offenbart geringere Nachweisraten innerhalb der Badesaison als in den Herbst- und Wintermonaten, in denen sich ebenfalls ein leichter Konzentrationspeak abzeichnet.

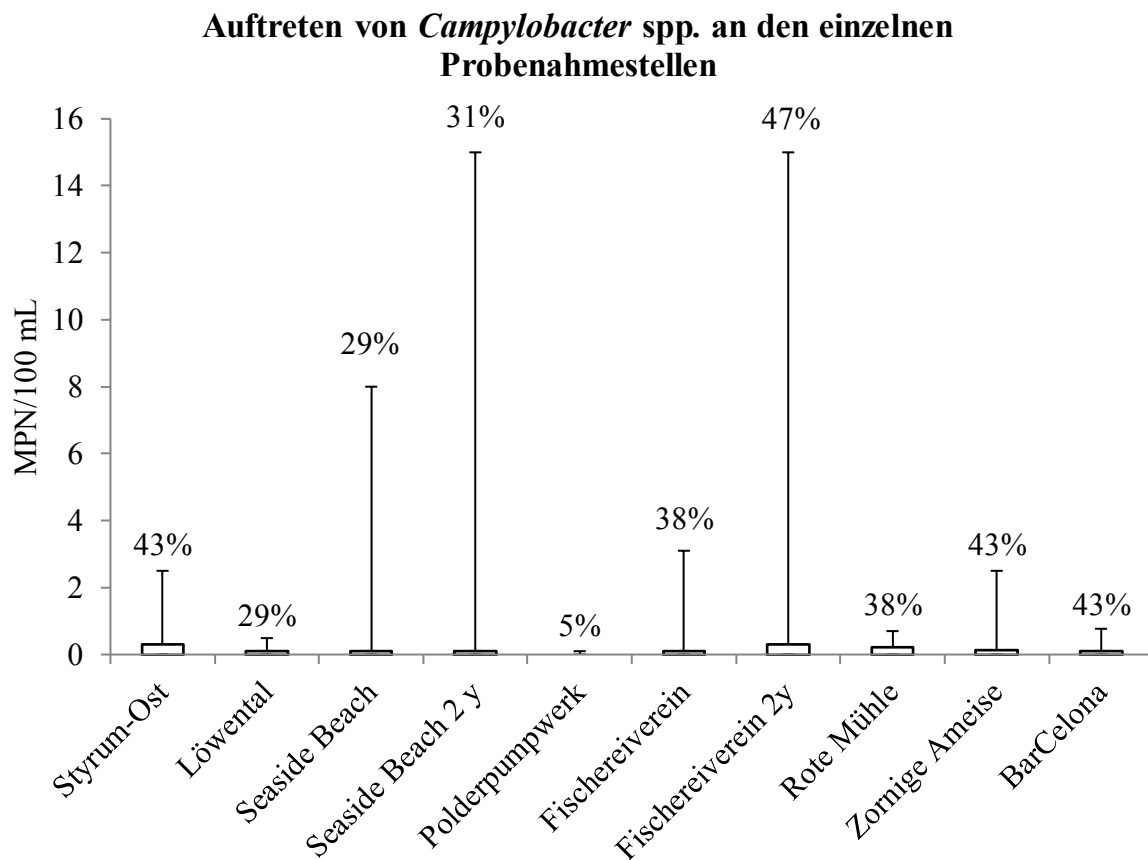


Abbildung 32: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Campylobacter* spp. an den einzelnen Probenahmestellen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden pro Probenahmestelle je 21 Wasserproben über einen Zeitraum von 13 Monaten ausgewertet, die Darstellungen Seaside Beach und Fischereiverein schließen 15 zusätzliche Probenahmen mit ein (Untersuchungszeitraum 26 Monate, insgesamt je 36 Proben). Die Nachweishäufigkeit an den einzelnen Stellen ist in Prozent angegeben.

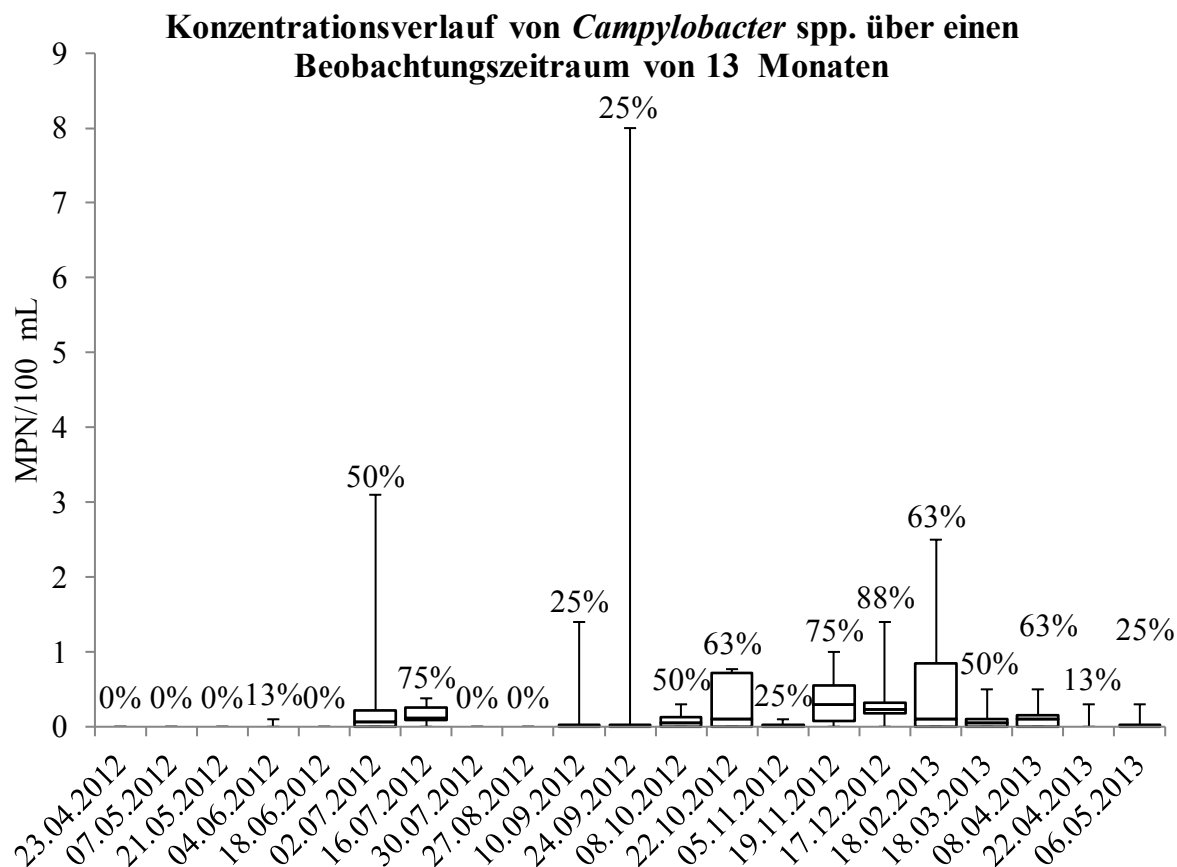


Abbildung 33: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Campylobacter* spp. an den einzelnen Probenahmeterminen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 13 Monate untersucht. Die Nachweishäufigkeit an den einzelnen Terminen ist in Prozent angegeben.

4.2.9. Anreicherung von *Campylobacter* spp. im Flusssediment

Ob erhöhte Werte von *Campylobacter* spp. im epilithischen Biofilm, sowie den Sedimenten des Flusses vorliegen, konnte mit der verwendeten Methode leider nicht festgestellt werden. Die gemessenen Werte waren in der Wasserphase -falls positiv- ebenfalls sehr gering, sodass hieraus keine Aussage abgeleitet werden kann.

Messungen der Konzentrationen im Uferbereich vor und nach Aufwirbeln des Flusssediments sind in Tabelle 33 aufgelistet. Auch bei diesen Proben war meist kein Nachweis des Zielorganismus möglich. Lediglich in einer der drei Probenahmen konnten *Campylobacter* spp. in allen Probenarten in ähnlicher Konzentration bestimmt werden. Aus dieser einen Messung lässt sich keine allgemeingültige Aussage, auch kein Hinweis auf einen vermehrten Eintrag von *Campylobacter* spp. aus den Sedimenten ableiten

Tabelle 33: Quantitativer Nachweis von *Campylobacter* spp. im Fließgewässer (Probenahme nach DIN EN ISO 19458:2006) und Uferbereich (Wassertiefe ca. 30 cm) der Probenahmestelle Löwental. Zusätzlich wurden im Uferbereich nach Aufwirbeln des Sediments Proben entnommen.

Konzentration der jeweiligen Probenart [MPN/100 mL]	09.09.2013	19.05.2014	14.07.2014
Wasserprobe nach DIN EN ISO 19458:2006	< 0,1	< 0,1	0,3
Wasserprobe Uferbereich	< 0,1	< 0,1	0,1
Wasserprobe Uferbereich nach Aufwirbeln von Sediment	< 0,1	< 0,1	0,3

4.2.10. Charakterisierung der Umweltisolate von *Campylobacter* spp.

In den Untersuchungen wurden insgesamt 184 Umweltisolate aus Oberflächenwasser gewonnen und dem Genus *Campylobacter* spp. zugeordnet. Für eine weitere Bewertung der hygienischen Situation des Gewässers ist es sinnvoll, weitere Kenntnisse über die konkret auftretenden Spezies zu erlangen. Daher wurden die Isolate mit dem API® Campy-Testsystem und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) identifiziert sowie mit dem Dryspot *Campylobacter* Test-Kit zusätzlich bestätigt.

Da einige Isolate im weiteren Verlauf nicht mehr kultivierbar waren, konnten nur 176 der Isolate mit Hilfe der zusätzlichen Tests untersucht werden. Es zeigte sich, dass fast alle der kontrollierten Isolate mit mehr als einem Kriterium bestätigt werden konnten (Tabelle 34 und Tabelle 50 im Anhang). Der Dryspot *Campylobacter* Test, bei dem *Campylobacter* über Oberflächenantikörper nachgewiesen wird, war bei 93 % der Isolate positiv. Die FISH war bei Einsatz einer Sonde, die spezifisch für thermotolerante *Campylobacter* spp. ist, bei 97 % der Umweltisolate positiv. Wurde eine *Campylobacter jejuni*-spezifische Sonde gewählt, lag dieser Anteil bei 94 %.

Tabelle 34: Bestätigung aus Oberflächenwasser gewonnener *Campylobacter*-Umweltisolate mittels Dryspot *Campylobacter* Test und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Die bei der FISH verwendeten Sonden sind spezifisch für thermotolerante *Campylobacter* spp. (Catherm) bzw. *Campylobacter jejuni* (Cajej).

Test		getestet	positiv
Dryspot <i>Campylobacter</i> Test		176	163 (93 %)
	Catherm	175	169 (97%)
Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung			165 (94 %;
	Cajej	175	98 % der Catherm positiven Isolate)

Die Identifizierung mit dem API® Campy-System erwies sich nicht als geeignet für Umweltisolate. Zum einen war der Test bei vielen der Isolate durch mangelndes Wachstum nicht auswertbar. Zum anderen konnte bei einer überwiegenden Mehrheit der Isolate keine Identifizierung auf Genusebene erreicht werden oder das erhaltene Profil war nicht in der Datenbank vorhanden. Zusätzlich widersprach das Ergebnis auf Speziesebene in einigen Fällen dem Resultat der FISH. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 50 im Anhang aufgeführt.

4.2.11. Risikobewertung von *Campylobacter* spp. im Fließgewässer

Wie sich in der Untersuchung der Isolate gezeigt hat, war *Campylobacter jejuni* im vorliegenden Fließgewässer eindeutig die dominante Spezies. Daher kann die von Medema *et al.* (1996) herausgearbeitete Beziehung von Dosis zu Infektionswahrscheinlichkeit hier sehr gut angewendet

werden, da sie auf epidemiologischen Daten zu *Campylobacter jejuni* basiert. Bei einer Berechnung des Risikos nach dem QMRA-Konzept (Formel 11) ergab sich durch das Schwimmen am Probenahmetermin mit der maximalen Konzentration von 15 MPN/100 mL eine Infektionswahrscheinlichkeit von 4 %, was einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von 0,9 % entspricht. Berechnet man das Infektionsrisiko für Kinder, ist dieses durch die höhere Menge an verschlucktem Wasser mit 8 % und einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von 1,8 % etwas höher. In Tabelle 35 sind zusätzlich die Risiken für unterschiedliche Expositionsfälle aufgelistet.

Tabelle 35: Berechnung der Infektionswahrscheinlichkeiten bei verschiedenen Konzentrationen von *Campylobacter* spp. und unterschiedlichen Expositionsszenarien. Die durchschnittlich beim Schwimmen in 45 min verschluckten Wassermengen wurden von Dufour *et al.*, 2006 in einer Studie ermittelt.

Szenarium	Infektionswahrscheinlichkeit	Erkrankungswahrscheinlichkeit
Maximum: 15 MPN/100 mL		
Trinken von 1 L Wasser	35 %	7,6 %
Schwimmen Erwachsener (Verschlucken von 21 mL Wasser in 45 min)	4 %	0,9 %
Schwimmen Kind (Verschlucken von 49 mL Wasser in 45 min)	8 %	1,8 %
Nachweisgrenze: 0,1 MPN/100 mL		
Trinken von 1 L Wasser	0,15 %	0,03 %
Schwimmen Erwachsener (Verschlucken von 21 mL Wasser)	0,003 %	0,001 %
Schwimmen Kind (Verschlucken von 49 mL Wasser)	0,008 %	0,002 %

4.2.12. Vorkommen von *Salmonella enterica* im Fließgewässer Ruhr

Für den Nachweis von *Salmonella enterica* wurde ebenfalls, wie im Falle von *Campylobacter* spp., eine MPN-basierte Methode verwendet. Auf eine Voranreicherung in Peptonwasser wurde im Falle von Oberflächenwasser verzichtet und als erster Anreicherungs-schritt eine selektive RVS-Bouillon eingesetzt. In einem weiteren Schritt wurden zwei unterschiedliche Selektivmedien (XLD- und BPLS-Agar) sowie zusätzlich verschiedene biochemische Bestätigungsreaktionen zur weiteren Identifizierung eingesetzt. Grundsätzlich lagen die ermittelten Werte in einem sehr geringen Konzentrationsbereich und es gab nur einen Spitzenwert, der die obere Bestimmungsgrenze der Methode von 37 MPN/100 mL überschreitet. Die Nachweisrate war für diesen Zielorganismus mit durchschnittlich 28 % sehr gering. Bei einer separaten Auftragung der Verteilungen und Häufigkeiten des Nachweises für die einzelnen Probenahmestellen zeigte sich ein heterogenes Bild (Abbildung 34). Am häufigsten wurde *Salmonella enterica* demnach an der Probenahmestelle BarCelona gefunden. Auch die ermittelten Konzentrationen waren an dieser Stelle geringfügig höher. Bei den restlichen Probenahmestellen ist eine leichte Konzentrationsabnahme im Verlauf der Ruhr von der Stelle Zornige Ameise bis Styrum-Ost zu beobachten. Dies traf auch auf die Nachweishäufigkeit zu.

Auftreten von *Salmonella enterica* an den einzelnen Probenahmestellen

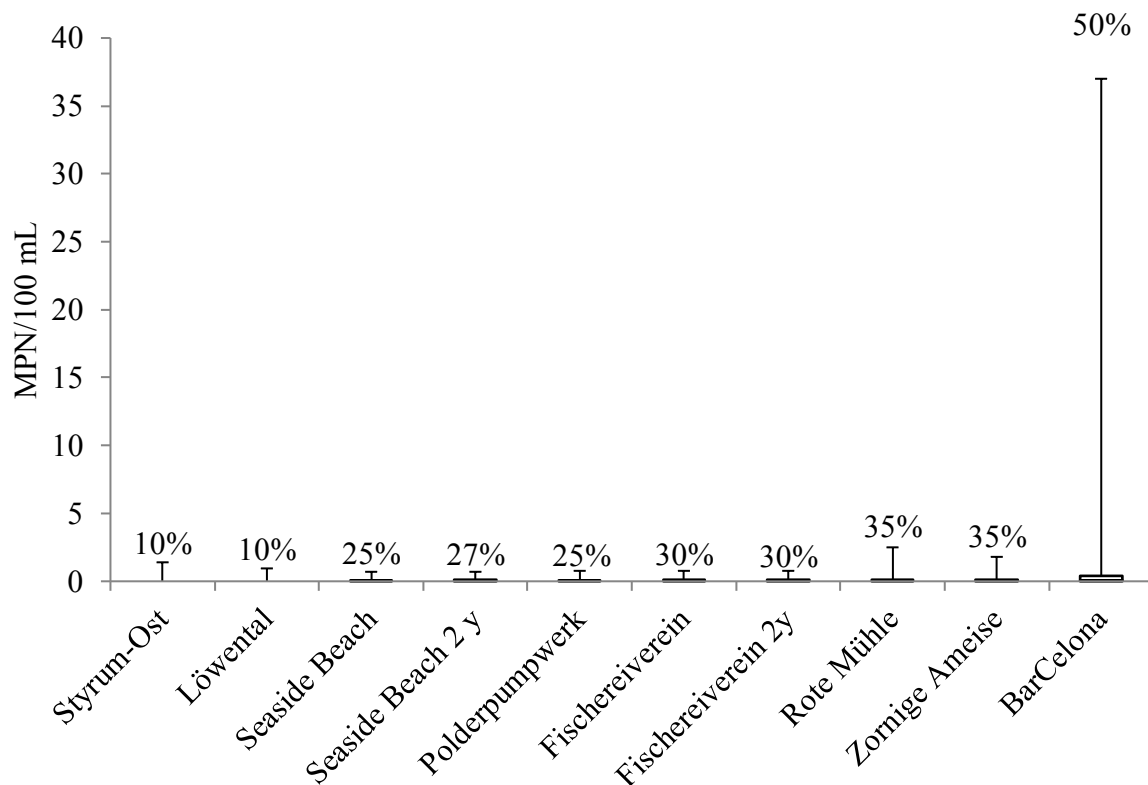


Abbildung 34: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Salmonella enterica* an den einzelnen Probenahmestellen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden pro Probenahmestelle je 20 Wasserproben über einen Zeitraum von 12 Monaten ausgewertet, die Darstellungen Seaside Beach und Fischereiverein schließen 17 zusätzliche Probenahmen mit ein (Untersuchungszeitraum 26 Monate, insgesamt je 37 Proben). Die Nachweishäufigkeit an den einzelnen Stellen ist in Prozent angegeben.

Im Jahresverlauf des Untersuchungszeitraumes zeigt sich zudem auch eine Saisonalität (Abbildung 35). Sowohl die Häufigkeiten eines positiven Nachweises als auch die gemessenen Konzentrationen wären in den Herbst- und Wintermonaten erhöht.

Konzentrationsverlauf von *Salmonella enterica* über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten

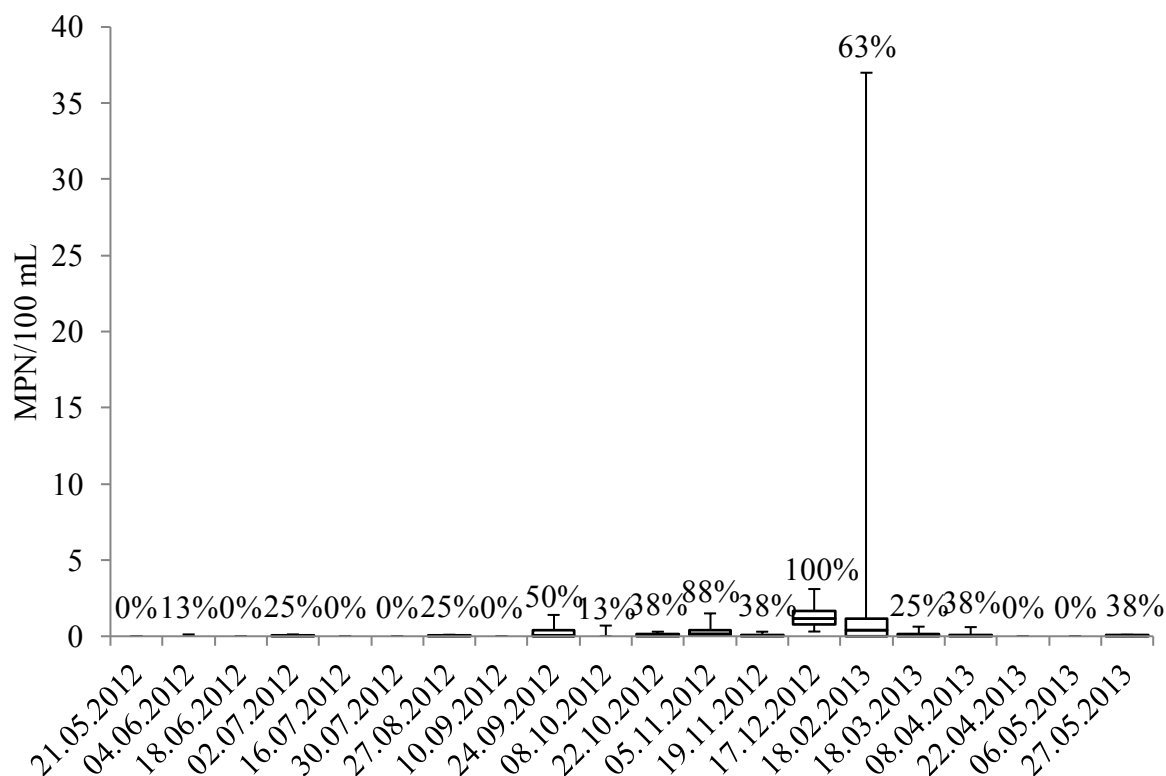


Abbildung 35: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von *Salmonella enterica* an den einzelnen Probenahmeterminen (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 12 Monate untersucht.

4.2.13. Anreicherung von *Salmonella enterica* im Flusssediment

Ähnlich wie im Falle von *Campylobacter* spp. kann durch die allgemein niedrigen Konzentrationen keine eindeutige Aussage über die Anreicherung von *Salmonella enterica* in den Sedimenten getroffen werden. Sowohl bei Beprobungen der Sedimente als auch der epilithischen Biofilme konnte kein positiver Nachweis erbracht werden, wobei die Erfassungsgrenze bei 310 MPN/g[°]FG lag. Auch bei einer Probenahme, die einen Eintrag durch aufgewirbelte Sedimente prüfen sollte, konnte nur ein sporadisches Vorkommen in sehr geringen Konzentrationen festgestellt werden (Tabelle 36).

Tabelle 36: Quantitativer Nachweis von *Salmonella enterica* im Fließgewässer (Probenahme nach DIN EN ISO 19458:2006) und Uferbereich (Wassertiefe ca. 30 cm) der Probenahmestelle Löwental. Zusätzlich wurden im Uferbereich nach Aufwirbeln des Sediments Proben entnommen.

Konzentration der jeweiligen Probenart [MPN/100 mL]	09.09.2013	19.05.2014	14.07.2014
Wasserprobe nach DIN EN ISO 19458:2006	0,8	< 0,1	0,3
Wasserprobe Uferbereich	0,1	< 0,1	< 0,1
Wasserprobe Uferbereich nach Aufwirbeln von Sediment	0,1	< 0,1	< 0,1

4.2.14. Charakterisierung und Pathogenität der gewonnenen Umweltisolate von *Salmonella enterica*

Während des Untersuchungszeitraums konnten 251 Umweltisolate von *Salmonella enterica* gewonnen werden. Ein großer Anteil wurde mittels API® 20 E-Identifizierungssystem untersucht. Dieses lieferte nur ein Ergebnis auf Genusebene, zeigte aber eine große Bestätigungsrate von 97 %. Lediglich Isolate einer Probe wurden nicht bestätigt, sondern als *Edwardsiella tarda* identifiziert. Ein einzelnes Isolat einer weiteren Probe erwies sich zudem als *Escherichia coli*.

4.2.15. Risikobewertung von *Salmonella enterica* im Fließgewässer

Die Serovare der einzelnen *Salmonella*-Subkulturen konnten nicht in allen Fällen ermittelt werden. Daher bietet es sich an, eine Risikobewertung nach dem QMRA-Modell unter der Verwendung der für verschiedene Serovare gepoolten Dosis-Infektionsbeziehung zu wählen (Formel 12, nach McBride *et al.* 2013). Genaue Informationen, welcher Anteil der Infektionen auch zur Ausbildung von Symptomen führt, liegen nicht vor. Im Gegensatz zu *Campylobacter* spp. sind die Infektionswahrscheinlichkeiten wegen deutlich höheren Dosen, die zur Infektion nötig sind, sehr viel geringer. Diese betragen bei der maximal quantifizierbaren Konzentration von 37 MPN/100 mL beim Schwimmen lediglich 0,08 % für Erwachsene und 0,2 % für Kinder. Eine genaue Übersicht für verschiedene Szenarien bietet Tabelle 37.

Tabelle 37: Berechnung der Infektionswahrscheinlichkeiten bei verschiedenen Konzentrationen von *Salmonella enterica* und unterschiedlichen Expositionsszenarien. Die durchschnittlich beim Schwimmen in 45 min verschluckten Wassermengen wurden von Dufour *et al.*, 2006 in einer Studie ermittelt.

Szenarium	Infektionswahrscheinlichkeit	Erkrankungswahrscheinlichkeit
Maximum: > 37 MPN/100 mL		
Trinken von 1 L Wasser	> 3,7 %	> 3,7 %
Schwimmen Erwachsener (Verschlucken von 21 mL Wasser in 45 min)	> 0,08 %	> 0,08 %
Schwimmen Kind (Verschlucken von 49 mL Wasser in 45 min)	> 0,20 %	> 0,20 %
Nachweisgrenze: 0,1 MPN/100 mL		
Trinken von 1 L Wasser	0,001 %	0,001 %
Schwimmen Erwachsener (Verschlucken von 21 mL Wasser)	0,00002 %	0,00002 %
Schwimmen Kind (Verschlucken von 49 mL Wasser)	0,00005 %	0,00005 %

4.2.16. Vorkommen von *Legionella* spp. im Fließgewässer Ruhr

Die Untersuchung von *Legionella* spp. in Oberflächenwasser konnte -im Vergleich zu den anderen Parametern- nur auf eine geringere Menge an Proben gestützt werden. Insgesamt wurden *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* an zwei der acht Probenahmestellen durchgängig über einen Zeitraum von 15 Monaten kulturell und mittels (PMA)-qPCR erfasst. Ein Großteil der Daten wurde dabei durch das IWW Zentrum Wasser zur Verfügung gestellt.

Kulturell konnten *Legionella* spp. nur in einer von 60 Proben in einer Konzentration von 83 KBE/100 mL nachgewiesen werden. Mittels PCR hingegen war der Nachweis in allen untersuchten Proben positiv. Die Konzentrationen schwankten dabei zwischen $7,0 \times 10^2$ GU/100 mL und $1,4 \times 10^5$ GU/100 mL mit einem Median von $3,6 \times 10^4$ GU/100 mL. Die Verläufe der Konzentrationen an den beiden untersuchten Probenahmestellen unterschieden sich dabei kaum. Auch eine eindeutige Saisonalität war hier nicht festzustellen (Abbildung 36).

Die Spezies *Legionella pneumophila* konnte im Untersuchungszeitraum nicht kulturell nachgewiesen werden. Ein kulturunabhängiger Nachweis mit Hilfe der qPCR war jedoch in 26 von 60 untersuchten Proben in Konzentrationen bis zu $1,8 \times 10^4$ GU/100 mL möglich. Meist lag die ermittelte Konzentration dabei jedoch unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Zwischen dem Vorkommen an den beiden Probenahmestellen konnten hier ebenfalls keine signifikanten Auffälligkeiten festgestellt werden. Es deutet sich lediglich eine leichte Erhöhung der Konzentrationen im Frühjahr an.

Konzentrationsverlauf von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* an unterschiedlichen Probnahmestellen basierend auf Daten der qPCR

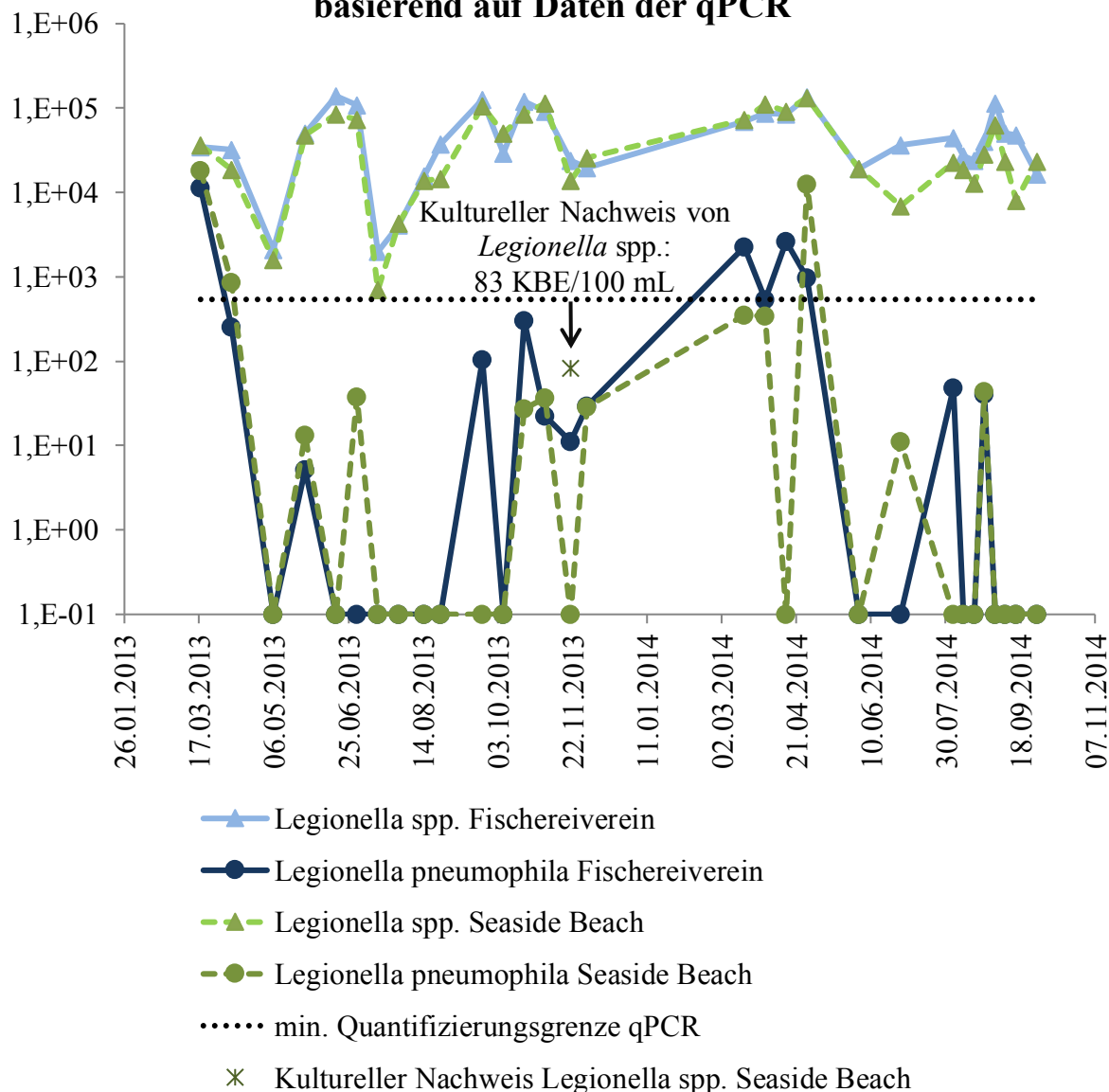


Abbildung 36: Konzentrationsverläufe von *Legionella* spp. (Dreiecke) und *Legionella pneumophila* (Kreise) an den Probnahmestellen Fischereiverein und Seaside Beach über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten. Es sind die Daten des qPCR-basierten Nachweises aufgetragen. Zum Vergleich ist der einzige kulturelle Nachweis von *Legionella* spp. in diesem Zeitraum ebenfalls vermerkt.

Der Anteil vitaler Zellen wurde bei einer Stichprobe ermittelt und lag zwischen 3 % und 89 % für *Legionella* spp.. Die Werte unterschieden sich dabei zwischen den beiden Probnahmestellen. Es konnte jedoch keine allgemeine Tendenz abgeleitet werden (Abbildung 37 und Abbildung 38). Im Falle von *Legionella pneumophila* konnten keine vitalen Zellen gefunden werden.

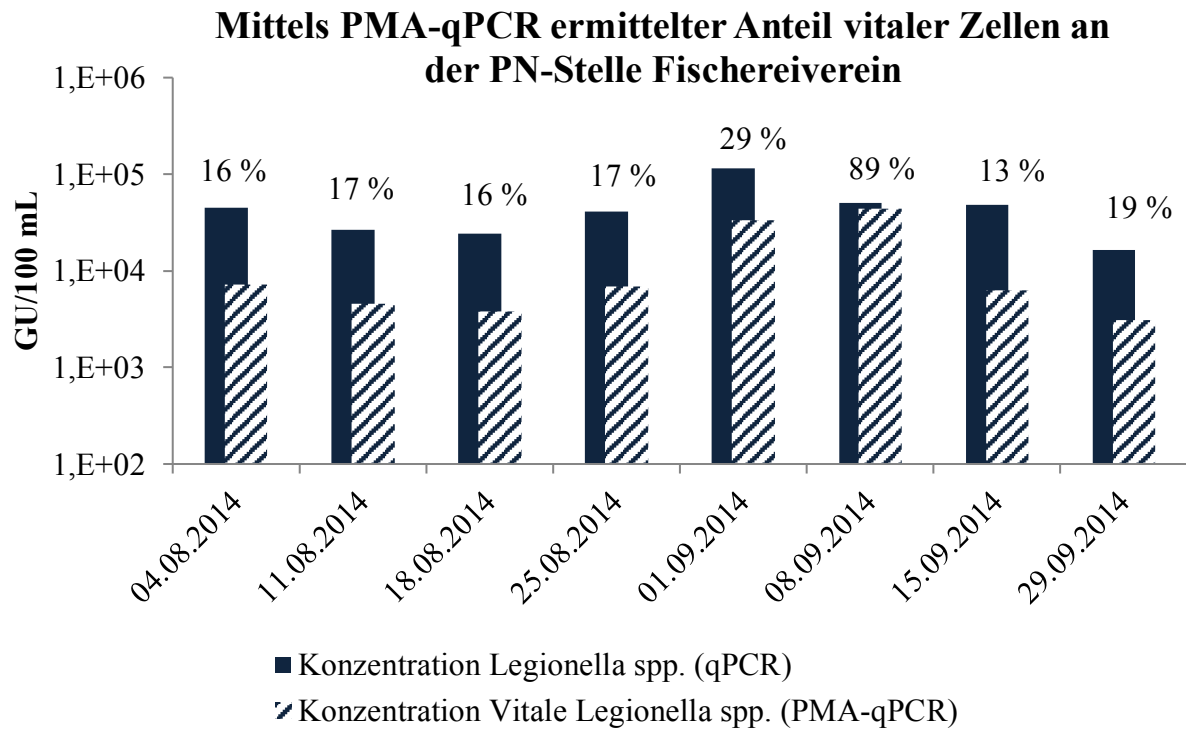


Abbildung 37: Gesamtkonzentration und Konzentration der vitalen Zellen von *Legionella* spp. gemessen durch die (PMA)-qPCR an der Probenahmestelle Fischereiverein. Zusätzlich ist der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtkonzentration in Prozent angegeben.

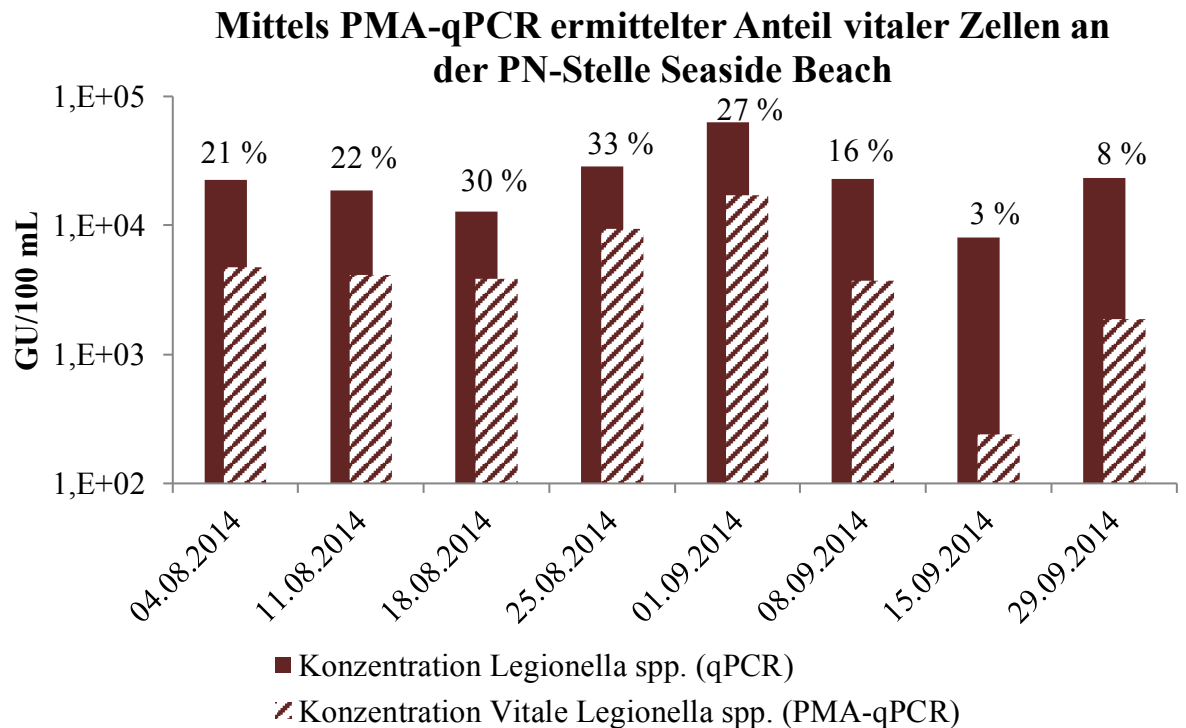


Abbildung 38: Gesamtkonzentration und Konzentration der vitalen Zellen von *Legionella* spp. gemessen durch die (PMA)-qPCR an der Probenahmestelle Seaside Beach. Zusätzlich ist der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtkonzentration in Prozent angegeben.

4.2.17. Anreicherung von *Legionella* spp. im Flusssediment

Proben aus dem Sediment und den epilithischen Biofilmen wurden sowohl mit kulturbasierten Methoden als auch mittels (PMA)-qPCR auf die Anwesenheit von *Legionella* spp. geprüft. Ein kulturbasierter Nachweis war dabei bei keiner Probe möglich. Eine Quantifizierung mittels qPCR war jedoch immer möglich, auch wenn bei der Messung von DNA-Proben aus dem epilithischen Biofilm unter Umständen eine Untererfassung durch Inhibitionseffekte der Probenmatrix vorlag. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 38 aufgelistet. Die gemessenen Konzentrationen von *Legionella* spp. waren im Durchschnitt im Biofilm etwa 200-fach höher und im Sediment etwa 30-fach höher als in der korrespondierenden Wasserphase. Dabei lag die Konzentration in der Wasserphase bereits etwas höher als im in Abschnitt 4.2.16 dargestellten Untersuchungszeitraum. Der Anteil der vitalen Zellen schwankte bei Biofilm- und Sedimentproben stark. In der Wasserphase lag dieser konstant innerhalb eines Bereichs von 29 % bis 39 %. Die Spezies *Legionella pneumophila* konnte bei den untersuchten Proben weder in der Wasserphase noch im Biofilm oder den Sedimenten nachgewiesen werden.

Tabelle 38: Anreicherung von *Legionella* spp. im epilithischen Biofilm und Sediment der Probenahmestelle BarCelona. Die Quantifizierung erfolgte mittels (PMA)-qPCR nach vorheriger DNA-Extraktion der Probe mit dem Aquadien™-Kit.

Datum	Konzentrationen				
	Wasserprobe [GU/100 mL]	Epilithischer Biofilm [GU/100 g FG]	Wasser- gehalt Biofilm	Flusssediment [GU/100 g FG]	Wasser- gehalt Sediment
27.10.2014	642.000	90.300.000*	81 %	16.500.000	50 %
Anteil vitaler Zellen	36 %	54 %		45 %	
03.11.2014	129.000	46.500.000*	82 %	6.410.000	22 %
Anteil vitaler Zellen	29 %	3 %		5 %	
10.11.2014	281.000	46.700.000*	80 %	6.030.000	34 %
Anteil vitaler Zellen	39 %	3 %		12 %	
Durchschnittlicher Anreicherungsfaktor von <i>Legionella</i> spp. (bezogen auf die Gesamtzellzahl)		Epilithischer Biofilm		Flusssediment	
		222 x		32 x	

* Inhibition der PCR-Reaktion: Möglicherweise Untererfassung

4.2.18. Beeinflussung der hygienisch-mikrobiologischen Wasserqualität durch Niederschläge

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs von Niederschlagsereignissen und dem vermehrten Eintrag von Zielorganismen wurden die Tagesdurchschnittskonzentrationen der untersuchten Organismen gegen die Niederschlagswerte des Deutschen Wetterdienstes der Stelle Essen-Bredeney aufgetragen. Für einige Zielorganismen zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation der Konzentrationstagesmittelwerte zur Niederschlagsmenge (z.B. für *Aeromonas* spp. und *P. aeruginosa*). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsanalyse deutet allerdings nur eine mäßige Anpassung an. In Abbildung 39 ist dies beispielhaft für *Aeromonas* spp. dargestellt.

Bei einer Einteilung der Messungen in niederschlagsarme Zeiträume (< 3 mm bis zwei Tage vor Probenahme) und niederschlagsreiche Zeiträume (≥ 3 mm bis zwei Tage vor Probenahme) zeigte sich eine Tendenz zu höheren Konzentrationen an *Aeromonas* spp. und *P. aeruginosa* in Zeiträumen mit erhöhter Niederschlagsmenge (Abbildung 39 und Abbildung 40). Mittels t-Test zeigte sich diese Assoziation für beide Zielorganismen als statistisch signifikant. Bei *Campylobacter* spp. (Abbildung 42) und *Salmonella enterica* (Abbildung 43), die zudem auch im gesamten Beobachtungszeitraum nur in sehr geringen Konzentrationen auftraten, konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration und der Niederschlagsmenge festgestellt werden.

Für *Salmonella* konnte mittels Chi-Quadrat-Test ein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, dass in regenreichen Zeiträumen die Wahrscheinlichkeit für einen Nachweis gegenüber regenarmen Zeiträumen erhöht ist. Für *Campylobacter* zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Nachweiswahrscheinlichkeit und Niederschlagsmenge.

Eine Auswertung für *Legionella* spp. wurde nicht vorgenommen, da nur ein einziger kultureller Nachweis vorlag.

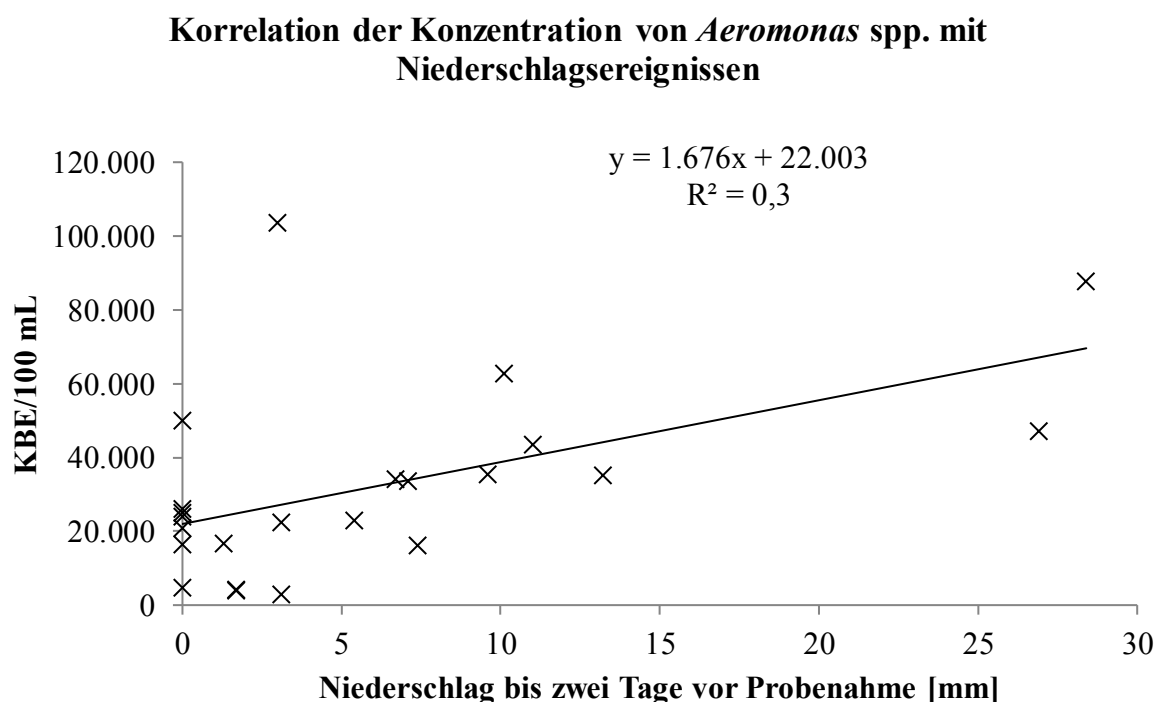


Abbildung 39: Auftragung der gemittelten Tageskonzentrationen von *Aeromonas* spp. gegen die Niederschlagsmenge bis zwei Tage vor dem Probenahmetermin.

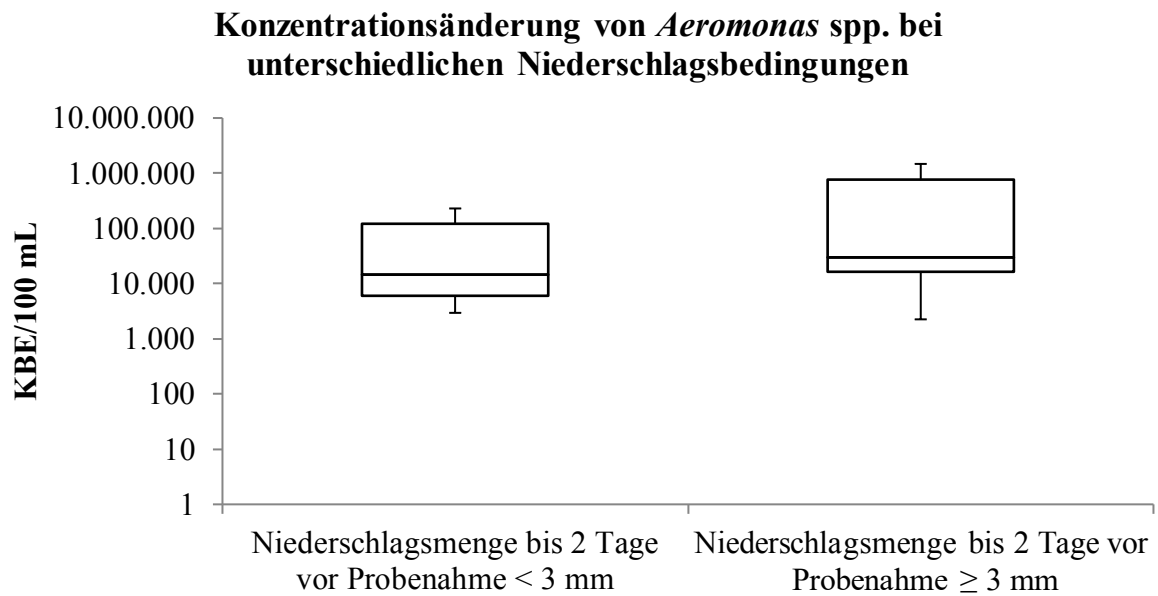


Abbildung 40 bis Abbildung 43: Verteilung der ermittelten Konzentrationen der Zielorganismen in regenreichen (ab 3mm Niederschlagsmenge inkl. der vorangegangenen zwei Tage) und niederschlagsarmen (weniger als 3mm Niederschlagsmenge inkl. der vorangegangenen zwei Tage) Probenahmezeiträumen. (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an. Zusätzlich ist bei Abbildung 41 bis Abbildung 43 die Häufigkeit des positiven Nachweises in Prozent angegeben.)

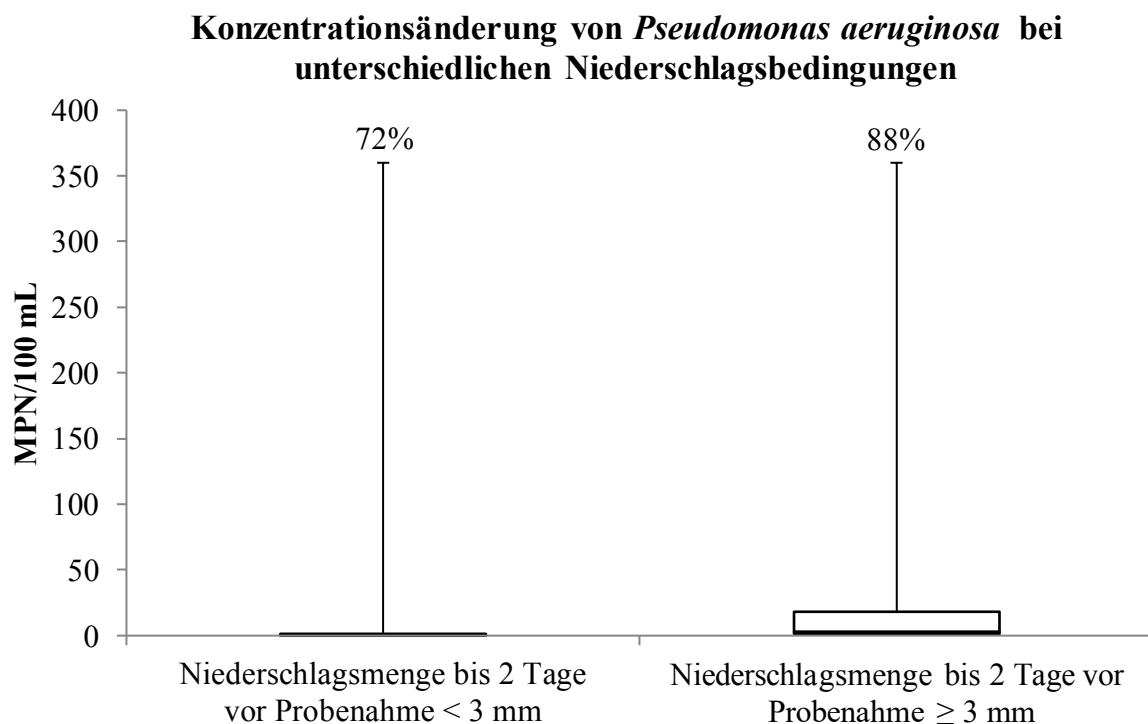


Abbildung 41

Konzentrationsänderung von *Campylobacter* spp. bei unterschiedlichen Niederschlagsbedingungen

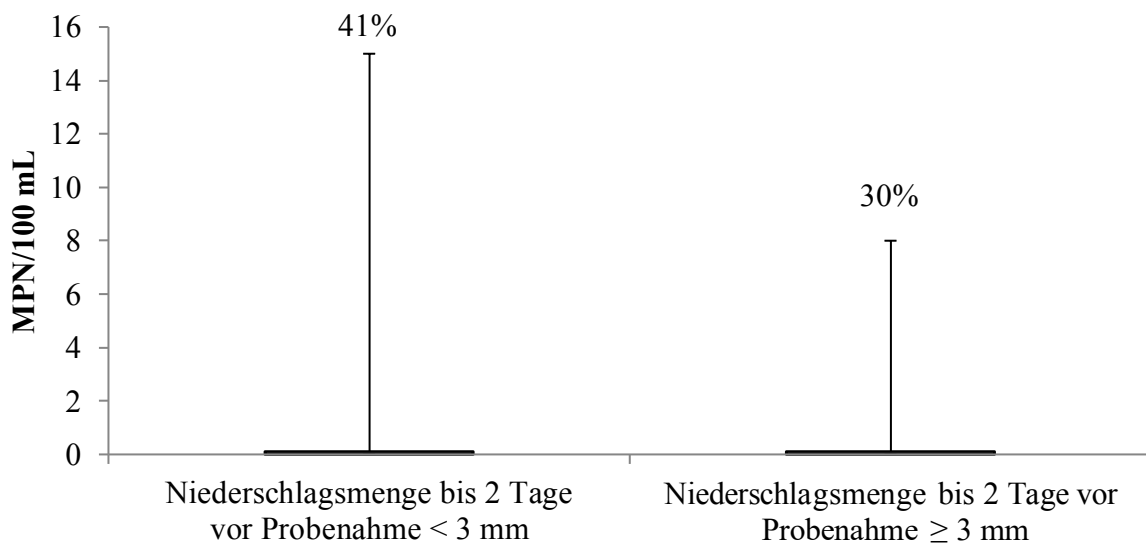


Abbildung 42

Konzentrationsänderung von *Salmonella enterica* bei unterschiedlichen Niederschlagsbedingungen

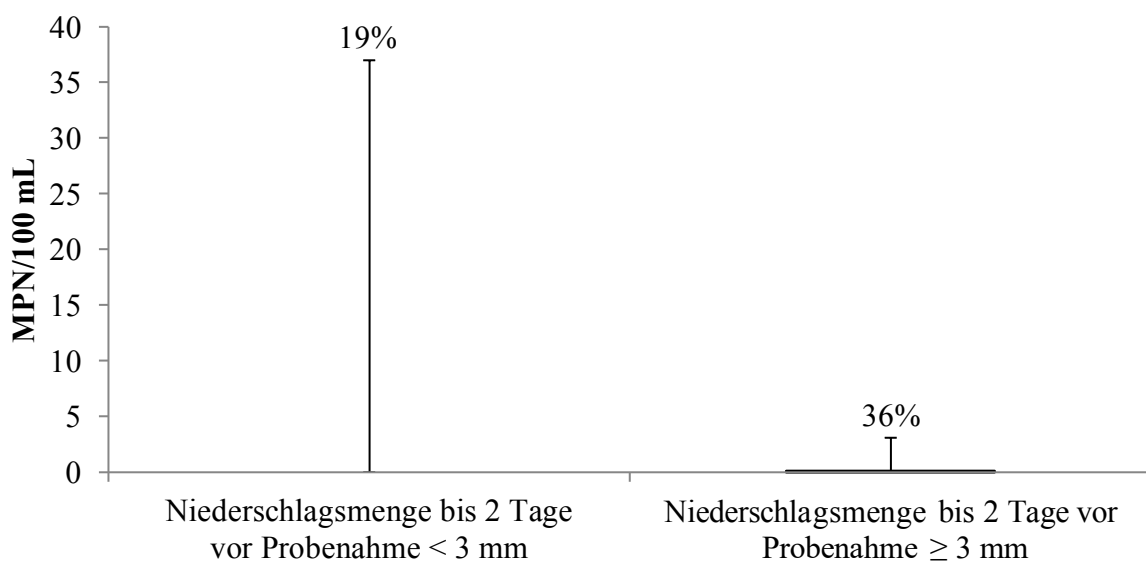


Abbildung 43

4.2.19. Aussagekraft hygienisch relevanter Indikatorbakterien

Eine direkte Korrelation zwischen den Konzentrationen der Indikatorbakterien und den tatsächlichen Konzentrationen der Pathogene war nicht direkt durch ein Auftragen der Werte gegeneinander festzustellen. Trotzdem fallen bei einem Vergleich der Konzentrationsverläufe von Indikatorbakterien und Pathogenen einige gemeinsame Trends ins Auge. Aufgrund des höheren Grundniveaus der Konzentrationen ist dies bei *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas aeruginosa* (Abbildung 44 und Abbildung 45) deutlicher. Bei *Campylobacter* spp. und *Salmonella enterica* (Abbildung 46 und Abbildung 47) sind allgemeine Trends durch die seltene Nachweishäufigkeit schwieriger abzuleiten. Hohe Spitzenwerte zeigen sich dabei meist bei mehreren Parametern gleichzeitig. Auch hier wurden *Legionella* spp. wegen des mangelnden kulturellen Nachweises nicht in die Auswertung einbezogen.

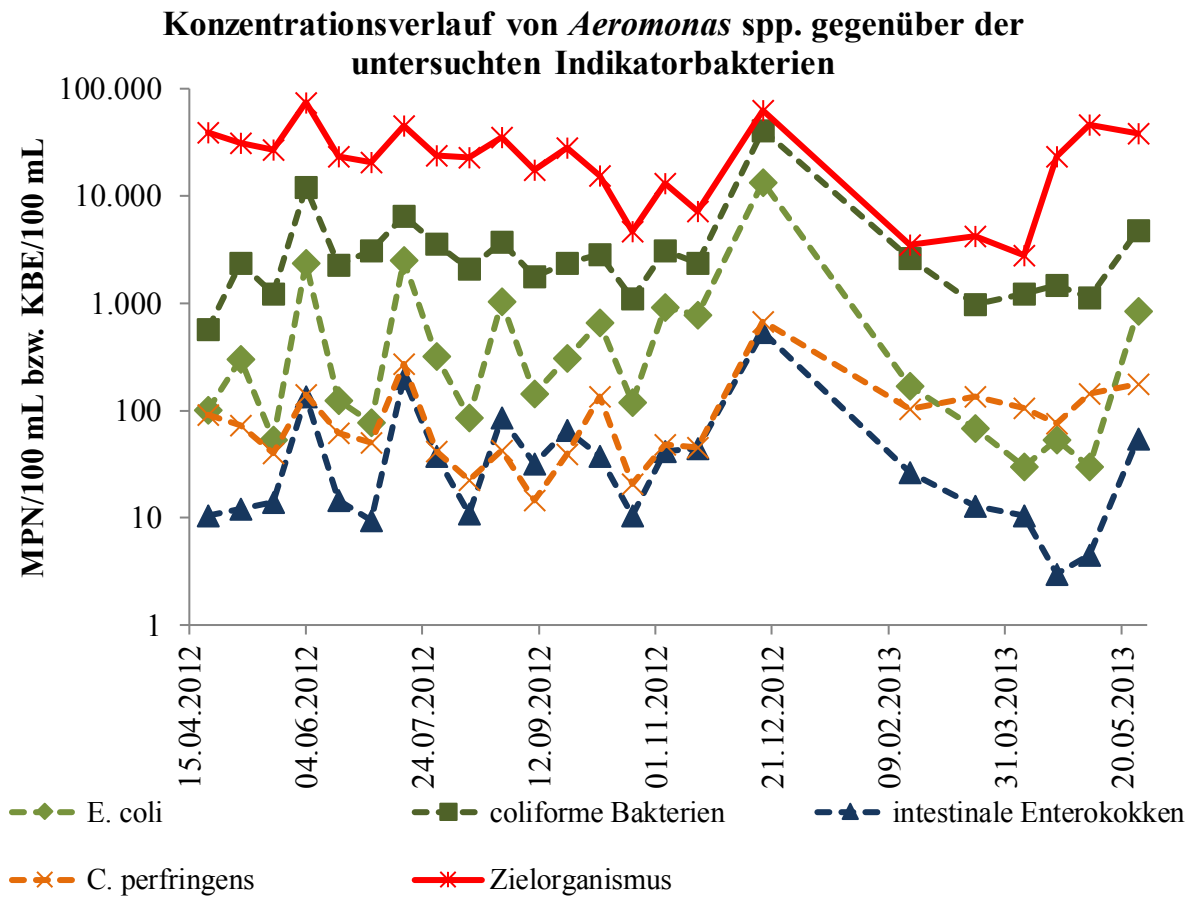


Abbildung 44 bis Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Indikatorbakterien im Vergleich zu dem ausgewählten Zielorganismen (Abbildung 44: *Aeromonas* spp., Abbildung 45: *Pseudomonas aeruginosa*, Abbildung 46: *Campylobacter* spp. Abbildung 47: *Salmonella enterica*). Es sind die Mediankonzentrationen der Tageswerte aufgetragen.

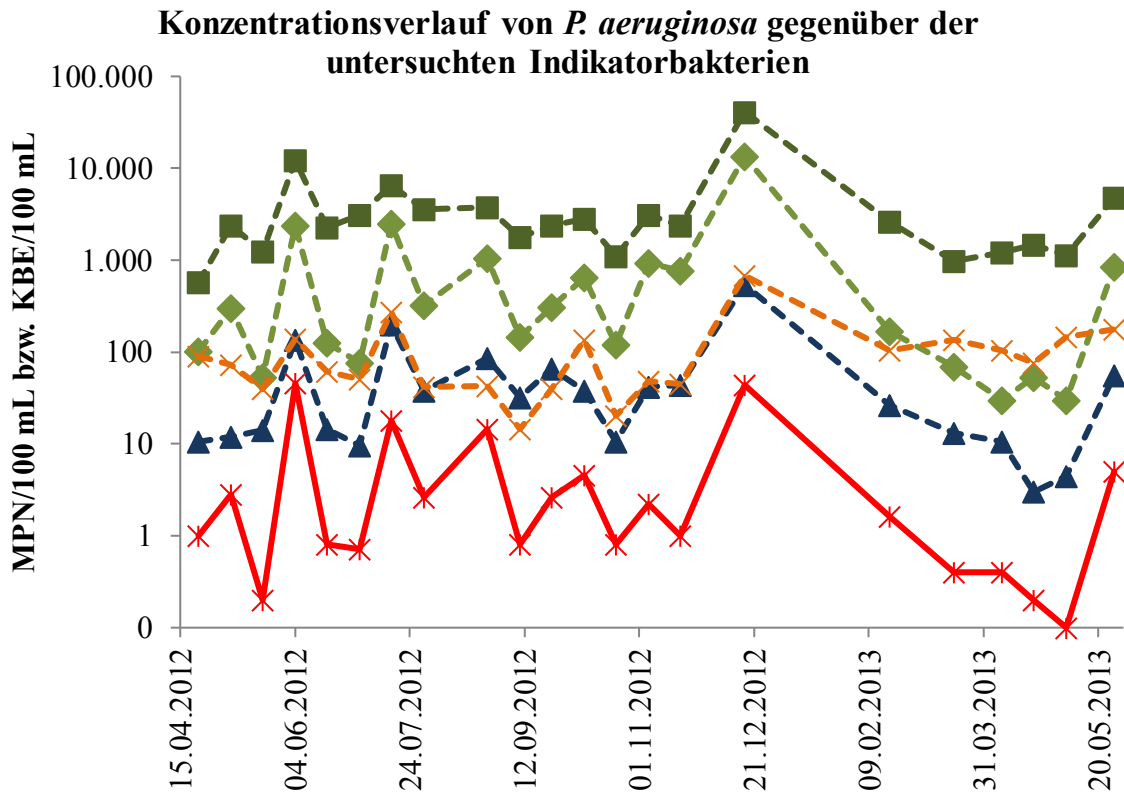


Abbildung 45

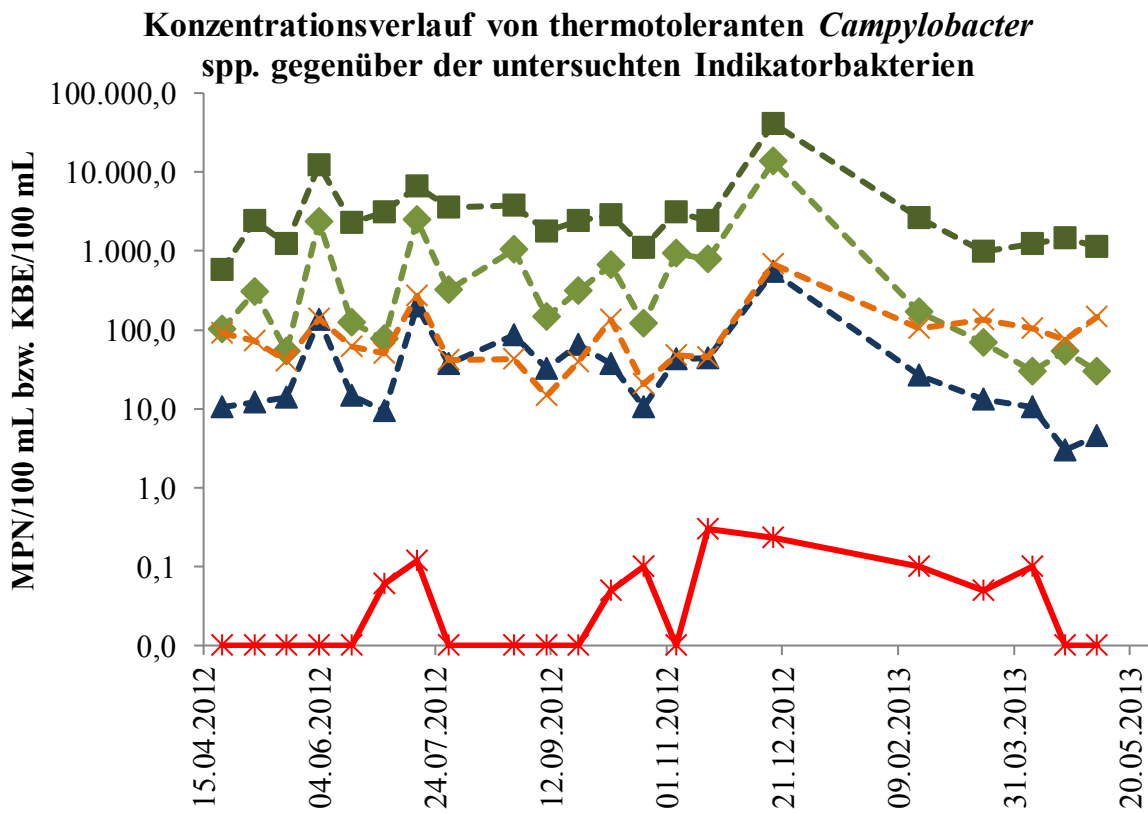


Abbildung 46

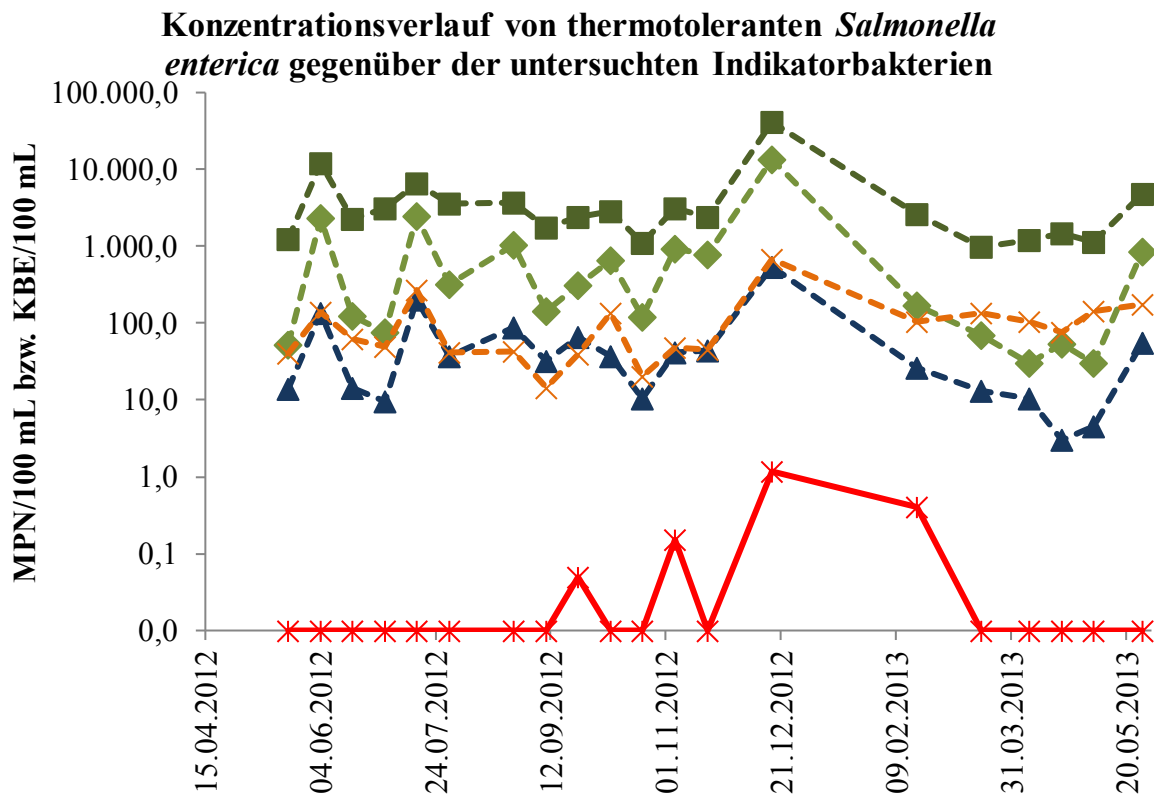


Abbildung 47

Laut NRW-Badegewässerverordnung tritt ein zeitweiliges Badeverbot in Kraft, wenn wiederholt Grenzwerte für den Parameter *E. coli* von 1.800 KBE bzw. MPN/100 mL und/oder intestinale Enterokokken von 800 KBE bzw. MPN/100 mL überschritten werden. Die genannten Grenzwerte wurden im Untersuchungszeitraum bei 28 Einzelmessungen überschritten. Die Konzentrationen der Zielorganismen an Messungen, bei denen der Grenzwert für mindestens eines der Indikatorbakterien überschritten wurde, wurden verglichen mit den Konzentrationen von Messungen, bei denen die Grenzwerte für beide Indikatorbakterien eingehalten wurden. Dies ist in Abbildung 48 bis Abbildung 51 dargestellt. Hier ist bei allen Zielorganismen eine leichte Verschiebung zu höheren Konzentrationen zu erkennen. Die Spanne der ermittelten Konzentrationen von *Aeromonas* spp. ist bei Proben, die mit einer Grenzwertverletzung für die Indikatorbakterien zusammenfallen, sehr groß. Es wurden jedoch häufiger erhöhte Konzentrationen gemessen als an den übrigen Terminen (Abbildung 48). Betrachtet man die Verteilungen der Konzentrationen von *P. aeruginosa* ist der Hang zu höheren Werten noch deutlicher zu erkennen (Abbildung 49). Zusätzlich zeigte sich eine höhere Nachweisrate für *P. aeruginosa* bei Messungen, bei denen die Grenzwerte für die Indikatorbakterien verletzt wurden. Allerdings konnten für *P. aeruginosa* vereinzelt auch dann Werte oberhalb der quantitativen Bestimmungsgrenze ermittelt werden, wenn die Grenzwerte der Indikatorparameter nicht überschritten wurden. Auch bei den Verteilungen von *Campylobacter* spp. (Abbildung 50) und *Salmonella enterica* (Abbildung 51) zeigten sich höhere Nachweisraten bei Überschreitung der Grenzwerte der Indikatororganismen, ebenso wird in diesen Fällen durch die Lage der Quartile ein allgemein höheres Niveau der Konzentrationen indiziert. Die höchsten Konzentrationen wurden allerdings bei Einhaltung der Grenzwerte für die Indikatorbakterien gemessen.

Konzentrationen von *Aeromonas* spp. in Abhängigkeit der Indikatorbakterien

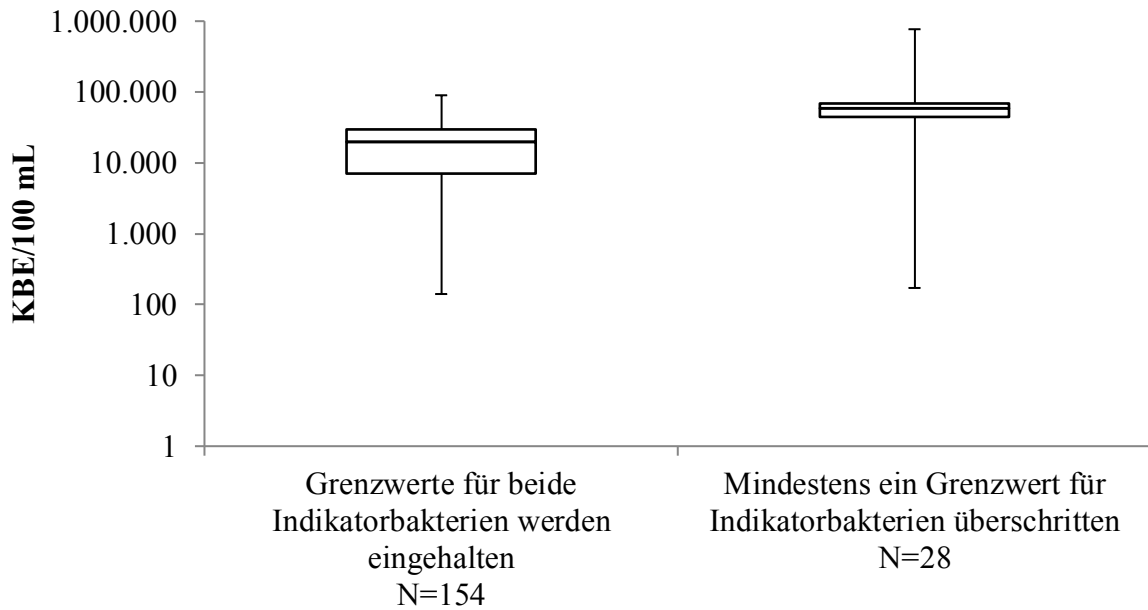


Abbildung 48 bis Abbildung 51: Verteilungen der untersuchten Pathogene (*Aeromonas* spp. in Abbildung 48, *Pseudomonas aeruginosa* in Abbildung 49, *Campylobacter* spp. in Abbildung 50 und *Salmonella enterica* in Abbildung 51) bei Probenahmen, als die Konzentrationen von *E. coli* und intestinalen Enterokokken unterhalb den Grenzen für ein kurzzeitiges Badeverbot lagen (links). Die rechte Verteilung bezieht sich auf Probenahmen, bei denen die Grenzwerte für *E. coli* von 1.800 MPN/100 mL und/oder intestinalen Enterokokken von 800 MPN/100 mL überschritten waren. Zusätzlich ist in Abbildung 49 bis Abbildung 51 die relative Nachweishäufigkeit der Zielorganismen oberhalb der Boxplot-Darstellungen angegeben.

Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa* in Abhängigkeit der Indikatorbakterien

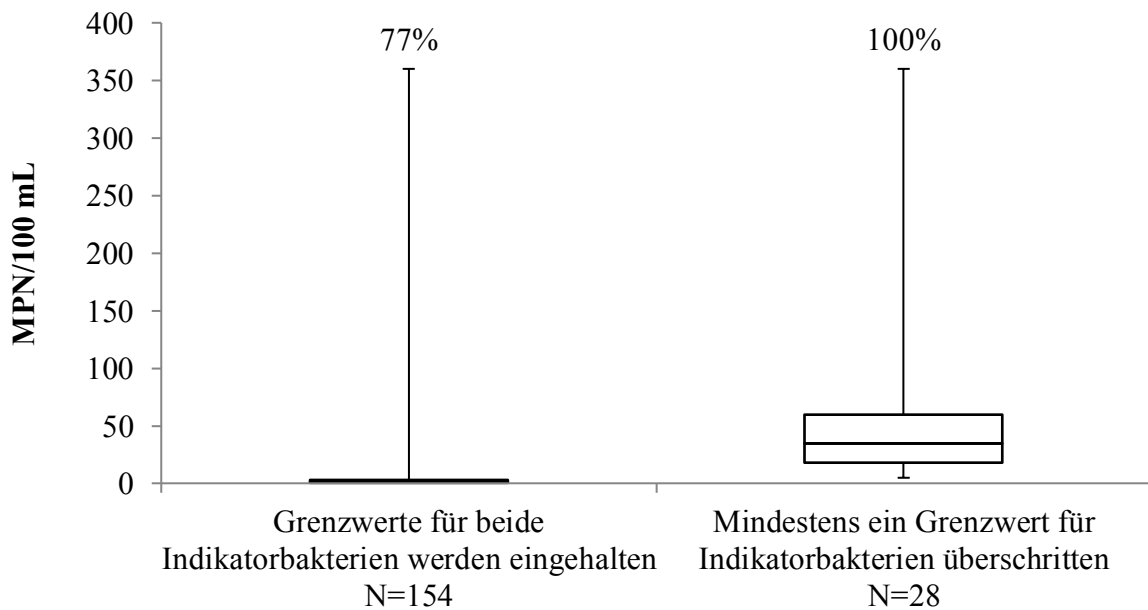


Abbildung 49

Konzentrationen von *Campylobacter* spp. in Abhängigkeit der Indikatorbakterien

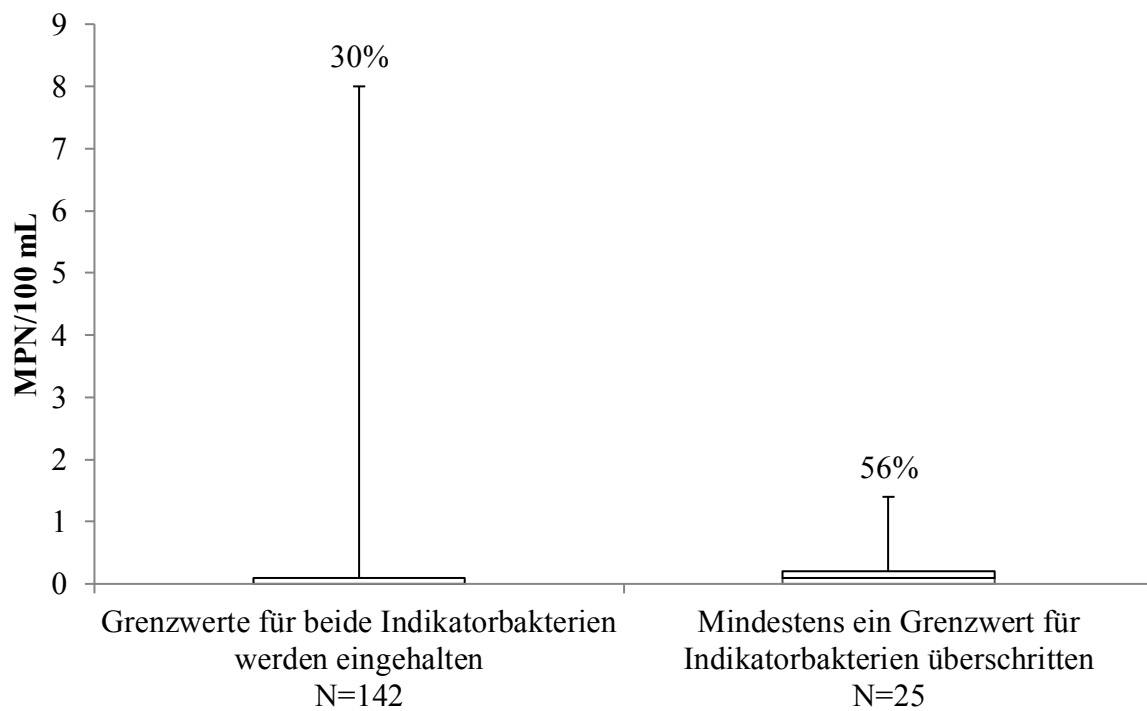


Abbildung 50

Konzentrationen von *Salmonella enterica* in Abhängigkeit der Indikatorbakterien

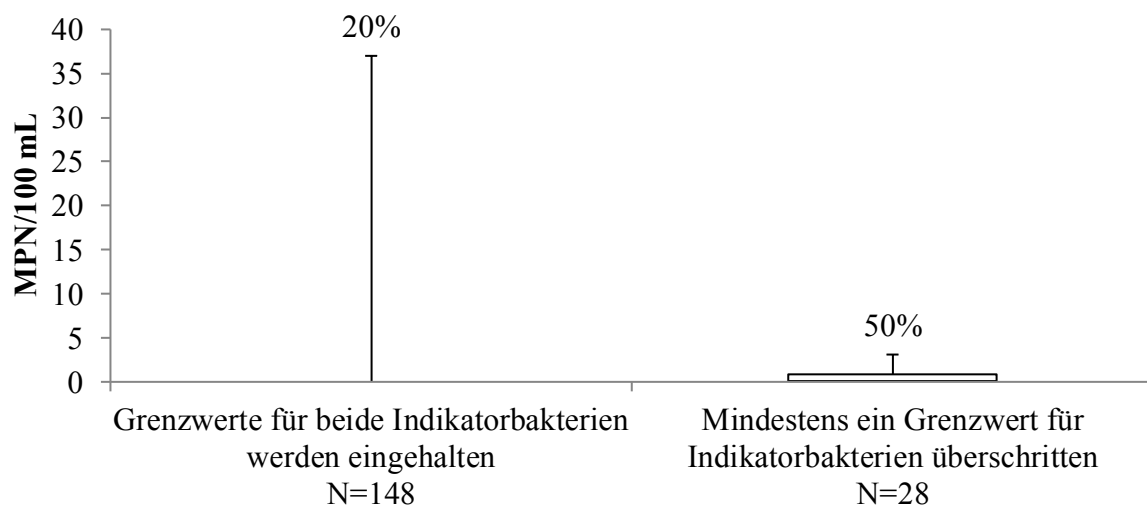


Abbildung 51

4.2.20. Elimination der Zielorganismen während der Trinkwasseraufbereitung

Da Oberflächenwasser häufig zur Aufbereitung von Trinkwasser genutzt werden, ist es sinnvoll das Abnahmeverhalten der Pathogene während dieses Prozesses zu kennen. Für die Analytik ist jedoch problematisch, dass die akzeptablen Konzentrationen für die Zielorganismen im Endprodukt selbstverständlich äußerst niedrig sind. Zusätzlich sind die Ausgangskonzentrationen bereits im Rohwasser sehr niedrig. Daher kann die Untersuchung der Aufbereitungsprozesse nur bei der Entnahme sehr großer Volumina in der gewünschten Ausführlichkeit erfolgen. Als gängige Methode wird die Probe dazu über eine Hohlfasermembran angereichert (Hill *et al.* 2007 a, b). Dies war jedoch bei den örtlichen Gegebenheiten der Probenahmestellen organisatorisch nicht durchführbar. Es wurden aber dennoch Proben ohne vorherige Anreicherung entnommen, um einen groben Überblick über die Reinigungsleistung der ersten Aufbereitungsstufen zu erlangen.

In orientierenden Probenahmen wurden die Zielorganismen (*Aeromonas* spp., *P. aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* und *Legionella* spp.) bereits nach dem ersten Reinigungsschritt der Langsandsandfiltration kulturell nicht mehr nachgewiesen. Auch die Indikatorbakterien waren spätestens nach dem zweiten Schritt der Aufbereitung kulturell nicht mehr nachweisbar. Allein bei *Aeromonas* spp. konnte in weiteren Beprobungen ein Nachweis und somit eine Bestimmung der Eliminationsleistung durch eine Erhöhung des Probevolumens erreicht werden (Abbildung 53). Ein Vergleich zu den allgemeinen mikrobiologischen Parametern findet sich in Abbildung 52.

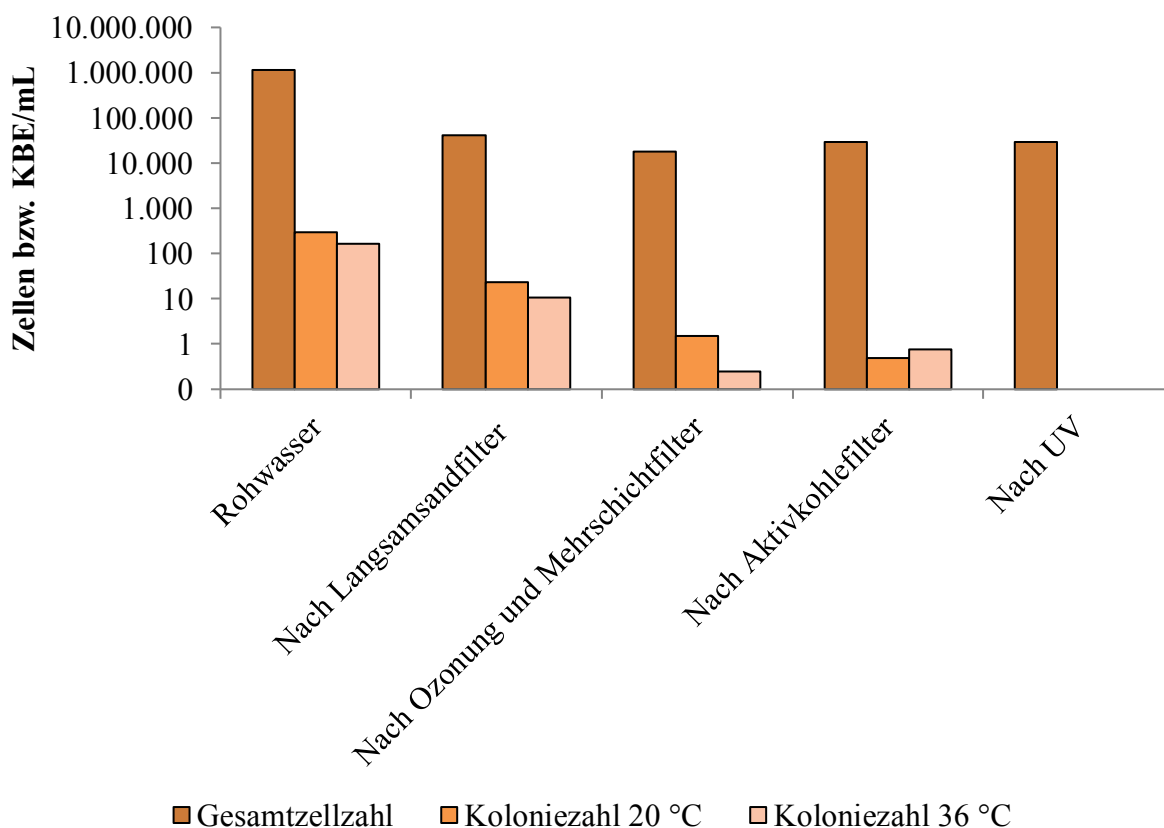


Abbildung 52: Konzentrationen verschiedener mikrobiologischer Parameter nach Durchlaufen einzelner Stufen der Wasseraufbereitung. Dabei sind die Werte gemittelt aus zwei Beprobungen. Die Reihenfolge entspricht dem Aufbereitungsprozess.

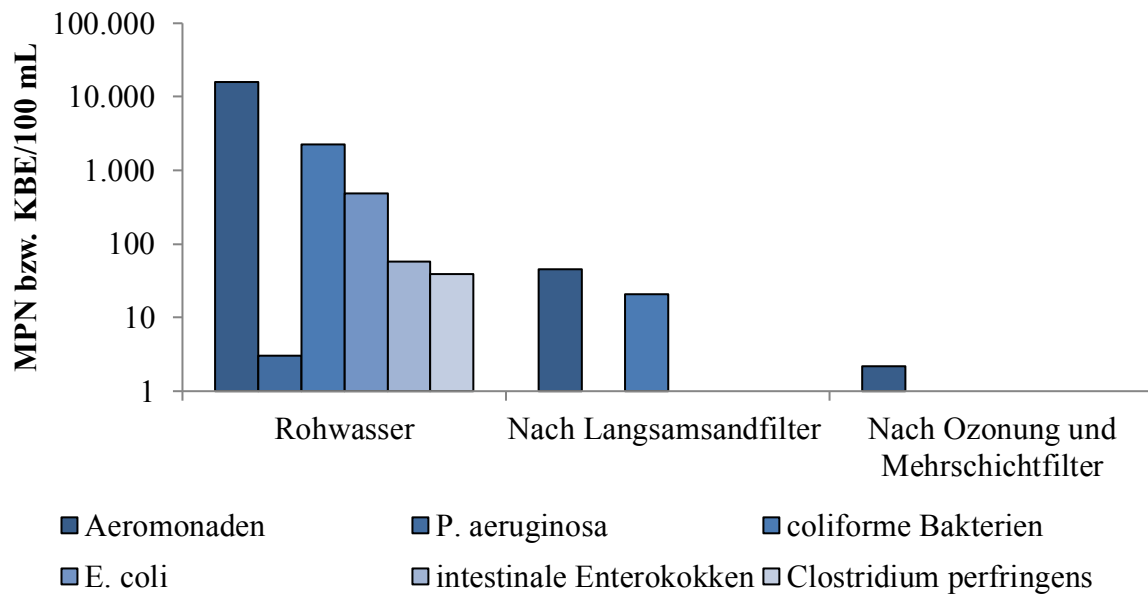


Abbildung 53: Konzentrationen einzelner Pathogene und Indikatorbakterien im Rohwasser, nach der ersten (Langsandsandfiltration) und dritten (Langsandsandfiltration, Ozonung, Mehrschichtfilter) Stufe der Trinkwasseraufbereitung.

Die Effizienz der Elimination bei der Langsandsandfiltration konnte für einige Parameter bestimmt werden; Sie werden in Tabelle 39 wiedergegeben.

Tabelle 39: Eliminationsleistung der ersten Aufbereitungsstufe eines Wasserwerks an der Ruhr für unterschiedliche mikrobielle Parameter und ausgewählte Zielorganismen.

Parameter	Eliminationsleistung Langsandsandfiltration in log-Stufen
Gesamtzellzahl	1,5
Koloniezahl 20 °C	1
Koloniezahl 36 °C	1
coliforme Bakterien	2
<i>E. coli</i>	> 2
Intestinale Enterokokken	> 1
<i>Aeromonas</i> spp.	2-3

4.3. Neue Monitoringstrategien für Oberflächengewässer

Die traditionellen kulturbasierten Nachweismethoden haben gemeinsam, dass sie zum einen mit einem hohen Arbeits- und Materialaufwand verbunden sind, zum anderen kann bei ihrer Anwendung unter Umständen aufgrund der erforderlichen Inkubationszeiten nicht schnell genug auf ein Kontaminationsereignis reagiert werden. Daher werden verstärkt Verfahren erprobt, die innerhalb kurzer Zeit einen verlässlichen Überblick über die hygienische Situation geben sollen.

4.3.1. Erfassung von Indikatorbakterien mittels quantitativer PCR

Um eine Quantifizierung der Bakterien im Oberflächenwasser durchzuführen, musste die Wasserprobe zunächst angereichert und DNA isoliert werden. Dazu wurde - wie für die in 4.1.5.2 beschriebenen Untersuchungen - das Aquadien™-Kit der Firma Bio-Rad benutzt. In Vorversuchen wurde DNA aus einer Reinkultur *Enterococcus faecalis* 19433 mit bekannter Konzentration (Gesamtzellzahl) isoliert. Die spektrometrisch bestimmte Konzentration der DNA-Probe wurde anschließend mit der erwarteten Konzentration unter der Annahme einer Menge von einem Genom pro Zelle verglichen. Das Zielgen, das die 23S rRNA codiert, ist dabei insgesamt viermal im Genom von *Enterococcus faecalis* vorhanden. Dabei zeigte sich nur eine Ausbeute der DNA-Isolation von durchschnittlich 14 %.

Die aus Oberflächenwasser gewonnenen DNA-Proben wurden unverdünnt und in unterschiedlichen dezimalen Verdünnungen gemessen. Die Standards zur Quantifizierung wurden dazu aus Reinkulturen von *Enterococcus faecalis* 19433 gewonnen. Bei einer Vielzahl der Proben konnten Inhibitionseffekte festgestellt werden. Daher wurden die Werte der ersten dezimalen Verdünnung zur Berechnung herangezogen. Hier konnten die in Abbildung 54 und Abbildung 55 Konzentrationsverläufe ermittelt werden. Diese ähneln besonders bei der Probenahmestelle Seaside Beach tendenziell den Ergebnissen der kulturabhängigen Nachweismethode. Die Konzentrationen sind jedoch bis zu 2 log-Stufen höher als bei diesem Verfahren. Berücksichtigt man die niedrige Ausbeute bei der DNA-Extraktion, so ist von einer um insgesamt 3 log-Stufen höheren Konzentration auszugehen.

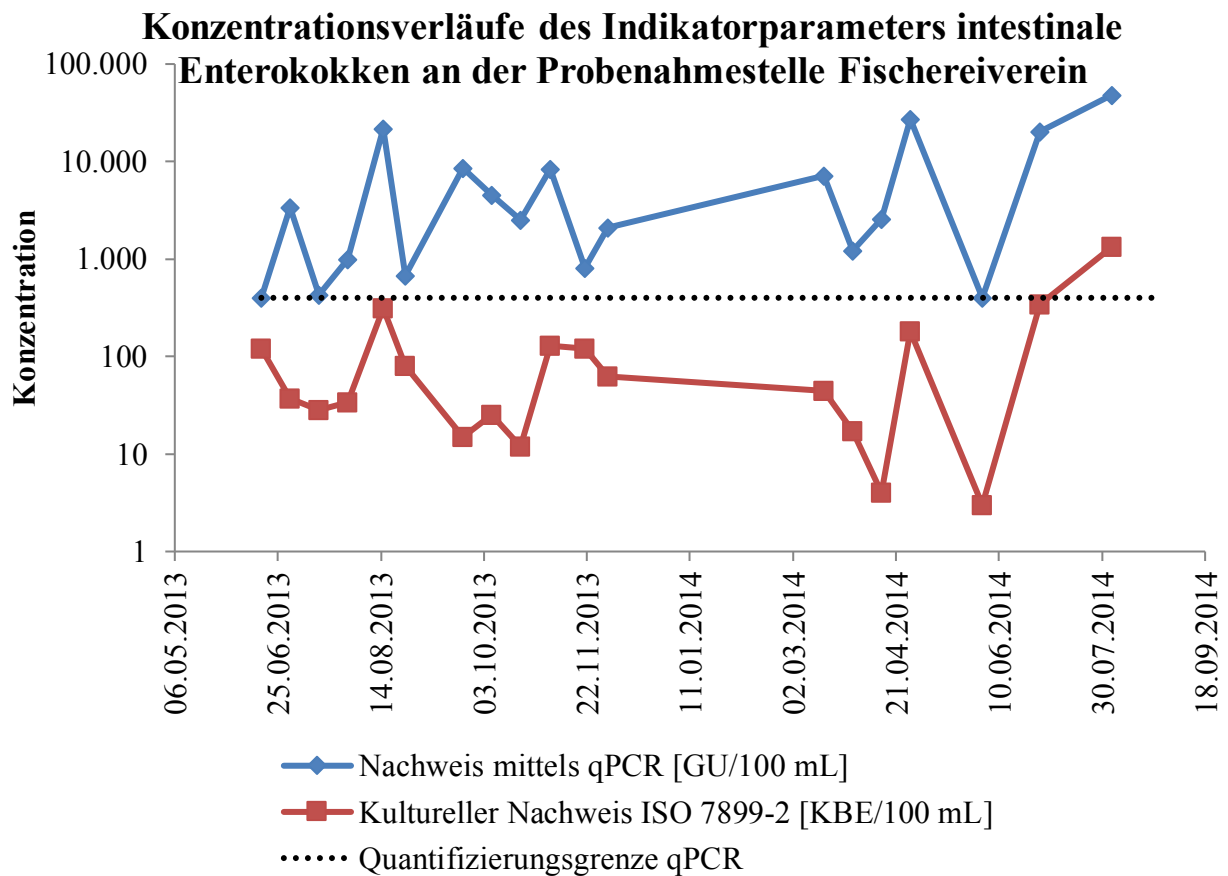


Abbildung 54: Konzentrationsverläufe von *Enterococcus faecalis* (qPCR basiert) und intestinalen Enterokokken (kulturell bestimmt nach der genormten Methode DIN EN ISO 7899-2:2000) an der Probenahmestelle Fischereiverrein.

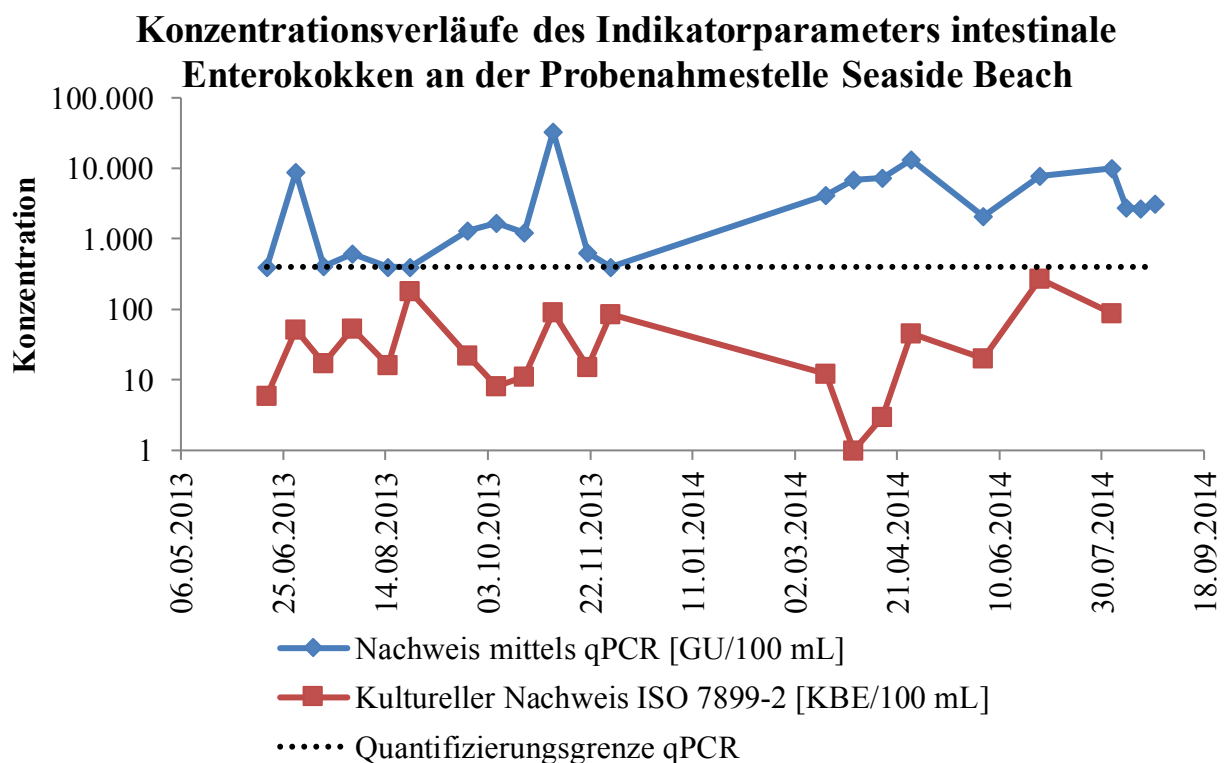


Abbildung 55: Konzentrationsverläufe von *Enterococcus faecalis* (qPCR basiert) und intestinalen Enterokokken (kulturell bestimmt nach der genormten Methode DIN EN ISO 7899-2:2000) an der Probenahmestelle Seaside Beach.

Es zeigte sich eine positive Assoziation der kulturell und mittels qPCR ermittelten Konzentrationen an intestinalen Enterokokken (Abbildung 56). Mittels linearer Regressionsanalyse wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,6 für diese Assoziation ermittelt. Insofern scheinen zwar generelle Trends von beiden Methoden abgebildet zu werden, jedoch kann kein Konzept abgeleitet werden, wie die höheren Konzentrationen zu bewerten sind. Da aufgrund der Inhibition nur verdünnte DNA-Proben zur Berechnung berücksichtigt wurden, liegt die Quantifizierungsgrenze zusätzlich sehr hoch.

Lineare Regressionsanalyse der mittels qPCR und DIN EN ISO 7899-2:2000 gemessenen Konzentrationen von Enterokokken

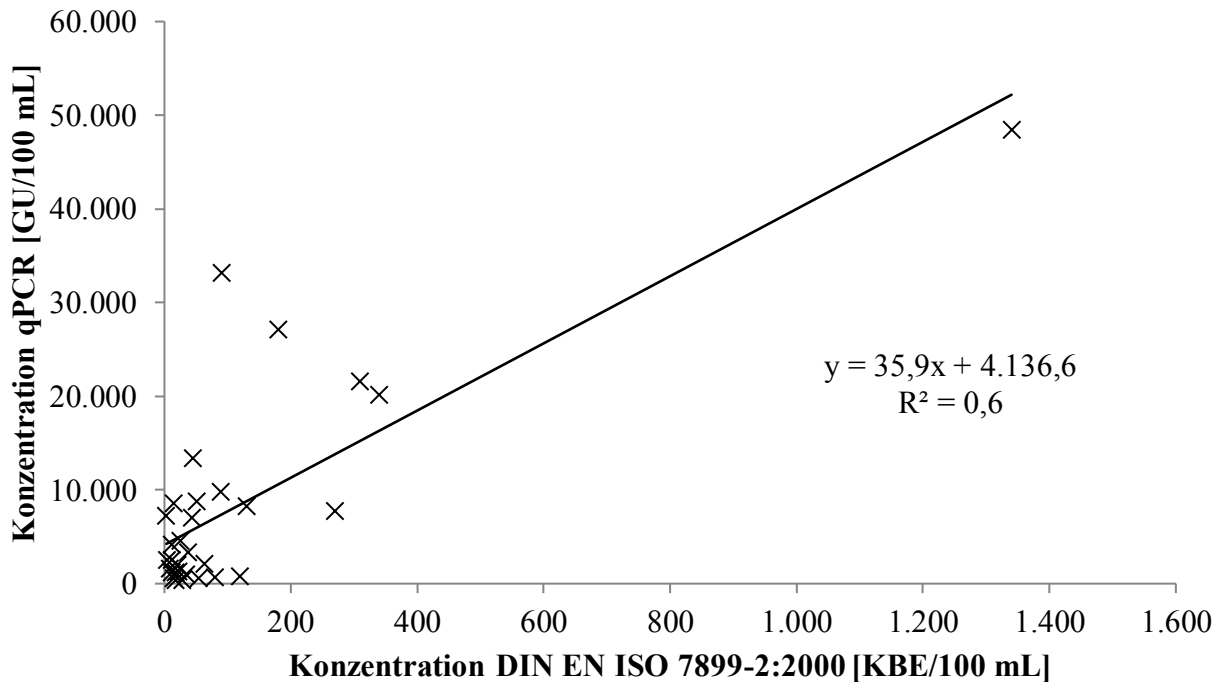


Abbildung 56: Lineare Regressionsanalyse der Konzentrationen von intestinalen Enterokokken, die durch eine kulturabhängige Methode nach DIN EN ISO 7899-2:2000 und die kulturunabhängige Methode (qPCR) derselben Proben bestimmt wurden.

Ähnliches zeigt sich bei einer Quantifizierung von *E. coli* mittels qPCR. Untersuchungen hierzu wurden durch das IWW Zentrum Wasser durchgeführt. Es wurden dabei zwei unterschiedliche PCR-basierte Methoden verwendet, die untereinander eine gute Korrelation aufwiesen. Es konnte allerdings bei keiner der beiden Methoden ein eindeutiger Zusammenhang zu den Ergebnissen des kulturabhängigen Nachweises hergestellt werden (Abschlussbericht Sichere Ruhr, 2015)

4.3.2. Semikontinuierliche Messung von *E. coli* und coliformen Bakterien mit dem Coliguard® Messgerät

Neben dem kulturunabhängigen Nachweis von *E. coli* per qPCR wurde auch das semikontinuierliche Messgerät Coliguard® der Firma mbOnline für den Einsatz im Oberflächenwasser überprüft. Die Quantifizierung erfolgte bei diesem über die spektrometrische Erfassung der β -Galaktosidaseaktivität (coliforme Bakterien) beziehungsweise der β -D-Glukuronidaseaktivität (*E. coli*). Dabei soll auch ein Teil der Zellen erfasst werden, die vorübergehend kulturell nicht nachweisbar sind.

Im Untersuchungszeitraum wurden je ein Messgerät an der Probenahmestelle Fischereiverein und ein Messgerät an der Probenahmestelle Seaside Beach installiert. Der Konzentrationsermittlung lag dazu eine voreingestellte Kalibration des Herstellers zugrunde. Die erhaltenen Daten wiesen weder eine

gute Korrelation zu den mit kulturabhängigen Methoden ermittelten Konzentrationen auf, noch konnte ein Zusammenhang zu den mittels qPCR ermittelten Werten festgestellt werden.

5. Diskussion

5.1. Nachweismethoden hygienisch relevanter Bakterien in Oberflächengewässern

Um bakterielle Pathogene nachweisen zu können, werden die Zielorganismen bei den klassischen kulturellen Methoden in einem oder mehreren Schritten angereichert und anschließend anhand phänotypischer Eigenschaften identifiziert. Gerade bei der Untersuchung von Oberflächengewässern ergeben sich Besonderheiten, die beginnend bei der Wahl des geeigneten Verfahrens über die Auswertung bis hin zur Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Die Zielorganismen machen hier oft nur einen kleinen Anteil der Gesamtpopulation aus. Daher müssen Selektivnährmedien verwendet werden, die ihnen ein möglichst gutes Wachstum ermöglichen, aber das der Begleitflora gleichzeitig unterdrücken. Im Trinkwasserbereich gibt es für einige Organismen genormte Verfahren, die jedoch wegen der komplexeren Probenmatrix und des Gesamtbakteriengehaltes nicht uneingeschränkt auf Oberflächenwasser übertragen werden können.

5.1.1. Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwasser

Zum Nachweis von *Aeromonas* spp. existieren in Deutschland keine genormten Methoden. Ein häufig gebräuchliches Verfahren ist durch Havelaar *et al.* (1987) beschrieben und wurde international auch von einigen offiziellen Stellen zum Beispiel der US EPA in Form der Methode 1605 anerkannt und in eigenen Vorschriften mit kleineren Anpassungen umgesetzt (US EPA 2001). Für den Nachweis wird eine Membranfiltration durchgeführt und der Filter auf Ampicillin-Dextrin-Agar (ADA) aufgelegt. Je nach Ansatzvolumen kann aber auch ein Direktansatz erfolgen. Bei Verwendung dieses Selektivmediums können *Aeromonas* spp. durch die Vergärung von Dextrin nachgewiesen werden. Der damit einhergehende Abfall des pH-Wertes wird aufgrund des eingesetzten Indikators Bromthymolblau durch eine gelbe Färbung der Kolonien auf dem ansonsten blau-grünen Nährmediums sichtbar. Zur Hemmung der Begleitflora ist dem Medium Ampicillin zugesetzt.

Bei der Umsetzung der Methode für Ruhrwasser war die Auswertung durch das Auftreten verschiedener Kolonietypen, bei denen die Intensität der Gelbfärbung unterschiedlich war, erschwert. Dabei kristallisierten sich neben transparenten, nicht gefärbten Kolonien, die eindeutig als negativ eingestuft werden konnten, vier weitere Kolonietypen heraus, die präsumtiv als *Aeromonas* spp. bewertet wurden. Die präsumtiven Kolonien der verschiedenen Typen wurden mit den in der Methode 1605 der US EPA empfohlenen Bestätigungsreaktionen – dem Oxidase-Test sowie der Fähigkeit zur Vergärung von Trehalose und der Bildung von Indol – überprüft. Der Oxidase-Test war dabei mit 98 % fast immer positiv. Auch eine Trehalose-Vergärung konnte bei einem ähnlich hohen Anteil (95 %) der überprüften Isolate fast immer nachgewiesen werden. Zur Bildung von Indol hingegen waren mit 83 % nur etwas weniger Isolate fähig. Der Anteil der Isolate, bei denen alle drei Bestätigungsreaktionen positiv waren, lag hier bei 82 %. Nicht alle Kolonietypen wurden gleich häufig mittels dieser drei Reaktionen bestätigt, jedoch lag die Rate immer bei über 50 %. Das entscheidende Ausschlusskriterium war meist durchgängig die fehlende Indol-Bildung.

Parallel wurden sowohl als negativ und positiv gewertete Isolate biochemisch mittels API[®] 20 NE-Testsystem und auf molekularbiologischer Ebene mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) identifiziert. Mit diesen Methoden konnten auch einige Indol-negative Isolate als *Aeromonas* spp. bestätigt werden. Hierbei ergab sich gemessen an der Identifizierung mittels API[®] 20 NE ein Anteil von falsch-positiven Kolonien von höchstens 10 % und falsch-negativen Kolonien von höchstens 13 %. Bezöge man die Resultate aus der molekularbiologischen Identifizierung mit ein, würden diese Anteile noch etwas geringer ausfallen. Bedingt ist dies dadurch, dass mit dieser Methode stichprobenartig einige Isolate trotz abweichender biochemischer Identifizierung entsprechend der Auswertung nach vorhandener gelber Färbung bestätigt wurden. Deckten sich die visuelle Auswertung

der Kolonie bei der Primärkultur und die Identifizierung mittels API® 20 NE, konnten sogar alle untersuchten Isolate auch mittels FISH bestätigt werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass nicht alle *Aeromonas*-Stämme zur Bildung von Indol fähig sind (US EPA 2006), was niedrigere Bestätigungsraten für einzelne Kolonietypen und abweichende Identifizierungsergebnisse mittels API® 20 NE und FISH erklären könnte. Bei einer Verwendung der Methode ist es daher sinnvoll eine alternative Bestätigung in Betracht zu ziehen. Im Allgemeinen ist die Methode zur Anwendung bei vergleichbaren Oberflächenwässern gut geeignet, da die Rate der falsch-positiven und falsch-negativen Isolate in einem vergleichbaren niedrigen Prozentbereich lag. Zusätzlich haben *Aeromonaden* bei allen Wasserproben einen so hohen Anteil an der Gesamtbakterienkonzentration im Ruhrwasser, dass ein Überwachsen von Ansätzen durch die Begleitflora im Allgemeinen kein Problem darstellt. Die Wiederfindung konnte durch Variationen bei der Inkubationszeit und -temperatur nicht verbessert werden, sodass eine Bebrütung für 20 h bei 30 °C beibehalten wurde. Ähnliche Bedingungen werden ebenfalls durch Villari *et al.* (1999) mit 24 h vorgeschlagen. Auch wird dem Medium ADA in der Literatur die günstigste Produktivität eingeräumt (Handfield *et al.* 1996; Villari *et al.* 1999). Die von der US EPA veröffentlichte Methode enthält einen Hinweis, dass die Analyse durch Enterokokken, die auf Ampicillin-Dextrin-Agar Stecknadelkopfgröße gelbe Kolonien bilden, gestört werden kann (US EPA 2006). Dieses Problem ist bei den untersuchten Probenarten nicht aufgetreten, was daraus abgeleitet werden kann, dass so gut wie alle Isolate sich als Oxidase-positiv erwiesen haben.

Eine Identifizierung mit den kommerziellen biochemischen Identifizierungssystemen API® 20 E und API® 32 GN sowie Vitek ist aufgrund veralteter Datenbanken und Taxonomien sowie ungünstigen Algorithmen und empfohlenen zusätzlichen Tests umstritten. Eine Folge daraus kann z. B. eine Fehlidentifizierung als Vibrionaceae sein (Abbott *et al.* 1998; Lamy *et al.* 2010). Für Identifizierungen mittels MALDI-ToF-MS gibt es Untersuchungen, bei denen sich die Methode als geeignet herausstellte (Lamy *et al.* 2011). Bei neubeschriebenen Spezies besteht jedoch die Gefahr einer falschen Zuordnung (Vávrová *et al.* 2014), sodass das Ergebnis mit einer zweiten Methode abgesichert werden sollte.

5.1.2. Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* in Oberflächenwasser

Die Analytik von *Pseudomonas aeruginosa* erwies sich durch die niedrigeren Konzentrationen dieses Organismus im Ruhrwasser und dem damit verbundene Problem des Überwachsens durch die Begleitflora als anspruchsvoller. Bei der Wahl der Methode bietet sich zwar die genormte Membranfiltrationsmethode DIN EN ISO 16266:2008-05 an, welche auch vom Umweltbundesamt für ähnliche Matrices empfohlen wird (UBA 2009). Im Anwendungsbereich ist jedoch nur Wasser mit niedriger Begleitflora vorgesehen (DIN EN ISO 16266:2008-05, S. 5). Die Auswertung der Ruhrwasser-Ansätze auf CN-Agar ist bei dem Untersuchungsvolumen von 100 mL meist durch einen konfluenten Bewuchs des Membranfilters erschwert. Diese Problematik ist weitreichend bekannt, sodass es Empfehlungen auch von offizieller Seite gibt, bei Untersuchungen von Badeteichen, fluoreszierende Kolonien nicht, wie in dieser Methode eigentlich vorgeschrieben, weiter zu untersuchen. Begründet wird dies mit der hohen Anzahl an fluoreszierenden Kolonien und der niedrigen Bestätigungsrate dieses Kolonietyps. Ähnliches zeigte sich auch in ersten orientierenden Untersuchungen. Daher wurden im weiteren Verlauf in Einklang mit der Empfehlung des Umweltbundesamtes bei Verwendung dieser Untersuchungsmethode nur die grün gefärbten Kolonien als *P. aeruginosa* gezählt (UBA 2009).

Die mittels DIN EN ISO 16266:2008-05 ermittelten Konzentrationen stimmten insgesamt gut mit der ehemals gültigen Norm DIN 38411-8:1982 überein. Bei dieser nicht mehr standardmäßig verwendeten Methode erfolgt der Nachweis von *P. aeruginosa* über eine Flüssiganreicherung mit einer Reihe anschließender Bestätigungstests der Subkulturen. Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, wurde die Probe auf verschiedene Ansätze aufgeteilt und mit Hilfe eines MPN-Kalkulators

ausgewertet. Der Anwendungsbereich der Norm DIN 38411-8:1982 schließt zudem auch Wässer mit höherer Begleitflora mit ein. Zu beachten ist jedoch, dass durch die große Anzahl von Ansätzen, bei denen im Anschluss Subkulturen bestätigt werden müssen, ein hoher Bedarf an Nährmedien und Verbrauchsmaterial besteht und auch die Bearbeitungszeit länger ist. Daher ist dieses Verfahren auch nur bedingt für eine routinemäßige Überwachung von Badegewässern geeignet. Bei den Bestätigungsreaktionen dieser Methode traten gehäuft apyocyanogene Umweltisolate ohne die charakteristische grüne Färbung auf, was zusätzliche Tests nötig machte. Bei einer Untersuchung zur Verteilung von *P. aeruginosa* in Flusswasser von Pellett *et al.* 1983 zeigten ebenfalls nur etwa 45 % der Isolate eine typische blau-grüne Pigmentierung beim Wuchs auf Nährmedien. Dies zeigt einen möglichen Schwachpunkt bei der Anwendung dieses Identifizierungskriteriums beim Nachweis im Oberflächengewässer auf. Diese Erschwernis bei der Untersuchung nach DIN 38411-8:1982 ist nicht ohne weiteres auf das Verfahren nach DIN EN ISO 16266:2008-05 übertragbar. Ein Punkt ist, dass Pigmentbildung mit unterschiedlichen Medien untersucht wird, zum anderen waren die ermittelten Konzentrationen ähnlich hoch. Eine mögliche Untererfassung durch eine fehlende Pyocyaninbildung wird auch in der Empfehlung des Umweltbundesamtes auf höchstens 10% geschätzt.

Als Alternative zu diesen etablierten Methoden wurden noch zwei neu entwickelte Verfahren getestet, die beide auf einem Nachweis von für *P. aeruginosa* spezifischen Enzymen basieren und ohne weitere Bestätigungsreaktionen anwendbar sein sollen. Zum einen war dies das MPN-System Pseudalert® der Firma IDEXX. Hierbei wird ein fluorogenes Substrat eingesetzt, und die Wasserprobe in einen versiegelbaren Folienträger mit unterschiedlichen Vertiefungen gegeben. Daraus erfolgt, analog zu anderen Testsystemen dieses Herstellers, eine Aufteilung in Teilproben. Die Konzentration ergibt sich aus der Anzahl der *P. aeruginosa*-positiven blau fluoreszierenden Vertiefungen. Bei der Anwendung auf Oberflächengewässer konnte keine eindeutige Einteilung in positive und negative Ansätze erfolgen, da unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zu beobachten waren, die sich zusätzlich auch schlecht von einer Hintergrundfluoreszenz der Probe abgrenzen ließen. Es kam häufig dazu, dass sich *P. aeruginosa* kulturell nicht in positiv bewerteten Ansätzen nachweisen ließ, unabhängig davon, ob die Fluoreszenz sich hierbei deutlich oder weniger deutlich vom Hintergrund abhob. Im Vergleich zu den genormten Methoden wurden auch häufig höhere Konzentrationen abgeleitet. Es besteht aber ebenfalls die Gefahr von falsch-negativen Befunden, da der Zielorganismus sowohl bei nativen Wasserproben in negativ bewerteten Vertiefungen nachgewiesen wurde als auch Zellsuspensionen des Referenzstamms. Zusammengefasst lässt sich dazu sagen, dass die Methode in der derzeit vorliegenden Form nicht zur Anwendung auf Flusswasser, wie das der Ruhr anwendbar ist. Auch eine weitere Methode, die *P. aeruginosa* mittels Membranfiltration und einem von der Firma Bio-Rad entwickelten Selektivagar quantifizieren soll, erwies sich als ungeeignet. Dieser soll den Vorteil bieten, dass ein Nachweis innerhalb von 22-30 h möglich ist und Kolonien anhand einer blauen Enzymreaktion direkt bestätigt werden. Im vom Hersteller angegebenen Anwendungsbereich sind dabei natürliche Gewässer genannt (Technical Sheet, Bio-Rad 2014). Bei der Testung dieses Mediums konnten zwar präsumptive blaue-grüne Kolonien gegenüber der Begleitflora abgegrenzt werden, es war jedoch stets eine hohe Gesamtkoloniezahl vorhanden. Bei der Auswertung ergaben sich keine gute Korrelation der Ergebnisse mit denen der genormten Methoden und hohe Raten von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Insgesamt scheint daher derzeit für diesen Probentyp keine kulturabhängige Methode für einen quantitativen Nachweis mit einer Bearbeitungszeit unter zwei Tagen zur Verfügung zu stehen.

5.1.3. Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Oberflächenwasser

Ein kultureller Nachweis thermotoleranter *Campylobacter* spp. benötigt eine lange Bearbeitungszeit mit vielen Arbeitsschritten, insbesondere aufgrund des mikroaerophilen Charakters sowie der notwendigen Bestätigungstests. Dabei werden bereits für einen negativen Befund vier Tage benötigt. Sind Subkulturen zu bestätigen, dauert der Nachweis entsprechend länger (Pitkänen 2013). Zu einer

besseren Abgrenzung gegenüber der Begleitflora wurden chromogene Medien entwickelt, die von verschiedenen Herstellern angeboten werden und den Aufwand verkürzen sollen (Le Bars *et al.* 2011). Diese wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Zu viel Feuchtigkeit auf Nährmedienplatten bewirkt ein Schwärmen der *Campylobacter*-kolonien und verhindert das Auszählen (Vereen *et al.* 2007). Im Gegensatz zur einfachen Membranfiltration, bei der die auf dem Filter erhaltenen Kolonien sich ausbreiten und ineinander verlaufen, hat sich eine MPN-Methode mit einer Voranreicherung in einem Flüssigmedium und dem anschließenden Ausstrich auf einem Agarmedium zur Quantifizierung bewährt (Bolton *et al.* 1982). Blaser und Cody (1986) schlagen anstelle einer Voranreicherung in Bouillon eine Methode für klare Wässer mit wenig Begleitflora vor, bei der im Anschluss an eine Membranfiltration der Filter mit der Oberseite nach unten auf den Agar gelegt wird, wodurch die Nachweisrate deutlich erhöht werden soll. Bei einer stärkeren Trübung oder Begleitflora wird jedoch vorab ein zusätzlicher Filtrationsschritt nötig, was sich wiederum negativ auf die Sensitivität der Nachweismethode auswirken könnte. In der genormten Methode ISO 17995:2005 ist eine Flüssiganreicherung mit Verwendung der weniger selektiven Bolton-Bouillon und der stärker selektiven Preston-Bouillon vorgeschrieben, dies hat sich in Versuchen von Bolton *et al.* (1983) und Merino *et al.* (1986) als Methode mit der höchsten Wiederfindung erwiesen. Kim *et al.* (2009) haben ebenfalls bei einem Vergleich die Preston-Bouillon als eines der Medien mit den besten Wiederfindungsraten ermittelt. Der originalen Zusammensetzung der Preston-Bouillon wurden zusätzlich Natriumpyruvat, Natriumdisulfit und Eisen(II)-sulfat als Quencher für toxische Sauerstoffspezies zugesetzt (Bolton *et al.* 1984). Für den Nachweis im Ruhrwasser wurde die genormte Methode ISO 17995:2005 als MPN-Verfahren umgesetzt.

Lévesque *et al.* (2011) haben in mehreren Versuchsreihen eine Optimierung der Methode angestrebt. Es zeigte sich ein kleinerer Volumenanteil der Anreicherungsbouillon am Gesamtvolumen des Ansatzes die Nachweisrate erhöht. Ein längerer Inkubationszeitraum der Voranreicherung trägt nur sehr leicht zur Verbesserung der Nachweisrate bei. Ein zweiter Voranreicherungsschritt vor dem Ausstreichen der Bouillon auf einem geeigneten Selektivnährboden hatte keine positive Auswirkung auf die Nachweisrate. Diese Faktoren sind bei der Wahl der verwendeten Methode bereits berücksichtigt worden.

In orientierenden Versuchen wurde keine Verbesserung der Wiederfindung durch die zusätzliche Verwendung der Bolton-Bouillon erzielt. Daher wurde eine alleinige Nutzung der Preston-Bouillon zum Nachweis beibehalten. In der Fachliteratur findet man alternativ auch eine modifizierte Inkubation der Bolton-Bouillon bei höheren Inkubationstemperaturen und kürzeren Zeiträumen (Jokinen *et al.* 2010). Die Erhöhung der Inkubationstemperatur wirkt sich jedoch negativ aus, wenn die Zellen vorgeschädigt sind (Humphrey 1989). Diergaardt *et al.* (2004) konnten deutlich bessere Wiederfindungsraten mit der Verwendung von Bolton- statt Preston-Bouillon und einer verkürzten Inkubation der Voranreicherung auf 24 h erreichen; bei einer weiteren Identifizierung der Isolate mittels 16 S rRNA Sequenz ergab sich jedoch eine Zuordnung der überwiegenden Mehrheit der Isolate zum Genus *Arcobacter*, trotz ausschließlich fehlenden aeroben Wachstums der Isolate. In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konnten im Gegensatz dazu fast alle Isolate zusätzlich molekularbiologisch mittels FISH bestätigt werden, daher ist die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Befunden in dieser Arbeit als gering einzustufen.

Zum Einsatz von Hemmstoffen lässt sich allgemein feststellen, dass diese durch zunehmende Resistenzen in den letzten Jahren weniger effektiv bei der Reduktion der Begleitflora geworden sind (Ahmed 2009 wie zitiert in WHO 2012). Zudem werden vorgeschädigte, sensitive *Campylobacter*-Zellen eventuell in Ihrem Wachstum durch Selektivsupplemente geschädigt. Deshalb sind verzögerte Zugaben von Antibiotikazugaben zu diesem Zweck beschrieben (Corry *et al.* 1995).

Häufig wird bei der Untersuchung großer Volumina von einer schlechten Wiederfindung durch eine Hemmung durch die Begleitflora berichtet (Fricker 1987; Abulreesh *et al.* 2005). Da innerhalb des MPN-Ansatzes auch große Volumina untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass es auch bei

diesen Untersuchungen an der Ruhr zu einer Untererfassung gekommen ist. Stichprobenartig konnten in dieser Arbeit mit der kulturunabhängigen Methode FISH Zellen nachgewiesen werden, obwohl der Zielorganismus nicht aus den entsprechenden Proben isoliert werden konnte. Diese Problematik ist für *Campylobacter* spp. häufig beschrieben. Bedingt ist dies vor allem dadurch, dass *Campylobacter* spp. bei ungünstigen Bedingungen in den VBNC-Zustand übergehen können (Pitkänen 2013). Von einer Untererfassung wird auch bei der Untersuchung von Sedimenten und Biofilmen berichtet. Bedingt ist dies durch antagonistische Effekte, die von reichhaltigen Begleitflora ausgehen (Abulreesh *et al.* 2005).

Als Medium für die Subkultivierung wird in der Regel modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate-Agar (mCCDA) eingesetzt. Ein direkter Ansatz von Wasser- oder Sediment-beziehungsweise Biofilmproben auf diesem Medium ist aufgrund vieler falsch-positiver Ergebnisse und der in Oberflächenwasser in hohen Konzentrationen vorhandenen Begleitflora nicht zielführend (Diergaardt *et al.* 2003). Zur Steigerung der Selektivität wurde ein Wandern durch einen Filter als zusätzlicher Verbesserungsschritt von einigen Autoren bei der Untersuchung belasteter Wässer verwendet (Diergaardt *et al.* 2004; Rechenburg und Kistemann 2009). Da sich jedoch bei den Ruhr-Isolaten eine sehr hohe Bestätigungsrate ergab, wurde auf diesen Schritt verzichtet.

Eine Identifizierung der Isolate konnte mit Hilfe des API[®] Campy-Testsystems zwar bis auf Speziesebene erreicht werden. Zum Hybridisierungsergebnis mit der FISH-Sonde Cajej ergaben sich jedoch einige Abweichungen. Im mikroskopischen Bild waren einige Zellen positiv, was einer Zuordnung zu *Campylobacter jejuni* entspricht, obwohl das Identifizierungsergebnis mittels API[®] Campy *Campylobacter coli* ergab. Nach detaillierteren Studien von Huysmans *et al.* (1995) stellt das API[®] Campy-System keinen Mehrwert gegenüber einer konventionellen Identifizierung dar. Die Anwendung der matrix-assisted desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) soll demgegenüber sehr schnelle und sichere Ergebnisse liefern (Martiny *et al.* 2011).

Für den Nachweis von *Campylobacter* spp. werden laufend neue kulturunabhängige PCR-basierte Nachweismethoden entwickelt. Diese bieten zwar den Vorteil einer kurzen Analysenzeit, sind jedoch durch Limitationen bei der Probenaufbereitung begrenzt. Bedingt ist dies durch den geringen Anteil der Zielorganismen an der Gesamtpopulation der Mikroorganismen und den damit verbundenen hohen Nachweisgrenzen (Moore *et al.* 2005). Aus diesem Grund werden häufig auch PCR-basierte Bestätigungsmethoden für einen qualitativen Nachweis kombiniert mit kulturellen Voranreicherungsverfahren eingesetzt. Ebenfalls vielversprechend sind neue Nachweis- und Identifizierungsmethoden wie die isothermale PCR und High-Throughput Sequencing, die immer erschwinglicher werden und zukünftig so für den Nachweis von *Campylobacter* eine Alternative darstellen könnten (Pitkänen 2013).

5.1.4. Nachweis von Salmonellen in Oberflächenwasser

Ähnliche Probleme wie bei *Campylobacter* spp. durch das Überladen der Flüssiganreicherung mit belasteten Proben sind auch für den Nachweis von *Salmonella* spp. beschrieben. Madsen (1994) berichtet von höheren Konzentrationen von Salmonellen bei direktem Ausplattieren auf XLD von Teichwasser, wobei der Effekt nur bei Umweltproben und nicht bei Laborstämmen gezeigt werden konnte. Der zusätzliche Schritt einer Voranreicherung in Peptonwasser zur Wiederbelebung geschädigter Zellen hatte in orientierenden Versuchen keine Verbesserung seitens der Wiederfindung bewirkt. Daher wurde auf diesen verzichtet, um ein Überwachsen durch die Begleitflora zu vermeiden. In der Fachliteratur sind verbesserte Wiederfindungsraten von etwa 25 % durch eine Voranreicherung beschrieben, sodass bei der in dieser Arbeit angewendeten Methode eventuell mit einer leichten Untererfassung gerechnet werden muss (Thomason *et al.* 1977). Gleichzeitig wurden bei einer Identifizierung der Isolate mit dem API[®] 20 E vereinzelt falsch-positive Befunde ermittelt.

Allgemein kann man die Probleme der kulturellen Nachweismethoden wie folgt zusammenfassen. Es besteht die Gefahr einer Untererfassung durch ein Überwachsen durch die Begleitflora, Hemmstoffe in

der Probenmatrix oder eine fehlende Kultivierbarkeit der Mikroorganismen aufgrund von Stressbedingungen. Zusätzlich ist bei der Suche nach Stämmen im Ausbruchsfall immer der sogenannte Enrichment Bias mit einzubeziehen. Das heißt der auslösende Stamm kann durch andere, besser an die Anreicherungsbedingungen angepasste Stämme überwachsen werden (Gorski 2012). Da bei Oberflächenwasser eine diverse Population an Mikroorganismen vorhanden ist, kann es zusätzlich zu Problemen bei der Interpretation von Ergebnissen während der Auswertung kommen. Molekularbiologische Nachweismethoden in Form einer PMA-qPCR sind im Lebensmittelsektor bereits etabliert und könnten auch für Umweltproben eine geeignete Alternative darstellen (Li und Chen 2013).

5.1.5. Nachweis von *Legionella* spp. im Oberflächenwasser

Innerhalb der im Projekt durchgeführten Untersuchungen gelang es in den meisten Fällen nicht *Legionella* spp. aus Oberflächenwasser der Ruhr zu isolieren. Bedingt sein könnte dies durch eine Hemmung des Wachstums durch die starke Begleitflora. Cotuk und Dogruoz (2005) konnten dies zum Beispiel für *Aeromonaden* zeigen. Es kann allerdings auch zu einem verbesserten Wachstum kommen. Generell sollten Nährmedien zum Nachweis von Legionellen bei jedem neuen Verwendungszweck sorgfältig getestet werden, da sich bereits Unterschiede zeigen können, wenn Nährmedien von unterschiedlichen Herstellern bezogen werden (Lee *et al.* 1993). Einige Stämme können aufgrund ihrer komplexen Anforderungen auch nur mittels Co-Kultivierung in Amöben angezüchtet werden (Buse *et al.* 2012).

Der Nachweis mittels qPCR stellt daher bei Umweltproben eine häufig genutzte Alternative dar und wurde auch zur Messung des Legionellengehaltes der Ruhr eingesetzt. Gerade bei hohen Gehalten an gelösten oder partikulären Stoffen, wie beispielsweise Biofilmpollen, zeigten sich jedoch Schwierigkeiten bei der Analytik wie eine Inhibition der PCR-Reaktion. Generell scheint die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit steigendem Kontaminationsgrad des Wassers abzunehmen (Yáñez *et al.* 2005). Zusätzlich kann keine einfache Korrelation zwischen Kulturergebnissen und Daten aus qPCR-Analysen erstellt werden. Bedingt ist dies unter anderem dadurch, dass nicht zwischen einem Signal bedingt durch kultivierbare Zellen, VBNC-Zellen, oder nicht mehr infektiösen DNA-Fragmenten unterschieden werden kann (Morio *et al.* 2008; Lee *et al.* 2011). Einer Inhibierung der PCR-Reaktion kann schon bei wenig belasteten Leitungswasserproben durch eine Aufreinigung der DNA vorgebeugt werden (Behets *et al.* 2007).

Um einen quantitativen molekularbiologischen Nachweis von kultivierbaren und VBNC-Zellen zu erreichen, wurde die Methode der PMA-qPCR für Messungen des Ruhrwassers erprobt. Eine alternative Anwendung von EMA wurde zunächst nicht weiterverfolgt, da nach Studien von Chang *et al.* (2009) EMA in benötigter Konzentration cytotoxisch wirkt und auch in vitale Legionellen-Zellen eindringen kann und an DNA bindet. Yáñez *et al.* (2011) beschrieben für PMA weniger cytotoxische Effekte als für EMA, weshalb dieser Farbstoff ausgewählt wurde. Für diese Methode wurden bereits einige Protokolle veröffentlicht, deren Eignung für die Probenmatrix getestet wurde. Slimani *et al.* (2012) schlagen eine PMA Behandlung direkt auf dem Filter nach Anreicherung mittels Membranfiltration vor. Dadurch kann der Arbeitsschritt der Resuspension eingespart werden. Diese Methode erwies sich für Ruhrwasser nicht als geeignet. Die Autoren hatten bereits eingeschränkt, dass bei einer hohen Gesamtzellzahl PMA als limitierender Faktor wirkt und dies zum Überschätzen der Lebendkonzentration führen könnte. Daher empfehlen sie die Methode für Proben mit niedriger Gesamtzellzahl.

Die für Ruhrwasserproben verwendete Methode zeigte einen Anteil von vitalen *Legionella* spp.-Zellen von 3 % - 89 %. Vitale Zellen der Spezies *L. pneumophila* konnten nicht nachgewiesen werden. Auch wenn diese Anteile zunächst plausibel erscheinen, sollten die mit dieser Methode generierten Daten kritisch hinterfragt und die Methode vor einem Routineeinsatz gründlich geprüft werden. Viele Autoren haben bereits weitere mögliche Schwachstellen der Methode identifiziert. Taylor *et al.* (2014)

beschrieben die Methode als wenig reproduzierbar und kritisierten, dass PMA ebenfalls in einer cytotoxischen Konzentration eingesetzt werden müsste, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen. Zudem sei das Reagenz sehr teuer. Li *et al.* (2015b) fügten 0,2 % Sarkosyl für bessere Permeabilität von membrangeschädigten Zellen für Fluss- und Leitungswasser zu und erhöhten die Dauern der Dunkel- und Lichtreaktion sowie die Inkubationstemperatur der Dunkelreaktion. Ebenfalls empfehlen sie Proben ab einer Gesamtzellzahl von 10^7 Zellen / mL zu verdünnen. Die Wiederfindungsrate der Zellen betrug dabei 98 %.

Im Gegensatz zu der zuvor formulierten Aussage gaben Chen und Chang (2010) an mit dem Einsatz von EMA eine bessere Quantifizierung von vitalen hitzestressen *L. pneumophila*-Zellen erreicht zu haben. Dieses Reagenz erweise sich als geeigneter, vitale *Legionella*-Zellen in Umweltproben mit Begleitflora und abiotischen Störstoffen nachzuweisen. Zudem sei diese Methode kostengünstiger, da Konzentrationen von EMA geringer gewählt werden können als im Falle von PMA. Delgado-Viscogliosi *et al.* (2009) verwendeten ebenfalls EMA zur Bearbeitung von Proben aus Warmwasserversorgung. Luo *et al.* (2010) wiesen auf einen weiteren Punkt hin, der bei der Methodenentwicklung einer PMA-qPCR beachtet werden sollte. Ihrer Erfahrung nach solle die Amplicon-Länge nicht zu kurz gewählt werden, da ansonsten die PCR-Reaktion durch gebundenes PMA nicht ausreichend verhindert werden könne.

5.2. Gewässerqualität

Die Nutzung natürlicher Gewässer für Freizeitaktivitäten wie das Baden ist immer mit einem Risiko verbunden, da es zu einer Exposition gegenüber chemischen Kontaminationen oder Krankheitserregern kommen kann. In offene Systeme wie Flüsse können diese über unterschiedlichste Quellen eingetragen werden. In dicht besiedelten Regionen, wie im Falle der Ruhr, sind vor allem Einleitungen aus Kläranlagen, Mischwasserentlastungen oder oberflächliche Abflüsse z. B. von landwirtschaftlich genutzten Flächen zu beachten. Je nach Wetterlage kann die Gewichtung dieser unterschiedlichen Quellen beim Einfluss auf die Gesamtqualität des Gewässers variieren (Tondera *et al.* 2016b). Nachdem im Ruhrgebiet in den vergangenen Jahrzehnten die Belastungen durch chemische Kontaminationen stark zurückgegangen sind, stützen sich Verbote der Nutzung von Gewässern meistens auf Unsicherheiten in Bezug auf die hygienisch-mikrobiologische Qualität (Kistemann *et al.* 2016).

Um die Basis für eine Einstufung der Ruhr aus hygienischer Sicht zu schaffen, wurden durch das Forschungsprojekt „Sichere Ruhr“, innerhalb dessen Daten für diese Arbeit erhoben wurden, mikrobiologische Parameter mit Indikatorfunktion, chemische Begleitparameter und auch eine Auswahl pathogener Mikroorganismen direkt untersucht und nachgewiesen. Ein allgemeiner mikrobiologischer Indikator ist der Gesamtgehalt an Mikroorganismen. Die fluoreszenzmikroskopisch bestimmte Gesamtzellzahl ist dabei um ein Vielfaches höher als die tatsächlich kultivierbare Teilmenge widerspiegelt durch die Koloniezahlen bei 22 °C und bei 36 °C. Dies ist typisch für Umweltproben und hat unterschiedliche Ursachen. Zum einen sind die gewählten Anreicherungsbedingungen zwar für eine Vielzahl von Organismen geeignet, es existieren aber zahlreiche weitere an unterschiedlichste Nischen angepasste Arten, die grundlegend andere Voraussetzungen zum Wachsen benötigen. Daher können diese mit allgemeinen kulturbasierten Methoden nicht erfasst und für eine umfassende Bewertung berücksichtigt werden (Harwani 2012). Zum anderen geht bei Stressfaktoren wie zum Beispiel Nährstoffknappheit oder äußeren Einflüssen wie der UV-Strahlung ein bedeutender Anteil der Zellen in einen Zustand über, in dem sie nicht mehr ohne weiteres kultiviert werden können. Zusätzlich können bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung irreversibel geschädigte Zellen ebenfalls nicht abgegrenzt werden. Insgesamt beträgt der Anteil -bezogen auf den Median der Messungen- der bei 22 °C kultivierbaren Zellen 0,02 % der Gesamtzellzahl, wobei diese Temperatur eher den Umweltbedingungen entspricht. Der Anteil, der bei

36 °C kultivierbaren Zellen betrug hierbei 0,01 % (Konzentrationsbereiche siehe Abbildung 57). Diese Temperatur entspricht dem Wachstumsbereich vieler humanpathogener Organismen.

Typisch für ein Oberflächengewässer mit diversen Eintragspfaden ist auch die Anwesenheit der Fäkalindikatoren *E. coli* und intestinalen Enterokokken. Diese wurden in der überwiegenden Mehrheit der Proben mit leicht höheren Konzentrationen von *E. coli* nachgewiesen. Dies entspricht den gängigen Erfahrungen. Intestinale Enterokokken bleiben aber eine längere Zeit nach der Verschmutzung nachweisbar, da sie langsamer in der Umwelt inaktiviert werden (Kinzelman *et al.* 2003). Diese beiden Parameter sind auch in der EU-Badegewässerrichtlinie zur Einstufung des Gewässers vorgesehen. Daten aus vier aufeinanderfolgenden Badesaisons bilden die Grundlage für eine Einstufung des Gewässers. Eine vollständige Bewertung kann daher an dieser Stelle noch nicht vorgenommen werden. Betrachtet man nur die Daten des Überwachungszeitraums von 18 Monaten, so käme es durch den Parameter *E. coli* zu einer Einstufung der meisten Probenahmestellen als mangelhaft. Bedingt ist dies vor allem durch kurzfristige Verschmutzungen in Form von Starkregenereignissen. Wenn nur Messwerte aus "Trockenzeiten" berücksichtigt werden, kann jedoch bei den meisten Stellen mindestens eine ausreichende Qualität erreicht werden. Hinsichtlich des Parameters intestinale Enterokokken wurden zu jeder Zeit die Forderungen erfüllt (Strathmann *et al.* 2016). Die Konzentrationsbereiche können ebenfalls der Abbildung 57 entnommen werden. Neben *E. coli* wurden auch coliforme Bakterien, zu denen *E. coli* ebenfalls zählt, als Gruppe untersucht. Die Anwesenheit dieser Bakterien deutet nicht unbedingt auf eine fäkale Verunreinigung hin, da diese auch andere Eintragspfade haben können. In der vor der aktuellen Version der Badegewässerrichtlinie gültigen Richtlinie 76/160/EWG (vom 05.02.1976) waren Gesamtcoliforme als Parameter mit einem Leitwert von 500 MPN bzw. KBE/100 mL und einem Imperativwert von 10.000 MPN bzw. KBE/100 mL vorgesehen. Während des Untersuchungszeitraums lagen die Werte in einem breiten Messbereich teils mit einem Minimum von 20 MPN/100 mL unterhalb des Leitwerts, teils jedoch mit einem Maximum von 65.000 MPN/100 mL deutlich oberhalb des Imperativwertes. Zu beachten ist, dass das angewendete Verfahren sich von den damals in der Vorschrift vorgegebenen Methoden unterscheidet und eventuell eine höhere Wiederfindung hat.

Der Gehalt an *C. perfringens* ist gesetzlich nicht als Überwachungsparameter vorgesehen. Da dieses Bakterium resistente Sporen bildet, die in der Widerstandfähigkeit intestinalen Parasiten wie Giardien ähneln, werden sie jedoch gerne als Indikator genutzt. Die Korrelation für das gemeinsame Auftreten der Organismenarten ist dabei recht hoch (Wu *et al.* 2011). *C. perfringens* wurde im Untersuchungszeitraum in jeder Probe in einem relativ konstanten Konzentrationsbereich mit einem Median von 74 KBE/100 mL nachgewiesen. Da dieser Organismus in den Ausscheidungen einer Vielzahl von Tieren vorkommt und die Sporen sehr langsam inaktiviert werden (Wu *et al.* 2011), kann dies als typisch für ein fäkal belastetes Oberflächengewässer eingeordnet werden.

Bei der Untersuchung der ausgewählten wasserassoziierten pathogenen Bakterien konnten ebenfalls alle Zielorganismen nachgewiesen werden. Es gab hier jedoch sehr große Unterschiede bei der Nachweisrate und den gemessenen Konzentrationen (Abbildung 57).

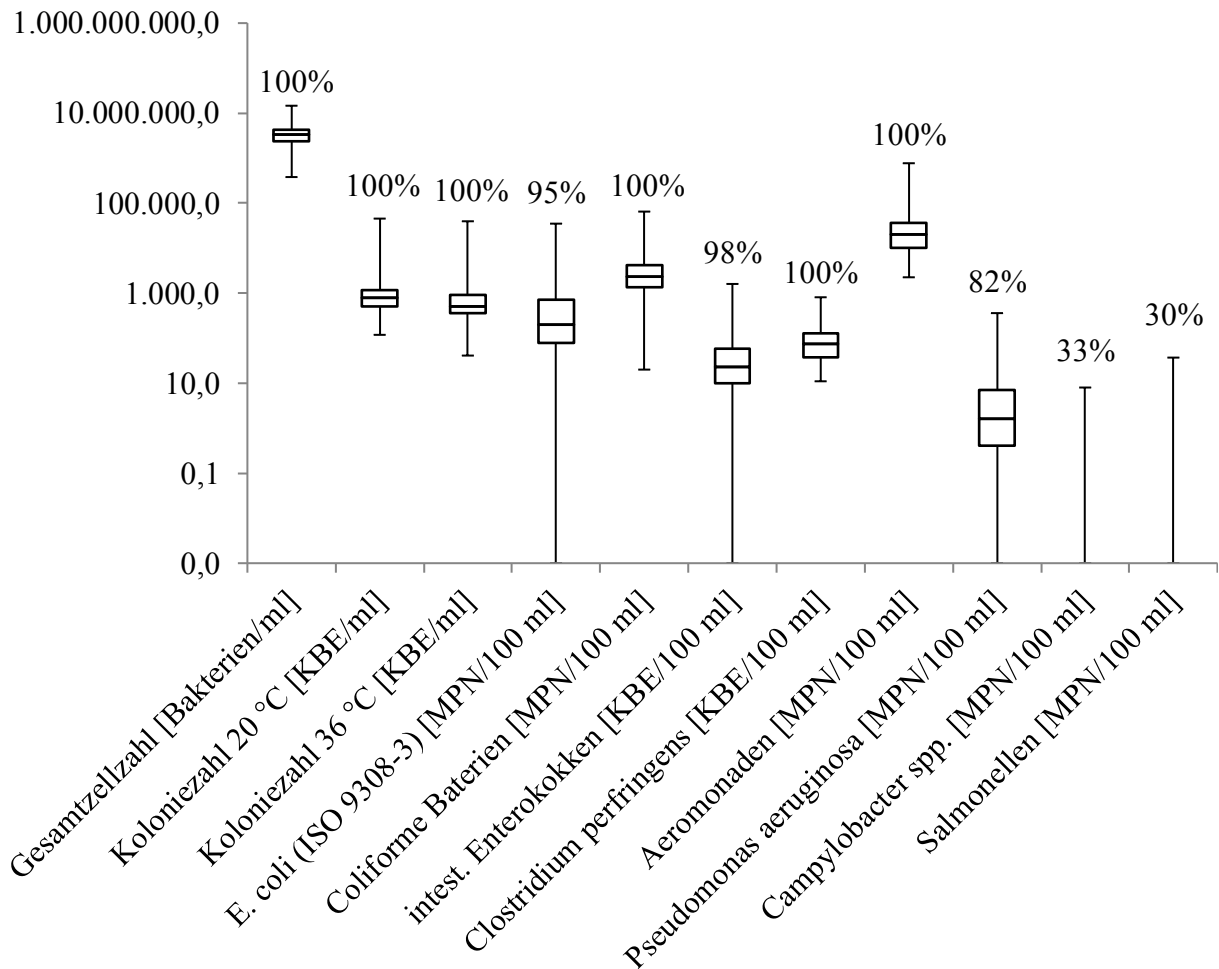


Abbildung 57: Boxplot-Darstellungen der gemessenen Konzentrationen von ausgewählten mikrobiologischen Parametern (Box umfasst 50 % der Verteilung, die Whiskers zeigen das Minimum und Maximum an). Es wurden Wasserproben an 8 Probenahmestellen der Ruhr über 13 Monate untersucht. Zusätzlich ist die Häufigkeit des positiven Nachweises in Prozent angegeben.

5.3. Vorkommen von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten

Aeromonas spp. wurden in den höchsten Konzentrationen aller untersuchten Zielorganismen im Bereich von $2,3 \times 10^3$ bis $7,7 \times 10^5$ KBE/100 mL mit einem Median von $2,2 \times 10^4$ in allen Proben gemessen. Verglichen mit den aus der Literatur bekannten Vorkommen in Gewässern, die in Tabelle 40 aufgelistet sind, spiegeln die Messdaten einen typischen Konzentrationsbereich für urbane Flüsse wider. Die Tendenz leicht geringerer Konzentrationen in der kühleren Jahreszeit scheint verbreitet in der Umwelt vorzukommen. In sehr heißen Regionen kehrt sich dieser Effekt allerdings um (Maalej *et al.* 2004). Die Konzentrationen von *Aeromonas* spp. korrelieren dabei häufig mit dem trophischen Zustand eines Gewässers (Canosa und Pinilla 1999; Ezzat 2014). Auch wenn mit unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden der Gehalt von Aeromonaden um mehr als 90 % gesenkt werden kann, können Einleitungen aus Kläranlagen zu einem bedeutenden Anteil am Eintrag in Gewässer beteiligt sein (US EPA 2006). Ebenfalls können hohe Konzentrationen auf einen Einfluss durch Abwasser hindeuten (Ramteke *et al.* 1993).

Zu den Konzentrationen dieser Bakteriengruppe in Biofilmen an den Grenzschichten natürlicher Gewässer finden sich weniger Erfahrungswerte. Bei den an der Ruhr durchgeführten exemplarischen Beprobungen zeigte sich stets eine sehr starke Anreicherung besonders in den epilithischen Biofilmen

(> 6.000-fach epilithischer Biofilm, > 100-fach Sediment). Bei einer Beprobung nach Aufwirbeln des Sediments oder des Uferbereichs wie zum Beispiel in der ADAC-Badergewässerstudie vorgeschlagen lässt sich dieses Reservoir nicht in dieser Größenordnung ableiten. Viele unterschiedliche Spezies von *Aeromonas* spp. haben die Fähigkeit sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C Biofilme zu bilden, die durch Desinfektion zwar teilweise entfernt, jedoch nicht vollständig verhindert werden konnten (Craveiro *et al.* 2015). In die Anheftung und Bildung von Biofilmen sind Flagellen involviert, die von 60 % der mesophilen Stämme ausgebildet werden können (Kirov *et al.* 2004).

Eine biochemische Identifizierung mittels API® 20 NE Testsystem konnte eine Spezieszuordnung der Mehrheit der Isolate auf *Aeromonas hydrophila/caviae* einschränken. Eine genauere Unterscheidung zwischen den beiden Spezies war nicht möglich. Bei einer Untersuchung von Flusswasser des Nils wurde ebenfalls *Aeromonas hydrophila* als dominante Spezies gefunden (Ezzat 2014). Während die biochemische Identifizierung mittels API®-Systemen für eine schnelle Genusidentifizierung geeignet zu sein scheint, sollte für genauere Populationsanalysen besser auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Bonadonna *et al.* (2001) führen zum Beispiel an, dass sich durch eine Genotypisierung je nach Anwendungsbereich aufschlussreichere Daten erzielen lassen als durch biochemische Methoden. Bei einer stichprobenartigen Analyse unterschiedlicher bekannter Pathogenitätsfaktoren konnten alle in unterschiedlicher Kombination in Isolaten nachgewiesen werden. Auch in anderen unterschiedlichen aquatischen Systemen sowie Fischen wurden virulente *Aeromonas*-Stämme bzw. Stämme mit Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen (Imzilm *et al.* 1998; Heuzenroeder *et al.* 1999; Kingombe *et al.* 1999; González-Serrano *et al.* 2002; Ottaviani *et al.* 2011; Igbinsa und Okoh 2013; Furmanek-Blaszka 2014; Korkoca *et al.* 2014). In Untersuchungen von Bonadonna *et al.* (2002) wurde das Auftreten von Pathogenitätsfaktoren in Umweltisolaten mit der jeweiligen Spezies in Verbindung gebracht, wobei diese besonders häufig im Falle von *A. sobria* und besonders selten bei *A. caviae* auftraten. Bei den Ruhrwasserisolaten konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. Die einzelnen Spezies scheinen häufig über spezifische Sets von Kombinationen der einzelnen Pathogenitätsfaktoren zu verfügen (Khor *et al.* 2015).

5.4. Risikobewertung von *Aeromonas* spp. im Ruhrwasser

Durchfallerkrankungen wurden durch einige Studien mit dem Konsum von Wasser mit erhöhten Gehalten von *Aeromonas* spp. vor allem im Sommer in Verbindung gebracht (Rusin *et al.* 1997). Des Weiteren gibt es Studien, die feststellten, dass erhöhte Konzentrationen auch gleichzeitig mit einem vermehrten Auftreten von Magen-Darm-Erkrankungen von Badenden zusammenfielen (Kueh *et al.* 1995). In Expositionsstudien konnte allerdings kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Dosis und Infektion festgestellt werden, auch wenn die eingesetzten Stämme einige Pathogenitätsfaktoren besaßen. Trotz der Gabe in sehr hohen Dosen (bis zu 10^{10} Zellen) bildete nur ein kleiner Anteil der Freiwilligen Symptome aus (Morgan *et al.* 1985). Diese Zellanzahlen sind höher als durch eine versehentliche Ingestion von Ruhrwasser zu erwarten wäre. Da *Aeromonas*-Stämme isoliert wurden, die Pathogenitätsfaktoren besaßen, können gastrointestinale Infektionen nach Kontakt mit Ruhrwasser nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Aravena-Román *et al.* (2014) zeigten, dass genetische Informationen für Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren auch zu einem großen Anteil in Umweltisolaten vorhanden sind. Sie schlossen, dass zur Ausbildung einer Erkrankung wahrscheinlich mehrere Faktoren zusammenspielen. Einen möglichen Zusammenhang zwischen virulenten *Aeromonas*-Stämmen in Freizeitgewässern und Auswirkungen auf die Gesundheit stellen Berg *et al.* (2011) her und stellen eine Hypothese auf, dass einige Effekte, die ursprünglich toxischen Algenblüten zugeordnet wurden, auch andere wasserassoziierte Bakterien wie Aeromonaden als Ursache haben könnten. Häufiger als bei Umweltisolaten scheint bei Isolaten von erkrankten Kindern zudem eine Kombination der beiden Pathogenitätsfaktoren *alt* und *ast* zu sein, die beide Enterotoxine codieren (Albert *et al.* 2000).

In Untersuchungen von Khajanchi *et al.* (2010) war die Ausbildung von Virulenzfaktoren in klinischen Isolaten höher als bei Isolaten aus der Wasserverteilung. Ebenfalls zeigten diese verstärkt Quorum Sensing. Es konnte bei den Isolaten aus Wasserproben und klinischen Ursprungs zusätzlich eine hohe Ähnlichkeit des Genotyps durch die Pulsfeldgelelektrophorese festgestellt werden, wenn diese zuvor durch Übereinstimmungen der Virulenzaktivität aufgefallen waren. Virulente Eigenschaften von Umweltisolaten können auch bei menschlicher Körpertemperatur ausgebildet werden (Ottaviani *et al.* 2011). Generell scheint die Toxinproduktion jedoch bei klinischen Isolaten bei höheren Temperaturen höher und bei Umweltisolaten bei niedrigeren Temperaturen stärker ausgeprägt zu sein (Knöchel 1989).

Zusätzlich sind auch extraintestinale Infektionen durch Aeromonaden möglich (siehe 1.7.1.2). Daher ist bei Risikogruppen, die ein geschwächtes Immunsystem oder Vorschädigungen der Haut besitzen, der Wasserkontakt kritischer zu werten. Die Ergebnisse des Untersuchungszeitraumes zeigen dabei an, dass -auch wenn es leichte jahreszeitliche und ortsspezifische Variationen gab- ganzjährig mit hohen *Aeromonas* spp.-Konzentrationen zu rechnen ist. Die Untersuchungen an der Ruhr und Erfahrungen anderer Autoren legen dabei nahe, dass Schwankungen des Gehaltes der Aeromonaden durch die Indikatoren der Badegewässerrichtlinie nicht gut abgebildet werden können (Bonadonna *et al.* 2002). Zu beachten ist ebenfalls, dass Umweltisolate gehäuft Antibiotikaresistenzen aufweisen, die eine Behandlung erschweren können, sollte es zu einer Infektion kommen (Gibotti *et al.* 2000; Bhowmik *et al.* 2009; Li *et al.* 2015a). Antibiotikaresistente Stämme können beispielsweise auch über Kläranlagenabläufe eingetragen werden (Olaniran *et al.* 2015). Eine Abwasserbehandlung kann eine Reduktion von 3-4 log-Stufen gemessen mit PCR basierten-Methoden leisten (Shannon *et al.* 2007). Neben der Assoziation zu Wasser sind Aeromonaden vor allem auch als Erreger lebensmittelbedingter Infektionen bekannt. Dies sollte bei der Ermittlung der Quelle in Ausbruchssituationen ebenfalls bedacht werden. Die Spezies *A. hydrophila*, die einen großen Anteil der lebensmittelbedingten Infektionen ausmacht, ist durch gängige Konservierungsmaßnahmen, die ein Erhitzen oder Verändern des pH-Wertes oder der Salz- und Sauerstoffkonzentration einschließen, gut einzudämmen (Daskalov 2006). Ein Wachstum von *Aeromonas* spp. bei Temperaturen um 5 °C im kontaminierten Lebensmittel im Kühlschrank ist möglich (Beuchat 1991). Auch bei diesen geringen Temperaturen werden unter geeigneten Bedingungen Toxine gebildet (Krovacek *et al.* 1991).

5.5. Elimination von *Aeromonas* spp. während der Trinkwasseraufbereitung

Der Gehalt von *Aeromonas* spp. ist in Deutschland kein Routineparameter zur Bestimmung der Trinkwasserqualität. Generell gilt jedoch der Grundsatz, dass keine Konzentrationen von fakultativ pathogenen Bakterien im aufbereiteten Trinkwasser enthalten sein dürfen, „die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen“ (TrinkwV 2001). Wie aufwendig Aufbereitungsprozesse gestaltet sein müssen, um Aeromonaden zu entfernen, hängt auch von der Rohwasserqualität ab. Je nachdem wie gut das Rohwasser gegen einen Eintrag von Mikroorganismen geschützt ist, sind unterschiedliche Konzentrationen von *Aeromonas* spp. zu erwarten. Bei Untersuchungen unterschiedlicher Rohwässer waren Aeromonaden in natürlichen Mineralwässern nicht, in Brunnen gelegentlich und in ungeschützten Quellen oder Talsperren häufig bzw. in höheren Konzentrationen nachzuweisen. Nicht immer lagen dabei auch gleichzeitig auch Indikatorbakterien vor (Kerstens *et al.* 1995; Massa *et al.* 2001; Di Bari *et al.* 2007). In der Ruhr als urbanes Gewässer ist ganzjährig mit einer hohen Konzentration von Aeromonaden zu rechnen.

Die Eliminationsleistung unterschiedlicher Verfahren der Trinkwasseraufbereitung wurde bereits von einigen Autoren im Hinblick auf Aeromonaden untersucht. Durch Langsamsandfiltration kann eine Eliminationsleistung 99 % (2 log-Stufen) erreicht werden (Kerstens *et al.* 1995). Diese Erfahrung wurde auch bei den Untersuchungen in einem Trinkwasserwerk an der Ruhr gemacht. In diesem wird als erste Aufbereitungsstufe eine Langsamsandfiltration verwendet, mit der sich eine Reduktion der Konzentration von *Aeromonas* spp. um 2 bis 3 log-Stufen erzielen ließ. Durch Flockung und Fällung

kann hingegen eine Abnahme von ca. 90 % realisiert werden. Wird eine Desinfektion mittels Chlorung angeschlossen, kann die Reduktion auf über 99 % gesteigert werden. Eine Aktivkohlefiltration ist im Allgemeinen nicht zur Reduktion geeignet. Dieser Prozess trägt im Gegenteil zu einer erhöhten Konzentration von *Aeromonas* bei (Sartory 1998). Bei den Untersuchungen zur Aufbereitung des Ruhrwassers konnten noch vereinzelt *Aeromonas* nachgewiesen werden, nachdem eine Langsandsandfiltration, Ozonung und Mehrschichtfiltration durchlaufen wurde. Eine sich anschließende Filtration über Aktivkohle führte hier nicht zu einem Wiederanstieg der *Aeromonas* spp. Konzentration. Im fertig aufbereiteten Trinkwasser, das noch mittels UV-Behandlung desinfiziert wurde, waren ebenfalls keine *Aeromonas* mehr nachweisbar.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass konventionelle Verfahren der Trinkwasseraufbereitung geeignet sind, *Aeromonas* spp. ausreichend zu entfernen. Es kann jedoch unter ungünstigen Bedingungen zu einer Wiederverkeimung innerhalb des Trinkwassersystems kommen. Dabei nimmt die Nachweishäufigkeit vor allem bei Konzentrationen an freiem Chlor unter 0,2 ml/L und steigenden Temperaturen zu. Eine Persistenz innerhalb von Biofilmen ist ebenfalls möglich. Um ein nachträgliches Wachstum von *Aeromonas* im aufbereiteten Trinkwasser zu vermeiden, sollte daher die Temperatur möglichst unter 14 °C liegen und der Gehalt an verwertbaren Kohlenstoffverbindungen möglichst gering sein (US EPA 2006). Nachgewiesen werden können sie in einer Vielzahl von Trinkwassernetzen, Speichern und Brunnen, auch wenn die mikrobiologischen Qualitätsanforderungen erfüllt sind (Fernández *et al.* 2000; Razzolini *et al.* 2010; Egorov *et al.* 2011). Auch im Trinkwasser ist eine Saisonalität mit höheren Konzentrationen im Sommer bei höheren Wassertemperaturen beschrieben (Krovacek *et al.* 1992). In den Niederlanden wird die Konzentration von *Aeromonas* spp. im Trinkwasser schon seit vielen Jahren als Prozessparameter mit einem Grenzwert von < 1.000 KBE/100 mL überwacht (Smeets *et al.* 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass Isolate aus Trinkwasser-Systemen, da diese wie sonstige Umweltisolate über Virulenzfaktoren verfügen, Infektionen hervorrufen können (Krovacek *et al.* 1992; Sen und Rodgers 2004; Pablos *et al.* 2009). In einigen Fällen konnte auch ein direkter Zusammenhang zu klinischen Isolaten hergestellt werden, was auf eine wasserbedingte Infektion hindeutet (Pablos *et al.* 2010).

Tabelle 40 Ausgewählte Untersuchungen von *Aeromonas* spp. in Oberflächen- und sonstigen Wässern

Untersuchungsbereich	Gemessene Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Ruhr, Stadtgebiet Essen Entnahmestellen mit unterschiedlichen lokalen Einflussfaktoren inklusive Baldeneysee und einer Rohwasserentnahmestelle im Stadtgebiet Mülheim, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	2,3 x 10³ KBE/100 mL bis 7,7 x 10⁵ KBE/100 mL Median: 2,1 x 10⁴ KBE/100 mL Nachweisrate: 100 % (218 Proben innerhalb eines Zeitraumes von 26 Monaten)	Leicht erhöhte Konzentrationen nach Niederschlagsereignissen; Etwas geringere Konzentrationen im Winter; Anreicherung in Sedimenten und Biofilmen; Kaum Unterschiede zwischen den untersuchten Entnahmestellen; Vorliegen unterschiedlicher Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen	Diese Arbeit (Horstkott <i>et al.</i> 2014; Strathmann <i>et al.</i> 2016)
Reservoir von Oberflächenwasser	10³ bis 10⁵ KBE/100 mL	Maximum der Konzentrationen im Sommer	(Kerstens <i>et al.</i> 1995)
Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung (Indiana, USA)	10³ bis 10⁴ KBE/100 mL	Abhängigkeiten zur Temperatur feststellbar	(Chauret <i>et al.</i> 2001)
Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung (Schweden)	bis zu 10⁶ KBE/100 mL		(Kühn <i>et al.</i> 1997)
Aufbereitetes Trinkwasser (Schweden)	bis zu 750 KBE/100 mL		(Kühn <i>et al.</i> 1997)
Italienische Küste	10² bis 10³ KBE/100 mL	Eintrag über Flüsse vermutet, die durch Kläranlagen beeinflusst sind	(Fiorentini <i>et al.</i> 1998)
Urbaner Abfluss in der Region der Sfax Küste in Tunesien	1,5 x 10⁵ bis 2,2 x 10⁸ KBE/100 mL	Konzentrationen im Abfluss in sehr heißer Jahreszeit geringer	(Maalej <i>et al.</i> 2003)
Meeresoberfläche der Küste von Sfax Küste in Tunesien	bis zu 7,9 x 10³ KBE/100 mL	für Salzwasser trifft gegenteiliger Effekt mit kulturell ermittelten Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, Gesamtzellzahl von <i>Aeromonas</i> bleibt jedoch stabil	(Maalej <i>et al.</i> 2003)
Unbehandeltes Abwasser	10⁸ bis 10¹⁰ KBE/100 mL	Maximale Konzentrationen bei einem Temperaturoptimum von ca. 35 °C	(Holmes <i>et al.</i> 1996)
Behandeltes Abwasser	10⁵ bis 10⁷ KBE/100 mL		(Holmes <i>et al.</i> 1996)
Flüsse, mit Einleitungen aus Kläranlagenabläufen	10³ bis 10⁶ KBE/100 mL		(Holmes <i>et al.</i> 1996)
Saubere Flüsse, Seen und Talsperren	10² bis 10⁴ KBE/100 mL		(Holmes <i>et al.</i> 1996)

Untersuchungsbereich	Gemessene Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Rohwasser (Oberflächenwasser) für die Trinkwasseraufbereitung, Pont-Viau und Repentigny (Quebec, Kanada)	Mittelwert von <i>A. hydrophila</i> im Oberflächenwasser, das als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung genutzt wird: 7,5 x 10² KBE/100 mL (Pont-Viau); 5,8 x 10² KBE/100 mL (Repentigny)	Im aufbereiteten Trinkwasser ist <i>A. hydrophila</i> nicht mehr nachweisbar. Innerhalb des Verteilungsnetzes steigt die Konzentration jedoch wieder geringfügig an	(Payment <i>et al.</i> 1988)

5.6. Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten

Im Gegensatz zu *Aeromonas* spp., die bei Untersuchungen von natürlichen und belasteten Gewässern stets in hohen Konzentrationen nachweisbar sind, umfassen die Literaturangaben der Gehalte von *P. aeruginosa* einen weiten Bereich. Im Ruhrwasser wurden meist niedrige Konzentrationen unterhalb von 10^2 KBE/100 mL gemessen. An einigen Stellen und Zeiten konnten jedoch auch höhere Spitzenwerte verzeichnet werden. Diese Erfahrungen decken sich im Großen und Ganzen mit den Ergebnissen anderer Studien. Highsmith und Abshire (1975) konnten bei vergleichbaren Werten eine deutlich höhere Wiederfindung mittels einer Modifizierung der Nährmedien erreichen. In Untersuchungen an der Ruhr konnte dies nicht gezeigt werden. Es war mit neu entwickelten kommerziellen Nährmedien zwar möglich, mehr verdächtige Kolonien zu erhalten, diese ließen sich jedoch im weiteren Verlauf nicht bestätigen. Höhere Konzentrationen konnten nicht unmittelbar bestimmten Eintragspfaden zugeordnet werden. Es zeigt sich eine leichte Saisonalität mit höheren Konzentrationen in den Sommermonaten.

Das Inaktivierungsverhalten von *P. aeruginosa* in Süßwasser ähnelt dem von Fäkalindikatoren, wobei die UV-Strahlung und das Vorhandensein von nicht filtrierbaren biotischen Stoffen den größten Einfluss haben. Da sich aber gerade in den sonnenreicheren Monaten höhere Konzentrationen abzeichnen, scheinen die Gehalte von einem Zusammenspiel unterschiedlicher allgemeiner und lokaler Faktoren abzuhängen. Zugabe von Abwasser bewirkt, vermutlich durch Konkurrenz und prädatorische Effekte, im Gegensatz zu autoklaviertem Abwasser eine Abnahme der Konzentration dieses Bakteriums (de Vicente *et al.* 1988).

Auffällig war bei einigen repräsentativen Beprobungen, dass eine Anreicherung in epilithischen Biofilmen um etwa 2-log Stufen und auch im Sediment vorzuliegen scheint. Untersuchungen an Ökosystemen von Flüssen durch Pellett *et al.* (1983) zeigten ebenfalls, dass Nachweise in Aufwüchsen und Sedimenten besonders häufig positiv sind. Bei Untersuchungen an Badestränden von Ghinsberg *et al.* (1994) konnte *P. aeruginosa* häufig im Sand nachgewiesen werden. Zusammengefasst lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass *P. aeruginosa* im Uferbereich von Badestellen ein größeres Risiko darstellen könnte als die Konzentrationen in der Wasserphase vermuten lassen.

Ausgewählte Untersuchungen zur Konzentration von *P. aeruginosa* in Oberflächen- und anderen Wässern sind in Tabelle 41 zusammengefasst.

5.7. Risikobewertung von *Pseudomonas aeruginosa* im Ruhrwasser

Mena und Gerba (2009) ermittelten ein sehr geringes Infektionsrisiko bei einer Ingestion von *P. aeruginosa* haltigem Wasser. Als ausreichende Dosis für eine Infektion wurde ein Median von 10^{10} KBE angegeben, eine vorherige Antibiotikatherapie bewirke hierbei eine Senkung der Infektionsdosis. Zugrunde gelegt wurden hierzu Expositionsstudien von Buck und Cooke (1969), die allerdings nur sehr wenige Teilnehmer einschlossen. Zusätzlich wurden Expositionsstudien durch Hentges *et al.* (1985) berücksichtigt, bei denen ähnliche Werte ermittelt wurden. Das Baden als Expositionsfaktor scheint eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu werden mit der Nahrung nach Schätzungen von Aravena-Román *et al.* (2014) weitaus höhere Dosen eingenommen.

Bei Ausbrüchen, die mit dem Besuch eines Schwimmbads oder einer Badestelle assoziiert sind, kam es vor allem zur Ausbildung einer Folliculitis gefolgt von Pneumonien, Harnwegs- und Ohrinfektionen. Auch wenn hierbei meist keine Konzentrationsangaben vorlagen, scheinen bei diesen Infektionswegen bereits niedrige Dosen von *P. aeruginosa* auszureichen. Van Asperen *et al.* (1995) brachten einen Ausbruch von Otitis externa mit Baden in einem Oberflächengewässer in Zusammenhang, das nur einen sehr geringen Gehalt von *P. aeruginosa* (ca. 4 KBE/100 mL) hatte.

Ebenfalls waren die zu diesem Zeitpunkt gültigen Vorgaben für Badegewässer erfüllt. Daher empfehlen die Autoren Personen, die unter wiederkehrenden Ohrinfektionen leiden, auf das Baden in potenziell kontaminierten Gewässern zu verzichten. Der ursprüngliche Gehalt eines Gewässers an *P. aeruginosa* scheint nicht direkt mit dem Risiko zusammenzuhängen an Ohrinfektionen zu erkranken. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Badenden selbst eine Quelle darstellen und hohe Mengen des Bakteriums an das Wasser abgeben könnten. Ein Überleben im Wasser ist anschließend lang genug möglich, um bei anderen Badenden nach Eindringen in den Gehörgang Infektionen hervorzurufen (Calderon und Mood 1982; Mena und Gerba 2009). Zusammenhänge zwischen einer Otitis externa zu Gehalten von *P. aeruginosa* im niedrigen Konzentrationsbereich konnten auch durch Studien anderer Autoren bestätigt werden (Seyfried und Cook 1984; Hajjartabar 2010). Denkbar ist ebenfalls, dass bei diesen Untersuchungen vorgeschädigte Zellen wegen mangelnder Kultivierbarkeit nicht miterfasst wurden (Mena und Gerba 2009).

Das Risiko eine Otitis durch den Kontakt durch das Baden zu erwerben, steigt mit der Dauer sowie Art (z. B. Untertauchen des Kopfes) der Exposition an. Zudem scheint bei dem Schwimmen in Binnengewässern generell ein höheres Risiko zu bestehen als bei Meerwasser oder bei Badebeckenwasser (Springer und Shapiro 1985). Jüngere Menschen haben ein höheres Risiko eine solche Entzündung zu erwerben, was jedoch auch mit anderen Badegewohnheiten und Frequenzen in Verbindung gebracht werden könnte (Calderon und Mood 1982). Seyfried und Cook (1984) zeigten, dass einzelne Serotypen lange in aquatischen Systemen überdauern können, und konnten diese parallel in infizierten Personen nachweisen. Zudem könne nach ihren Erkenntnissen eine hohe Anzahl von Badenden selbst entweder durch Ausscheidungen oder Mobilisierung von Sedimenten einen Konzentrationsanstieg von *P. aeruginosa* bewirken. Ebenfalls häufig werden Hautinfektionen durch *P. aeruginosa* z. B. in Form einer Folliculitis nach dem Schwimmen beobachtet. Häufungen der Infektionen gibt es bei längerer Expositionsdauer, bestimmten *P. aeruginosa* Serovaren und weiblichen Badenden (Rice *et al.* 2012). Ab welcher Konzentration von *P. aeruginosa* die Gefahr einer Folliculitis zunimmt ist nicht gänzlich geklärt. Price und Ahearn (1988) gehen aufgrund von Daten aus Ausbruchsfällen von einer Konzentration von etwa 10^5 KBE/100 mL aus. Verschiedene Modelle zur Risikoquantifizierung wurden darauf aufbauend von Roser *et al.* (2014, 2015) entwickelt. Mit dem Baden in Gewässern wurden hingegen noch keine größeren Folliculitisausbrüche in Verbindung gebracht. Ein Risiko für Hautinfektionen besteht bei Vorschädigung der Haut vor allem bei Brandwunden. Ein Kontakt von nicht intakter Haut mit Oberflächenwasser sollte aus diesem Grund vermieden werden (Rusin *et al.* 1997). Bei Badebeckenwasser sind Hautausschläge als häufigstes Symptom durch eine Infektion mit *P. aeruginosa* nach dem Baden ermittelt worden.

Auch wenn bisher keine Ausbrüche beschrieben sind, stellen Kontaktlinsenträger eine weitere Risikogruppe dar. Sie sind besonders gefährdet *P. aeruginosa*-bedingte Augeninfektionen (z. B. Keratitis/Hornhautulcus) zu erwerben (Fletcher *et al.* 1993).

Infektionen nach Inhalation wurden von George *et al.* (1991) im Tierversuch an Mäusen untersucht. Je nach getestetem Stamm konnten ab einer Dosis von etwa 10^7 bis 10^8 KBE Erkrankungen beobachtet werden. Ausbrüche wurden nur im Falle von Whirlpools und nicht bei Badegewässern erfasst (Rose *et al.* 1983). Es ist daher davon auszugehen, dass eher andere Infektionswege beim Baden im Vordergrund stehen (Rice *et al.* 2012). Bei einigen Personengruppen wie cystische Fibrose-Patienten ist dieser Infektionspfad jedoch zu beachten.

P. aeruginosa ist in der Lage sehr lange in sowohl marinen Badegewässern als auch Binnengewässern zu überdauern. Ein kultureller Nachweis kann dabei aufgrund des VBNC-Status negativ sein (Khan *et al.* 2010), was bei einer Risikoabschätzung durch die zuvor beschriebenen Expositionsarten beim Baden in natürlichen Gewässern berücksichtigt werden sollte.

Tabelle 41 Ausgewählte Untersuchungen von *P. aeruginosa* in Oberflächen- und sonstigen Wässern

Untersuchungsbereich	Gemessene Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Ruhr, Stadtgebiet Essen Entnahmestellen mit unterschiedlichen lokalen Einflussfaktoren inklusive Baldeneysee und einer Rohwasserentnahmestelle im Stadtgebiet Mülheim, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	<u>Median:</u> 1,6 MPN/100 mL <u>Maximale Konzentration:</u> > 360 MPN/100 mL Nachweisrate: 81 % (170 von 210 Proben)	Anreicherung in Sedimenten und Biofilmen;	Diese Arbeit (Horstkott <i>et al.</i> 2014; Strathmann <i>et al.</i> 2016)
Konzentration an verschiedenen Stellen eines Flusses (Brasilien)	3 x 10¹ bis 6 x 10⁴ MPN/100 mL	häufiger in fäkal belasteten Wässern nachgewiesen, aber direkte Korrelation zu Indikatoren wie <i>E. coli</i> fraglich	(Guimarães <i>et al.</i> 1993)
Häusliche Abwässer und Abwässer einer Klinik	30.000 /100 mL (häusliche Abwässer) und 500.000 /100 mL (Klinikabwässer)	Konzentrationen des Indikatorbakteriums <i>E. coli</i> unterscheiden sich bei Abwasserarten nicht wesentlich	(Wheater <i>et al.</i> 1980)
Becken des Flusses Mississippi (USA)	Gewöhnlich < 1,4 KBE/100 mL		(Pellett <i>et al.</i> 1983)
Flusswasser	<u>Standardmethode:</u> 4,0 x 10¹ bis 7,0 x 10² MPN/100 mL, Median: 2,7 x 10² MPN/100 mL <u>Methode mit angepassten</u> <u>Medien:</u> 2,4 x 10³ bis 5,4 x 10⁸ MPN/100 mL Median: 2,5 x 10⁷ MPN/100 mL	durch Anpassung der Nachweismedien konnten um einige log-Stufen höhere Werte erreicht werden	(Highsmith und Abshire 1975)

Untersuchungsbereich	Gemessene Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Abwasser	<u>Standardmethode:</u> 2.3×10^4 bis 4.3×10^4 MPN/100 mL, Median: $4,2 \times 10^4$ MPN/100 mL <u>Methode mit angepassten</u> <u>Medien:</u> 2.4×10^7 bis 5.4×10^7 MPN/100 mL Median: 4.3×10^7 MPN/100 mL	durch Anpassung der Nachweismedien konnten um einige log-Stufen höhere Werte erreicht werden	(Highsmith und Abshire 1975)
Kawartha Lakes und Strand bei Lake Huron, Ausable River (Ontario, Kanada)	<u>Lake Huron:</u> Wasserphase: 0 bis 5 MPN/100 mL Sediment: 3 bis 15 MPN/100 g Trockenmasse <u>Ausable River:</u> Mittelwert in Wasserphase: 33 MPN/100 mL Sediment: keine Beprobung, da zu steiniger Boden <u>Badestelle Lakefield</u> <u>(Binnengewässer):</u> Tagesverlauf: 0 bis 2.400 MPN/100 mL	Anstieg der Konzentration an ausgewählter Badestelle über den Tagesverlauf parallel zu Anzahl der Badenden, Konzentrationen in Flusswasser nach Einleitungen aus Kläranlage und Überläufen erhöht, Fluss als Quelle für <i>P. aeruginosa</i> in Lake Huron vermutet	(Seyfried und Cook 1984)
Rohwasser (Oberflächenwasser) für die Trinkwasseraufbereitung, Pont-Viau und Repentigny (Quebec, Kanada)	Mittelwert im Oberflächenwasser, das als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung genutzt wird: 2,7 MPN/100 mL (Pont-Viau); 5,4 MPN/100 mL (Repentigny)	im aufbereiteten Wasser ist <i>P. aeruginosa</i> nicht mehr nachweisbar; im Verteilungsnetz von Repentigny ist <i>P. aeruginosa</i> in geringen Konzentrationen nachweisbar	(Payment <i>et al.</i> 1988)

5.8. Elimination von *P. aeruginosa* während der Trinkwasseraufbereitung

Im repräsentativen Wasserwerk an der Ruhr konnte *P. aeruginosa* bereits nach dem ersten Aufbereitungsschritt –der Langsandsandfiltration- nicht mehr nachgewiesen werden. Da die Konzentration bereits im Rohwasser sehr gering war, kann kein genauer Reduktionsfaktor abgeleitet werden. Schlichter *et al.* (2004) konnten ebenfalls eine vollständige Eliminierung aus Flusswasser bei der Verwendung einer Kombination von Ozonierung und Ultrafiltration (qualitativer Nachweis) während der Trinkwasseraufbereitung beobachten.

Aus der Literatur sind einige Leistungskenndaten bekannt. Donofrio *et al.* (2013) geben an, dass durch eine Ozonierung eine Reduktion um mehr als 6-log Stufen möglich ist. Ebenfalls kann durch UV-A Strahlung eine Abnahme erreicht werden (Fernandez und Pizarro 1996). Nötige Strahlendosen von UV-Licht zur Desinfektion wurden von Wolfe (1990) erarbeitet, wobei *P. aeruginosa* sich als resistenter im Vergleich zu anderen Bakterien herausstellte.

Dennoch kann *P. aeruginosa* häufig in Trinkwassersystemen gefunden werden. Allen und Geldreich (1975) konnten Konzentrationen von bis zu 2.300 KBE/100 ml nachweisen. Dies ist dadurch bedingt, dass das Bakterium sehr lange in Trinkwasser bei niedrigen Nährstoffkonzentrationen überdauern und sich stark vermehren kann (van der Kooij *et al.* 1982). Vor allem die Bildung von Biofilmen und der Übergang in den VBNC-Zustand können hierbei zusätzlich problematisch sein (Moritz *et al.* 2010). Aufgrund der Fähigkeit schon in geringen Konzentrationen Infektionen hervorzurufen und einer angenommenen Unterschätzung des Vorkommens, wird zumindest in medizinischen Bereichen eine Überwachung dieses Parameters im Trinkwasser dringend empfohlen (Exner *et al.* 2010). Zu einer Vermehrung kann auch ein nicht optimaler Einsatz von Haushaltswasserfiltern beitragen (Chaidez und Gerba 2004).

5.9. Vorkommen von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten

Während des Untersuchungszeitraumes konnten thermotolerante *Campylobacter* spp. nur in 35 % der Proben in sehr geringen Konzentrationen von maximal 15 MPN/100 mL nachgewiesen werden. In den Herbst- und Wintermonaten lagen sowohl die Nachweishäufigkeiten als auch die Konzentrationen dabei etwas höher. Im Vergleich zu anderen Studien zeigen sich Nachweisraten im ähnlichen Konzentrationsniveau (Tabelle 42). Bei einer Reihe von Untersuchungen wurde ebenfalls ein vermehrtes Auftreten in der kühleren Jahreszeit festgestellt (Bolton *et al.* 1987; Carter *et al.* 1987; Martikainen *et al.* 1990; Brennhovd *et al.* 1992; St-Pierre *et al.* 2009; Wilkes *et al.* 2011). Diese jahreszeitlichen Effekte scheinen aber nicht ohne weiteres auf jede Stelle übertragbar zu sein beziehungsweise können sie durch andere Faktoren überlagert sein (Rechenburg und Kistemann 2009). Eine mögliche Ursache für die jahreszeitlichen Schwankungen ist eine gesteigerte Empfindlichkeit von *Campylobacter* gegenüber höheren Lichtintensitäten und fehlende Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden (Jones 2001). Die meisten menschlichen Infektionen werden im Gegensatz dazu im Sommer verzeichnet (Abulreesh *et al.* 2006), was wahrscheinlich auf Änderungen der Verhaltensweisen der Wirte zurückzuführen ist (Yun *et al.* 2016).

Als Bestandteil der Darmflora von Wasservögeln sind *Campylobacter* spp. in der Umwelt weit verbreitet und ein Eintrag in offene Gewässer lässt sich kaum vermeiden. Als Quellen lassen sich z. B. Schwärme von Wildvögeln oder Geflügelbetriebe identifizieren (Abulreesh *et al.* 2004; Mughini-Gras *et al.* 2016). Über Kläranlagenabläufe kann ebenfalls ein Eintrag erfolgen (Bolton *et al.* 1987). Die konventionelle Abwasserbehandlung kann dabei die Konzentrationen um 1,75 bis 3,5 log-Stufen verringert (Rechenburg und Kistemann 2009).

Wenn die Temperaturen und der Sauerstoffgehalt niedrig sind, können *Campylobacter* spp. einige Zeit in Gewässern überdauern (Rollins und Colwell 1986; Lund 1996; Buswell *et al.* 1998; Obiri-Danso *et*

al. 2001; González und Hänninen 2012). Ebenfalls stabilisierend wirken sich organische Substrate aus (Tatchou-Nyamsi-König *et al.* 2007). Durch Verdünnungseffekte und UV-Strahlung bzw. das Sonnenlicht und weitere Umweltfaktoren kommt es nach dem Eintrag andererseits schnell zu einer Abnahme der kulturell messbaren Konzentrationen (Obiri-Danso *et al.* 2001). Die Fähigkeit in Wasser zu überdauern, unterscheidet sich dabei zwischen einzelnen Stämmen unterschiedlichen Ursprungs (Cools *et al.* 2003). Diese Einflussfaktoren können auch zu der in dieser Arbeit identifizierten Saisonalität beitragen, die sich in höheren Nachweisraten in den Herbst- und Wintermonaten äußerte. Deutlich erhöhte Werte der Indikatorbakterien *E. coli* und intestinalen Enterokokken scheinen einen Anhaltspunkt für ein mögliches Vorliegen von *Campylobacter* spp. zu liefern. So sind die Nachweisraten und Konzentrationen bei einem zeitweiligen Badeverbot erhöht. Es sind jedoch auch bei niedrigeren Konzentrationen der Indikatorbakterien Nachweise möglich. Das Ableiten einer festen Korrelation ist aufgrund des sporadischen Auftretens problematisch. Brennhovd *et al.* (1992) konnten eine Korrelation mit unterschiedlichen Indikatorbakterien (*E. coli*, Fäkalstreptokokken, Sulfit-reduzierende Clostridien) feststellen. In zahlreichen anderen Untersuchungen konnten jedoch nur schwache (St-Pierre *et al.* 2009) oder keine Zusammenhänge sowohl mit kulturabhängigen Methoden (Carter *et al.* 1987; Arvanitidou *et al.* 1995; Kemp *et al.* 2005) als auch mit kulturunabhängigen Methoden (Hellein *et al.* 2011) festgestellt werden (Vergleich in Abulreesh *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten *Campylobacter* spp. in epilithischen Biofilmen sowie in Sedimenten der Ruhr nicht nachgewiesen werden, möglicherweise aufgrund der hohen Nachweisgrenzen der angewendeten Verfahren. Stanley *et al.* (1998) waren bei Versuchen *Campylobacter* spp. aus epilithischen Biofilmen in Flüssen sowie aus Wasserleitungen zu isolieren ebenfalls nicht erfolgreich. Dennoch lässt sich aus Untersuchungen verschiedener Autoren ableiten, dass Biofilme ein Reservoir dieser Bakterien in aquatischen Systemen darstellen können. Buswell *et al.* (1998) konnten eine sehr viel längere Anwesenheit im Biofilm verglichen mit der Wasserphase aufzeigen. In diesen fand zwar nicht unbedingt eine Vermehrung statt, aber es ist ein Schutz gegen Biozide (Buswell *et al.* 1998) und eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Strömungen gegeben (Ica *et al.* 2012). Vor allem *C. jejuni* wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit Biofilme zu bilden untersucht (Reeser *et al.* 2007), diese ist aber auch für andere Spezies auf unterschiedlichen Oberflächen nachgewiesen worden (Gunther und Chen 2009). Unter aeroben Bedingungen kommt es verstärkt zum Aufbau von Biofilmen, aus denen kontinuierlich hohe Mengen an Zellen wieder an die Wasserphase abgegeben werden (Reuter *et al.* 2010). Biofilm-Zellen haben jedoch nach Entfernung aus dem Zellverband ein schlechteres Überlebensverhalten als planktonisch angezüchtete Zellen, was den Erfahrungen bei anderen Pathogenen widerspricht. Dykes *et al.* (2003) begründen ihre Ergebnisse damit, dass die von anderen Organismen bekannten Mechanismen einer Stressantwort bei *Campylobacter* spp. zu fehlen scheinen. Auch ein Einnisten in Amöben wurde in Zusammenhang mit einer verlängerten Persistenz beobachtet (Axelsson-Olsson *et al.* 2005; Snelling *et al.* 2005). Hierbei kann es auch bei einem intrazellulären Vorliegen des Bakteriums zu einer *Campylobacter*-Infektion beim Menschen kommen (Snelling *et al.* 2008).

Mit einem Anteil von 94 % war *C. jejuni* mit Abstand die häufigste nachgewiesene Spezies, was sich mit der Mehrheit der in Tabelle 42 aufgelisteten Veröffentlichungen deckt. Kemp *et al.* (2005) konnten die Tendenz feststellen, dass bei stehenden Gewässern *C. coli* dominant zu sein scheint, während dies bei fließenden *C. jejuni* ist. Ein Grund für diese Prävalenz kann eine verbesserte Fähigkeit sein unter den gegebenen Umständen zu überdauern, wie es durch Thomas *et al.* (1999) und Korhonen und Martikainen (1991) im Labormaßstab nachgewiesen wurde. Zusätzlich sind die verwendeten Selektivnährmedien auf den Nachweis der bekanntesten Spezies optimiert, sodass ein Vorkommen von weniger verbreiteten Spezies wie *C. lari* oder *C. upsaliensis* unterschätzt werden könnte (Moore *et al.* 2005).

Eine Agglutination mittels Dryspot *Campylobacter* Latex-Test ergab eine ähnlich hohe Bestätigungsrate der Ruhr-Isolate wie die FISH. Dieses entspricht den Erfahrungen von Miller *et al.*

(2008), die unterschiedliche Agglutinationstests miteinander verglichen (PanBio-Campy (jcl) (PanBio Inc., Columbia, MD), the Dryspot *Campylobacter* (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), Microgen M46 *Campylobacter* (Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, Surrey, United Kingdom)). Davon konnte nur bei dem Test von Oxoid keine falsch-positive Agglutination mit nicht-*Campylobacter*-Spezies sichergestellt werden.

5.10. Risikobewertung von thermotoleranten thermotoleranten *Campylobacter* spp. im Ruhrwasser

Mittels QMRA wurden Infektions- bzw. Erkrankungsrisiken einer *Campylobacter*-Enteritis berechnet, die mit dem Baden in der Ruhr einhergehen. Dabei wurde als Worst-case Szenario die maximal kulturell nachgewiesene Konzentration von 15 MPN/100 mL angenommen. Diese würde einer Infektionswahrscheinlichkeit von 4 % im Falle von Erwachsenen und 8 % im Falle von Kindern entsprechen. Da nicht alle Infizierten auch Symptome entwickeln, können daraus anhand von Erkenntnissen aus Expositionsstudien etwas niedrigere Erkrankungswahrscheinlichkeiten von 0,9 % für Erwachsene und 1,8 % für Kinder abgeschätzt werden (Black *et al.* 1988). Das Schwimmen in natürlichen Gewässern wurde als Risikoquelle für *Campylobacter*-Infektionen identifiziert (Koenraad *et al.* 1997; Schönberg-Norio *et al.* 2004), wenn auch in anderer Studie gezeigt wurde, dass das Schwimmen im Meer, Bädern und Seen mit niedrigeren Erkrankungsrisiken einhergeht (Kapperud *et al.* 2003). Übereinstimmend zeigen die Studien jedoch, dass eine private Wasserversorgung bzw. das Trinken von nicht desinfiziertem Wasser gegenüber der öffentlichen Wasserversorgung mit aufwändigeren Aufbereitungsverfahren das Risiko einer Infektion erhöht. Nach Rechenburg und Kistemann (2009) ist mit dem höchsten Erkrankungsrisiko bei Oberflächengewässern mit Mischwasserentlastungen in Sommermonaten und hohen Niederschlagsraten zu rechnen. Es zeigt sich jedoch, dass es schwieriger ist, Ausbrüche zu erfassen, die durch die Nutzung von Freizeitgewässern bedingt sind, als Infektionen über das Trinkwasser. Zusätzlich erschweren die lange Inkubationszeit sowie methodische Defizite des Nachweises im Wasser die Suche nach der Quelle einer *Campylobacter*-Enteritis (Pitkänen 2013).

Häufig werden Wasservögel als Ursache einer Kontamination mit *Campylobacter* diskutiert. Daher wurde ein möglicher Einfluss durch das im Untersuchungsgebiet gelegene Vogelschutzgebiet durch mikrobiologische Untersuchungen abgeklärt. Hierbei konnte kein vermehrter Eintrag festgestellt werden. Darüber hinaus wurde in Studien festgestellt, dass sich die Stämme, die in Wildvögeln gefunden werden, durchaus häufig von klinischen Stämmen unterscheiden (Broman *et al.* 2004). Nur bei einer starken Nähe zum Menschen wurden Ähnlichkeiten festgestellt.

Auch wenn bei den Untersuchungen an der Ruhr keine erhöhten Konzentrationen von *Campylobacter* spp. im Uferbereich nachgewiesen konnten, ist grundsätzlich eine Freisetzung von persistierenden Zellen aus Biofilmen und Sedimenten möglich. Ebenfalls ist es Bolton *et al.* (1999) gelungen *Campylobacter* in Sand von Badestränden nachzuweisen.

Für *Campylobacter* spp. wurde die Gefahr einer Untererfassung durch klassische Kulturmethode bereits häufiger beschrieben. Diese wird durch eine Diskrepanz der mit kulturabhängigen und kulturunabhängigen Methoden ermittelten Konzentrationen deutlich (Rollins und Colwell 1986). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil sich *Campylobacter*-Zellen auch nach mehreren Wochen im nicht kultivierbaren Status (VBNC) noch an die Darmschleimhaut des Wirts anheften (Patrone *et al.* 2013) und Infektionen hervorrufen können (Jones *et al.* 1991). Von einigen Autoren wurde beschrieben, dass durch eine Wirtspassage die Kultivierbarkeit der Zellen abhängig vom Stamm teilweise auch nach mehreren Monaten zurückkehrt (Saha *et al.* 1991; Talibart *et al.* 2000; Baffone *et al.* 2006).

Tabelle 42: Ausgewählte Untersuchungen von *Campylobacter* spp. in Oberflächen- und sonstigen Wässern

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Ruhr, Stadtgebiet Essen Entnahmestellen mit unterschiedlichen lokalen Einflussfaktoren inklusive Baldeysee und einer Rohwasserentnahmestelle im Stadtgebiet Mülheim, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	<u>Maximale Konzentration:</u> 15 MPN/100 mL Nachweisrate: 35 % (70 von 198 Proben)	höhere Nachweisraten in Herbst- und Wintermonaten; Mehrzahl der Isolate als <i>C. jejuni</i> identifiziert	Diese Arbeit (Horstkott <i>et al.</i> 2014; Strathmann <i>et al.</i> 2016)
Flusswasser (Griechenland)	17% von 41 Proben positiv (nur qualitative Messung)	kein Zusammenhang zu untersuchten Indikatorbakterien coliforme Bakterien und Fäkalstreptokokken	(Arvanitidou <i>et al.</i> 1995)
Flusswasser (Norden Griechenlands)	16% von 86 Proben positiv (nur qualitative Messung)	kein Zusammenhang zu coliformen Bakterien/ <i>E. coli</i> und Fäkalstreptokokken; keine Saisonalität	(Arvanitidou <i>et al.</i> 1995) (Arvanitidou <i>et al.</i> 1997)
Oberflächenwasser (Norwegen)	44 % Nachweisrate	ausgeprägte Saisonalität mit höchsten Nachweisraten im Herbst bzw. Abhängigkeit von Wassertemperatur ab 15 °C sehr geringe Nachweisrate; Korrelation mit Indikatorbakterien <i>E. coli</i> , Fäkalstreptokokken, sulfit-reduzierenden Clostridien; 72 % <i>C. jejuni</i> , 22 % <i>C. coli</i> , 3 % <i>C. lari</i>	(Brennhovd <i>et al.</i> 1992)
Oberflächengewässer (Region um Washington, USA)	Nachweisraten: Herbst (55%); Winter (39%); Frühling (25%); Sommer (30%)	keine Korrelation mit coliformen Bakterien / <i>E. coli</i> , Fäkalstreptokokken, heterotrophen Bakterien oder physikalischen Parametern wie Wassertemperatur, pH, Leitfähigkeit; 90 % <i>C. jejuni</i> , 7% <i>C. coli</i>	(Carter <i>et al.</i> 1987):
Oberflächenwasser (Georgia, USA)	62% Nachweisrate	erhöhtes Auftreten nach Einleitung einer Kläranlage und an Stellen mit Land- und Geflügelwirtschaft; positive Korrelation mit Niederschlägen	(Vereen <i>et al.</i> 2013)
Fluss Salmon (British Columbia, Kanada)	Nachweisraten je nach Stelle zwischen 57 % und 32 %	keine Korrelation mit Indikatorbakterien, negative Korrelation mit Niederschlagsraten	(Jokinen <i>et al.</i> 2010)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Swist und Nebenflüsse (Deutschland)	Nachweisrate: 86 % von 101 Proben 31,5 % der positiven Proben > 1.000 KBE/100 mL, 68,5 % < 1.000 KBE/100 mL	höhere Nachweisraten im Sommer nach Starkregenereignissen, höhere Konzentrationen in Mischwasserentlastung; keine Saisonalität	(Rechenburg und Kistemann 2009)
12 Bäche und 13 Flüsse (Quebec, Kanada)	Nachweisrate: 43 %	10 % der privaten Quellen in gleicher Region mit <i>Campylobacter</i> belastet; Höhere Nachweisraten im Herbst; 82 % <i>C. jejuni</i> , 1 % <i>C. coli</i> , 5 % <i>C. lari</i>	(St-Pierre <i>et al.</i> 2009)
ländliche und urbane Oberflächengewässer (Finnland)	Nachweisraten: 5 % - 24 % je nach Jahreszeit	höhere Nachweisraten im Herbst, generell höhere Nachweisraten bei stärkerer Belastung mit Fäkalindikator-Bakterien, trotz ähnlicher Belastung mit Indikatorbakterien aber höhere Nachweisraten in ländlicher Umgebung	(Martikainen <i>et al.</i> 1990)
Flusswasser und Entnahmestelle für Trinkwasseraufbereitung (Frankreich)	in 50 % der Flusswasserproben (in 500 mL) gefunden aber nicht im aufbereiteten Trinkwasser (in 1 L)	71% <i>C. jejuni</i> , 18 % <i>C. coli</i> , 8 % <i>C. lari</i> , hohe genetische Diversität deutet auf mehrere Eintragsquellen hin	(Denis <i>et al.</i> 2011)
Fluss Weiße Elster (Deutschland)	Nachweisrate: 82 % (gewöhnlich weniger als 10 MPN/100 mL)	höhere Konzentrationen durch Wasservögel und Abwässer aus Geflügelhaltung	(Stelzer und Jacob 1991)
Milchlandwirtschaftlich genutztes Gebiet (England)	Nachweisrate: 41 %	<i>C. jejuni</i> am häufigsten bei Fließgewässern und <i>C. coli</i> bei stehenden Gewässern isoliert	(Kemp <i>et al.</i> 2005)
Flusseinzugsgebiete mit landwirtschaftlichem Einfluss und Kontroll-PN Stellen (Kanada)	Nachweisrate: 49 % der Proben positiv (0,4 bis 400 MPN/100 mL)	höhere Konzentrationen in landwirtschaftlich genutzten Gebieten. 45 % <i>C. jejuni</i> , 34 % <i>C. coli</i> , 19 % <i>C. lari</i> 18% andere <i>Campylobacter</i> -Spezies	(Khan <i>et al.</i> 2014)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Flussgebiet (Lancashire, England)	Nachweisraten: 21 % mit MPN-Technik; 43% mit Glasmikrofaser-Filtration.	niedrigste Konzentration in ländlichen Gebieten und Abschnitten mit hohen Strömungsgeschwindigkeiten; Anstieg der Konzentrationen nach Oberflächenablauf von ländlichen Regionen; höchste Konzentrationen nach Kläranlagen-Einleitungen; starke Saisonalität: Herbst/Winter höchste Konzentrationen, Frühjahr/Sommer niedrigste. <i>C. jejuni</i> am häufigsten identifiziert gefolgt von <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i>	(Bolton <i>et al.</i> 1987)
Flusswasser (Norwegen)	Nachweisrate: 53 % (100 mL Proben).	am häufigsten <i>C. coli</i> 44 % danach <i>C. jejuni</i> 35 % und <i>C. lari</i> 15 % identifiziert. Nachweis auch ohne Vorliegen von Fäkalindikatorbakterien	(Rosef <i>et al.</i> 2001)
Badestellen und Kläranlagenabläufe (Finnland)	Nachweisraten: 58% der Badewasserproben und 53 % der Kläranlagenabläufe	<i>C. jejuni</i> häufigste Spezies. negative Korrelation mit Wassertemperatur der Probenahmestelle; kein Zusammenhang mit Fäkalindikatorbakterien	(Hokajärvi <i>et al.</i> 2013)
Flussgebiet (Ontario, Kanada)	Nachweisrate: 25 % (500 mL Proben)	Höhere Nachweisraten bei geringerer Temperatur und Zeiten, in denen gedüngt wird; 84 % <i>C. jejuni</i> , 14 % <i>C. coli</i> ,	(Wilkes <i>et al.</i> 2011)
Fluss Oldman River (Alberta, Kanada)	Nachweisrate: 27 %	76 % <i>C. jejuni</i> , 18 % <i>C. coli</i>	(Jokinen <i>et al.</i> 2011)
Oberflächengewässer und Meerwasser (Nordwest Florida, USA)	Nachweisraten: 38% (68 bis $2,3 \times 10^6$ GU/500 mL) in Oberflächenwasser; 18.2 % in Meerwasser mittels qPCR	keine Korrelation zu Enterokokkenkonzentration	(Hellein <i>et al.</i> 2011)
Flüsse und Seen (Finnland)	Nachweisrate: 17 %	46 % <i>C. jejuni</i> , 25 % <i>C. lari</i> , 4 % <i>C. coli</i>	(Hörman <i>et al.</i> 2004)
gesammeltes Regenwasser (Queensland, Australien)	Nachweisrate: 0,4 %	<i>Campylobacter jejuni</i> mapA Gen mittels PCR	(Ahmed <i>et al.</i> 2010)
Flusswasser (Griechenland)	Kein Nachweis möglich		(Economou <i>et al.</i> 2013)

5.11. Elimination von thermotoleranten *Campylobacter* spp. während der Trinkwasseraufbereitung

Bei der Untersuchung eines Ruhrwasserwerks konnte *Campylobacter* kulturell nach der ersten Aufbereitungsstufe (Langsandsandfiltration) nicht mehr nachgewiesen werden. Aufgrund des sporadischen Nachweises im Rohwasser konnten hierfür keine Eliminationsleistungen der Langsandsandfiltration sowie der weiteren eingesetzten Verfahren abgeleitet werden. Unter Berücksichtigung des Standes der Wissenschaft kann der Aufbereitungsprozess, der zusätzlich noch eine Ozonierung und Desinfektion mittels UV-Strahlung und optionale Chlorung bei besonderen Belastungsereignissen beinhaltet, als geeignet zur Inaktivierung von *Campylobacter* spp. eingestuft werden.

Im Allgemeinen scheint die Eliminationsleistung bezogen auf *Campylobacter* spp. bei der Trinkwasseraufbereitung etwas höher als für den Indikator "coliforme Bakterien" zu sein (Hijnen *et al.* 2004). Aus den gleichen Untersuchungsdaten lässt sich eine Reduktion von *Campylobacter* spp. aus dem Rohwasser mittels Langsandsandfiltration um 3 bis 4-log Stufen ableiten. Nach Blaser *et al.* (1986) und Lund (1996) sind gängige Desinfektionsmethoden mit Einsatz von Chlor oder Monochloramin geeignet zur Inaktivierung von *Campylobacter* spp.. Dies deckt sich mit Erfahrungen, dass bei korrekt durchgeführter Desinfektion keine Ausbruchsfälle durch dieses Bakterium bekannt sind. Ebenfalls kann durch UV-Desinfektion eine gute Reduktionsleistung von etwa 5-log Stufen erreicht werden (Hijnen und Medema 2007).

Murphy *et al.* (2016) identifizierten *Campylobacter* spp. als häufigste bakterielle Ursache einer trinkwasserassoziierten Enteritis. Als besonders groß wurde das Risiko von den Autoren bei der Nutzung privater Brunnen eingeschätzt. Hierbei scheint die Überwachung fäkaler Indikatororganismen nicht immer einen ausreichenden Schutz vor *Campylobacter*-Infektionen zu bieten, da diese bei einigen Ausbrüchen nachweisbar waren (St-Pierre *et al.* 2009). Nicht aufbereitetes Grundwasser konnte ebenfalls von Stanley *et al.* (1998) als Vehikel für eine Infektion identifiziert werden. In diesem Fall wurde der gleiche Typ des Bakteriums bei einer Viehherde einer benachbarten Milchfarm identifiziert.

Smeets *et al.* (2009) entwickelten ein Modell um das Erkrankungsrisiko anhand der Gehalte im Rohwasser abschätzen können, da die Messung im aufbereiteten Trinkwasser schwierig ist. Itoh (2013) berechnete aus der ermittelten Infektionswahrscheinlichkeit von $1,7 \times 10^{-3}$ Infektionen/Person/Jahr die Krankheitslast mittels DALY Konzept sowie die dadurch verursachten Kosten beispielhaft für das gleiche untersuchte Versorgungsgebiet. Die Berechnung sei jedoch mit Unsicherheiten vor allem bei der Infektions- zu Erkrankungsrate, aber auch der Abschätzung der aufgenommenen Dosis verbunden.

Pitkänen (2013) gab nach systematischer Auswertung trinkwasserbedingter Ausbrüche besonders häufig Störungen in der Aufbereitung und Verteilung durch starke Niederschläge und Querkontaminationen an. Darunter auch eine Reihe von Ausbrüchen in Europa mit hohen Fallzahlen innerhalb der letzten Jahre. Hänninen *et al.* (2003) konnten bei Untersuchungen sehr großer Wasservolumina bei Ausbruchsfällen, die mit der Nutzung von unbehandeltem Grundwasser als Trinkwasser zusammenhingen, eine Übereinstimmung zwischen einem Patienten- und einem Wasserisolat feststellen. Somit schlossen sie auf das Trinkwasser als Infektionsquelle. Man geht davon aus, dass *Campylobacter* spp. sich nicht vermehren können, sobald sie ins Trinkwasser gelangen. Ein Überdauern ist aber in Trinkwasser-Biofilmen möglich (Lehtola *et al.* 2006).

5.12. Nachweis von *Salmonella enterica* in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten

Wie *Campylobacter* spp. konnten Salmonellen ebenfalls nur vereinzelt mit einer Rate von 28 % in der Ruhr nachgewiesen werden. Die gemessenen Konzentrationen waren im Allgemeinen gering und lagen unterhalb von 10 MPN/100 mL. Nur bei einer Wasserprobe wurde ein Spitzenwert oberhalb des Messbereichs (> 37 MPN/100 mL) gemessen. Die Daten, die an der Ruhr ermittelt wurden, spiegeln damit sehr gut die Erfahrungen, die bei Untersuchungen an anderen Gewässern gemacht wurden, wider (Tabelle 43).

Bei den ausgewählten Untersuchungsstellen der Ruhr waren vor allem in den Herbst- und Wintermonaten hohe Werte zu verzeichnen. Wie eine Auswertung der Literaturangaben nahelegt, scheint die Saisonalität jedoch von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst zu sein. Ähnliche Saisonalitäten wie bei der Untersuchung der Ruhr beobachteten auch Economou *et al.* (2013) bei der Untersuchung von Oberflächengewässern in Griechenland. Untersuchungen aus Kanada berichteten von einem gehäuftem Auftreten im Frühling (Jokinen *et al.* 2010). Haley *et al.* (2009) und Thomas *et al.* (2013) verzeichneten einen Anstieg der Nachweisraten sowie eine stärkere Diversität im Sommer, besonders in landwirtschaftlich geprägten Regionen. Dies sei durch einen vermehrten Eintrag der Mikroorganismen in diesem Zeitraum zu erklären. Andere Autoren benennen neben Abschwemmung aus landwirtschaftlich genutzten Flächen (Economou *et al.* 2013; Vereen *et al.* 2013) und Einleitungen aus Kläranlagen als eine Hauptquelle (Jokinen *et al.* 2010; Wilkes *et al.* 2011; Economou *et al.* 2013; Vereen *et al.* 2013). Die für die Untersuchungen an der Ruhr ausgewählte Kläranlage konnte nicht mit erhöhten Konzentrationen in Verbindung gebracht werden. Die Nachweisraten von Salmonellen nahmen im Verlauf des Flusses ab, sodass zu vermuten ist, dass entweder ein Großteil des Eintrags flussaufwärts erfolgte oder Faktoren für eine vermehrte Abnahme gegeben sind. Jokinen *et al.* (2011) haben bei ihren Studien *Salmonella* Rubislaw als häufigstes Serovar aus Oberflächenwasser isoliert sowie in Wildvögeln nachgewiesen und so deren Ausscheidungen als weitere mögliche Eintragsquelle identifiziert. Eine messbare Zunahme der Nachweisrate konnte an der Probenahmestelle Polderpumpwerk an der Ruhr, bei der sich ein Vogelschutzgebiet befindet, nicht verzeichnet werden. Niederschläge können ebenfalls einen vermehrten Eintrag von Salmonellen in Gewässer bewirken (Haley *et al.* 2009; Jokinen *et al.* 2010). Die an der Ruhr gemessenen geringen Konzentrationen und seltenen Nachweise erschweren hier eine Beurteilung und es kann nur ein leichter Trend höherer Nachweisraten bei Niederschlagsereignissen festgestellt werden.

In Experimenten zur Temperaturabhängigkeit konnten Rhodes und Kator (1988) zeigen, dass sogar eine Vermehrung von Salmonellen in aquatischen Lebensräumen bei erhöhten Temperaturen möglich sein kann. Hierbei wurde eine Persistenz von mindestens zwei Wochen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Temperatur im Gegensatz zum Indikatorbakterium *E. coli* keine große Rolle bei der Abnahme der Salmonellenkonzentration einnimmt. Es wurde jedoch ein starker Zusammenhang einer Reduktion mit dem Auftreten von Flagellaten und Phagen festgestellt, die bei höheren Temperaturen in größerer Anzahl vorhanden sind. Dies könnte auch für die höheren Nachweisraten in den kälteren Monaten an der Ruhr mitverantwortlich sein.

Aufgrund der bereits sehr niedrigen Konzentrationen in der Wasserphase und der hohen Nachweisgrenzen der verwendeten Methode zur Untersuchung von Sedimenten und epilithischen Biofilmen konnte bei dieser Untersuchung keine Anreicherung in diesen festgestellt werden. Ähnliches traf auch auf eine Beprobung des Uferbereichs und bei aufgewirbeltem Sediment zu. Van Donsel und Geldreich (1971) konnten ebenfalls *Salmonella* spp. aufgrund dieses Problems nicht in den Sedimenten von Erholungsgewässern nachweisen. Ihre Untersuchungen von Schlamm deuten jedoch an, dass eine Anreicherung dieser Pathogene wahrscheinlich ist, vor allem bei bereits hohen Gehalten der Wasserphase. Sha *et al.* (2011) konnten Salmonellen in unterschiedlichen aquatischen Biofilmen mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden nachweisen, auch wenn dies in der Wasserphase nicht möglich war.

Korrelationen mit Indikatorbakterien wurden von den in Tabelle 43 aufgelisteten Autoren unterschiedlich bewertet. Es ist sowohl von Arvanitidou *et al.* (1997), Lemarchand und Lebaron (2003), Bonetta *et al.* (2011) und Economou *et al.* (2013) beschrieben, dass keine direkte Korrelation zwischen den Konzentrationen unterschiedlicher Indikatorbakterien vorzuliegen scheint. Vereen *et al.* (2013) hingegen konnten vermehrt Salmonellen bei hohen Enterokokkengehalten nachweisen. Moriñigo *et al.* (1990), Polo *et al.* (1998) und Jenkins *et al.* (2008) konnten ebenfalls Zusammenhänge zu Indikatorbakterien feststellen. Sie wiesen jedoch ausdrücklich darauf hin, dass auch Nachweise bei geringen Konzentrationen der Indikatoren möglich waren. Laut Moriñigo *et al.* (1990) sei dies vor allem bei *C. perfringens* festzustellen. Polo *et al.* (1999) beschrieben ein vermehrtes Auftreten von *Salmonella*-Serovaren mit klinischer Relevanz bei höheren Gehalten der Indikatorbakterien. Da jedoch die Korrelationen nicht an allen Probenahmestellen zu bestehen scheinen (Jenkins *et al.* 2008), muss bei unterschiedlichen lokalen Gegebenheiten im Einzelnen abgeklärt werden, ob die Verwendung einer Korrelation mit Indikatorbakterien zur Abschätzung der Auftretswahrscheinlichkeit bzw. der Konzentration von *Salmonella* sinnvoll ist, z. B. bei gemeinsamen Punktquellen als Eintragspfad.

Bei den untersuchten Stellen der Ruhr konnte keine klare Korrelation zu den Indikatorbakterien hergestellt werden. Betrachtet man allerdings die Ereignisse, an denen es aufgrund hoher *E. coli* bzw. Enterokokkenkonzentrationen zu einem zeitweisen Badeverbot kommen würde, fällt auf, dass in denselben Proben sowohl die Nachweisraten als auch die gemessenen Konzentrationen im Durchschnitt erhöht sind. Dennoch kommt es auch bei der Ruhr, wie in der Literatur beschrieben, zu einzelnen Spitzenwerten, wenn diese Werte unterschritten werden. Ähnliche Zusammenhänge wurden auch durch Mansilha *et al.* (2010) für Badestellen im Norden Portugals beschrieben. Obwohl es eine Korrelation bei generell schlechter Wasserqualität mit den in hohen Konzentrationen auftretenden Indikatororganismen gab, konnten -wenn auch in geringerer Häufigkeit- an Stellen mit guter oder ausgezeichneter Badewasserqualität Salmonellen nachgewiesen werden.

5.13. Risikobewertung *Salmonella enterica* im Ruhrwasser

Bei einer quantitativen Risikobewertung entspricht der Spitzenwert von > 37 MPN/100 einem Erkrankungsrisiko von $> 3,7\%$, wenn man davon ausgeht, dass ein Liter des Wassers getrunken wird. Wenn man beim Schwimmen eines Erwachsenen nach Dufour *et al.* (2006) 21 mL verschlucktes Wasser in 45 min und 49 mL für ein Kind zugrunde legt, entspräche dies einem Erkrankungsrisiko durch Salmonellen von $> 0,08\%$ beziehungsweise $> 0,2\%$. Dabei wurde aufgrund der nicht bekannten Serovare eine gepoolte Dosis-Infektions Rate für unterschiedliche Serovare zu Grunde gelegt. Diese Werte können jedoch nur eine grobe Orientierung geben, da keine Studiendaten zur Rate der Infektionen und Erkrankungen zur Verfügung stehen. Zusätzlich wurden diese nur unter Berücksichtigung gesunder Männer und Lebensmitteln erhoben zusätzlich können die Dosis-Infektions Raten können je nach vorliegenden Serovaren variieren (Oscar 2004). Xiao *et al.* (2013) ermittelten mit ihrem Berechnungsmodell deutlich niedrigere Infektionsrisiken von etwa 4×10^{-7} bis 3×10^{-5} für das Baden in einem Oberflächengewässer in China.

Die ermittelten Konzentrationen lassen keine Rückschlüsse auf etwaige Konzentrationen nicht kultivierbarer Zellen zu. Es wurde beobachtet, dass Zellen nach 48 h in Flusswasser ihre Kultivierbarkeit verlieren (Roszak *et al.* 1984). Durch einen Schritt mit Wiederbelebungsmedien, in denen wieder Nährstoffe zugesetzt werden, erlangen diese die Kultivierbarkeit jedoch nach mehreren Tagen wieder zurück. Intakte Zellen wurden mikroskopisch sogar über einen sehr langen Zeitraum von 60 Tagen nachgewiesen. Diese potenziell noch infektiösen Zellen können der Risikobewertung nicht zugrunde gelegt werden. Die Ergebnisse von Gorski *et al.* (2011) weisen ebenfalls darauf hin, dass einzelne Stämme über sehr lange Zeiträume nach ihrem Eintrag in wässrigen Umgebungen persistieren können. Ebenfalls zu klären ist, welche Rolle multiresistente Salmonellen spielen, die bereits in exemplarischen Untersuchungen in Freizeitgewässern nachgewiesen wurden (Economou *et al.* 2013).

Tabelle 43: Ausgewählte Untersuchungen von Salmonellen in Oberflächen- und sonstigen Wässern

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Ruhr, Stadtgebiet Essen Entnahmestellen mit unterschiedlichen lokalen Einflussfaktoren inklusive Baldeneysee und einer Rohwasserentnahmestelle im Stadtgebiet Mülheim, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	<u>Maximale Konzentration:</u> >37 MPN/100 mL Nachweisrate: 28 % (54 von 194 Proben)	höhere Nachweisraten in Herbst- und Wintermonaten; Abnahme von Nachweisrate und Konzentrationen im Flussverlauf	Diese Arbeit (Horstkott <i>et al.</i> 2014; Strathmann <i>et al.</i> 2016)
Flüsse und Seen (Norden Griechenlands)	Nachweisrate: 6 %	keine Korrelation mit Indikatorbakterien	(Arvanitidou <i>et al.</i> 1997)
Fluss Salmon (British Columbia, Kanada)	Nachweisraten: Winter 13%, Frühling 20 %, Sommer 2%, Herbst 18 %	positive Korrelation mit Niederschlägen, Quelle häusliche Abwässer	(Jokinen <i>et al.</i> 2010)
Fluss Oldman River (Alberta, Kanada)	Nachweisraten: 8,5 % in Oberflächenwasser, 18,6 % in häuslichen Abwässern		(Jokinen <i>et al.</i> 2011)
Oberflächenwasser (Georgia, USA)	Nachweisrate: 43 %	Zusammenhang mit hohen Konzentrationen von Enterokokken, häufiger an Stellen mit Geflügelwirtschaft und nach Kläranlageneinleitung nachgewiesen	(Vereen <i>et al.</i> 2013)
Oberflächenwasser (Alberta, Canada)	Nachweisrate: 8 % (500 mL Wasserproben)	Einleitungen haben größten Einfluss auf Aufreten von Salmonellen	(Wilkes <i>et al.</i> 2011)
Flusswasser (Griechenland)	Nachweisraten: von 0 % bis 25 % (abhängig von der Entnahmestelle, 1 L Wasserproben)	multiresistente Salmonellen gefunden, keine Korrelation mit Indikatororganismen, Saisonalität mit höheren Nachweisraten im Winter, Tendenz höherer Nachweisraten flussabwärts nach Einleitungen von Kläranlagen und bei landwirtschaftlichen Einflüssen	(Economou <i>et al.</i> 2013)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Wassereinzugsgebiet mit See (Georgia, USA)	bis zu 3,4 MPN/L	nur am Zulauf des Sees Korrelation mit Indikatorbakterien, Ablauf höhere Konzentrationen, obwohl Indikatorbakterien nicht nachweisbar waren, Kombination aus kultureller Anreicherung und anschließendem Nachweis mittels PCR im MPN-Format	(Jenkins <i>et al.</i> 2008)
Landwirtschaftliche Region (Kalifornien, USA)	Nachweisrate: 7 %	einige Stämme über mehrere Monate nachgewiesen (persistieren in dieser Umgebung)	(Gorski <i>et al.</i> 2011)
Oberflächengewässer in Georgia, USA	25 bis 363 MPN/100 mL Nachweisrate: 79,2 %,	Korrelation mit Niederschlag ein bis zwei Tage vor Messung, Höhere Konzentrationen und Diversität in Serotypen im Sommer, Starke landwirtschaftliche Prägung der Region	(Haley <i>et al.</i> 2009)
Gewässer mit Einleitungen von industriellen und häuslichen Abwässern (Malaga, Spanien)	Nachweisrate: 70 %	hohe Nachweisraten auch bei geringer Kontamination, Korrelation mit <i>E. coli</i> und vor allem <i>C. perfringens</i>	(Moriñigo <i>et al.</i> 1990)
Urbane und landwirtschaftlich geprägte Flüsse im Einzugsgebiet des Grand River (Ontario, Kanada)	Nachweisrate: 78 %	höhere Nachweisraten und Diversität in den warmen Monaten	(Thomas <i>et al.</i> 2013)
Unterschiedliche Fließgewässer (Georgia, USA)	Nachweisraten: in durchschnittlich belasteten Gewässern 65 %, in leicht belasteten 38 % und in unbelasteten Bächen 44%	60 % mehr positive Nachweise bei Verwendung von fluoreszenzgefärbten Antikörpern als mit kulturellen Methoden	(Cherry <i>et al.</i> 1972)
Verschiedene Gewässer (Nord-Ost Spanien)		bei Vorliegen von hohen Konzentrationen der Indikatorbakterien vermehrt Serovare mit klinischer Relevanz vorhanden. Dennoch auch bei geringen Konzentrationen der Indikatorbakterien positive Nachweise von Salmonellen möglich.	(Polo <i>et al.</i> 1999)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fließgewässer (Umgebung des Lago Brugneto, Italien)	Nachweisrate: 33 % (1 L Wasserproben)	keine Korrelation mit Indikatorbakterien, Nachweis mittels PCR nach Filtration und Voranreicherung	(Bonetta <i>et al.</i> 2011)
Wassereinzugsgebiet (Nord-Ost Georgia, USA)	Durchschnittlich 0,1 MPN/L durch Untersuchung großer Volumina (20L) in Kombination mit Bestätigung mittels PCR		(Jenkins <i>et al.</i> 2008)
Verschiedene Gewässer (Nord-Ost Spanien)	Nachweisraten: 59% (Flusswasser), 6 % (Meerwasser)	Korrelation mit Indikatorbakterien, aber Salmonellen auch nachgewiesen, wenn niedrige Konzentrationen von Indikatorbakterien vorhanden waren	(Polo <i>et al.</i> 1998)
gesammeltes Regenwasser (Queensland, Australien)	6,5 x 10¹ bis 3,8 x 10² GU/L Nachweisrate: 11 %	quantitative Risikobewertung durchgeführt, Nachweis mittels PCR invA-Gen	(Ahmed <i>et al.</i> 2010)
Küstenfluss Tech (Südfrankreich)	0,6 - 425 MPN/L Nachweisrate: 100 %,	keine Korrelation mit Indikatoren, höhere Konzentrationen nach Einleitungen aus Kläranlagen und in landwirtschaftlich genutzten Gebieten	(Lemarchand und Lebaron 2003)
Verschiedene Gewässer (Nord-Portugal)	Gesamtnachweisrate: 23 % 15.6% Küstengewässer (69/441); 57 % Binnen- und Übergangsgewässer (56/99)	bei Badestellen der Einstufung „Mangelhaft“ oder „Ausreichend“ war eine gute Korrelation mit Indikatororganismen gegeben. Bei den Einstufungen „Gut“ und „Ausgezeichnet“ war keine hohe Korrelation zu beobachten. Trotz niedriger Gehalte der Indikatorbakterien war ein positiver Befund von Salmonellen bei 9 % der Stellen mit ausgezeichneter Qualität und 14 % der Stellen mit guter Qualität gemäß EU-Badegewässerrichtlinie zu beobachten	(Mansilha <i>et al.</i> 2010)

5.14. Elimination von *Salmonella enterica* während der Trinkwasseraufbereitung

Im untersuchten Wasserwerk an der Ruhr konnten Salmonellen schon im Rohwasser allenfalls sporadisch nachgewiesen werden. Bereits nach der Langsandsandfiltration konnte *Salmonella enterica* nicht mehr kulturell nachgewiesen werden. Da der Aufbereitungsprozess mehrere Reinigungs- und Desinfektionsschritte umfasst, bei denen aus unterschiedlichen Untersuchungen gute Eliminationsleistungen bekannt sind, ist davon auszugehen, dass das Infektionsrisiko durch Salmonellen äußerst gering ist.

Salmonella enterica zeigt sich resistenter gegenüber Sonnen- bzw. UV-Strahlung als der Indikator *E. coli* (Berney *et al.* 2006). Mit Hilfe von UV-Strahlung lässt sich dennoch eine Abnahme um bis zu 6 log-Stufen erreichen und inaktivierte Zellen waren im Laborversuch nicht mehr infektiös (Smith *et al.* 2000). Im Bereich der mobilen Wasseraufbereitung konnten Rodda *et al.* (1993) eine Eliminationsleistung von 8 log-Stufen bei der Verwendung von kombinierten Chlor-Flockungs-Tabletten und *Salmonella Typhi* ermitteln. Bei einer Chlorung allein scheint eine Abnahme von 5 bis 6 log-Stufen möglich zu sein (Coulliette *et al.* 2013). Nach der Wasserbehandlung ist auf eine sichere Speicherung des Trinkwassers zu achten, denn Salmonellen, die durch Querkontamination eingetragen wurden, können lange Zeit überdauern oder sich sogar vermehren (Djaouda *et al.* 2013).

Kontaminations- und Infektionsfälle sind zum Beispiel bei nicht ausreichend geschützten Eigenversorgungsanlagen bekannt (Kozlica *et al.* 2010). Angulo *et al.* (1997) untersuchten einen trinkwasserbedingten Ausbruch in den USA und verdeutlichten die Bedeutung einer Aufklärung der Verbraucher, damit ein Abkochgebot ordnungsgemäß in den Haushalten umgesetzt wurde und weitere Infektionen vermieden werden konnten.

5.15. Nachweis von *Legionella* spp. in Oberflächenwässern und deren Grenzschichten

Legionellen sind natürlicherweise in aquatischen Systemen sehr weit verbreitet. Sie sind dabei in 40 % der Süßwasserlebensräume kulturell und in 80 % mittels PCR nachweisbar (Fields *et al.* 2002). Genauere Daten zum Vorkommen unter unterschiedlichen Bedingungen sind in Tabelle 44 dargestellt. Im Ruhrwasser war ein kultureller Nachweis nur in einer von 60 Oberflächenwasserproben in Höhe von 83 KBE/100 mL möglich.

Mittels qPCR hingegen konnten deutlich höhere Konzentrationen zwischen $7,0 \times 10^2$ GU/100 mL und $1,4 \times 10^5$ GU/100 mL mit einem Median von $3,6 \times 10^4$ GU/100 mL ermittelt werden. Dabei war die Spezies *Legionella* in 26 von 60 untersuchten Proben in Konzentrationen von bis zu $1,8 \times 10^4$ GU/100 mL nachweisbar. Anhand dieser ermittelten Konzentrationen lässt sich jedoch keine Aussage treffen, ob es sich um vermehrungsfähige Zellen handelt bzw. ob noch Infektionen hervorgerufen werden können. Daher wurde eine Stichprobe im August/September 2014 mittels PMA-qPCR untersucht. Der dabei ermittelte Anteil vitaler Zellen von *Legionella* spp. lag zwischen 3 % und 89 % (Median 18 %). Es konnten dabei keine vitalen Zellen der Spezies *L. pneumophila* nachgewiesen werden. In Biofilmen und Sedimenten zeigte sich bei den Gehalten von *Legionella* spp. mit molekularbiologischen Methoden eine Anreicherung, wobei der Anteil der vitalen Zellen stark schwankte.

Ähnliche Ergebnisse konnten von unterschiedlichen Autoren auch an anderen Gewässern gewonnen werden (siehe Tabelle 44). Auch wenn ein Nachweis von *Legionella* spp. in allen der untersuchten Lebensräume mit kulturunabhängigen Methoden erfolgreich war, konnten häufig mittels klassischen kulturellen Nachweises keine Legionellen isoliert werden.

Tabelle 44: Ausgewählte Untersuchungen von Legionellen in Oberflächen- und sonstigen Wässern

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Fluss Ruhr, Stadtgebiet Essen Entnahmestellen mit unterschiedlichen lokalen Einflussfaktoren inklusive Baldeneysee und einer Rohwasserentnahmestelle im Stadtgebiet Mülheim, (Nordrhein-Westfalen, Deutschland)	<p><i>Legionella spec.</i> <u>kulturell:</u> 83 KBE/100 mL in einer von 60 Proben (2 %). <u>mittels qPCR:</u> 7,0 x 10² GU/100 mL bis 1,4 x 10⁵ GU/100 mL Median: 3,6 x 10⁴ GU/100 mL Nachweisrate: 100 % (60 Proben)</p> <p><i>L. pneumophila</i> <u>kulturell:</u> kein Nachweis (60 Proben) <u>mittels qPCR:</u> bis 1,8 x 10⁴ GU/100 mL Nachweisrate: 43 % (26 von 60 Proben)</p>	keine Unterschiede zwischen Probenahmestellen oder Saisonalitäten zu beobachten; leicht höhere Konzentrationen im Frühjahr; bei stichprobenartiger Überprüfung des qPCR Nachweises zwischen 3 % und 89 % vitale Zellen im Falle von <i>Legionella spec.</i> ; bei <i>L. pneumophila</i> konnten keine vitalen Zellen gefunden werden.	Diese Arbeit
Fluss Tech (Frankreich)	<p><u>kulturell (GVPC):</u> 14 bis 58 KBE/100 mL Nachweisrate: 21 % <u>mittels PCR:</u> Konzentrationen oberhalb der Quantifizierungsgrenze Nachweisrate: 100 % <i>Legionella</i> spp. über gesamten Flussverlauf nachweisbar;</p>	Gleichzeitiger Nachweis mit Kulturmethoden, qPCR und Sequenzierungsmethoden; <u>Kulturmethode:</u> Alle erhaltenen Kolonien als <i>L. pneumophila</i> identifiziert; <u>Molekularbiologische Methoden:</u> Bei unverdünnten Proben Inhibition der PCR-Reaktion; im Gegensatz zu Kulturmethode hohe Diversität auch Nahe der Quelle nachgewiesen; Dabei auch viele Sequenzen verwandt mit bislang nicht kultivierten Legionellen; Einleitungen in den Fluss hatten wenig Einfluss auf Diversität; <i>L. pneumophila</i> in jeder Probe nachgewiesen	(Parthuisot <i>et al.</i> 2010)
67 Flüsse und Seen (USA)	Nachweisrate <i>L. pneumophila</i> : 100 % (793 Proben; 20 L)	fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit markierten Antikörpern; <i>Legionella</i> spp. als natürlichen Teil der aquatischen Umwelt in einem großen Bereich von Umweltbedingungen erkannt; höhere Infektionsraten von Wasserproben im Tiermodell in den Sommermonaten	(Fliermans <i>et al.</i> 1981)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
tropische Oberflächengewässer (Süß- und Salzwasser; Puerto Rico)	10³ bis 10⁷ Zellen/100 mL	fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit markierten Antikörpern; Korrelation von Konzentrationen mit Sulfaten, Phosphaten und pH und höchste Werte in abwasserbelastetem Küstengewässer	(Ortiz-Roque und Hazen 1987)
Ausbruchssituation Fluss Glomma (Norwegen)	maximale Konzentration im Flusswasser 1,9 × 10⁴ KBE/100 mL ; Einleitung von belasteter Kläranlage 10³ KBE/100 mL ; in Belebungsbecken der Kläranlage >10⁹ KBE/100 mL	ausbruchsrelevante Stämme nach Einleitung einer Kläranlage in nachgewiesen	(Olsen <i>et al.</i> 2010)
Flusswasser und Grundwasser, das als Rohwasser zur Trinkwasseraufbereitung genutzt wird (Niederlande)	<u>kulturell</u> : kein Nachweis (Nachweisgrenze von 100 KBE/100 mL und BCYE+AB); <u>mittels qPCR</u> Konzentration von <i>Legionella</i> spp. höher als 10⁵ Genkopien 16S rRNA/100 mL im Oberflächenwasser;	Oberflächenwasserproben wurden Januar und Februar bei sehr niedrigen Wassertemperaturen entnommen; Anteil von <i>L. pneumophila</i> 0,1 % bis 1 % an der Legionellenkonzentration	(Wullings und van der Kooij 2006)
Fluss Itanhâm, Atlantischer Regenwald (Brasilien)	<u>kulturell</u> kein Nachweis (1 L Probe); <u>mittels PCR</u> Nachweis (ohne Konzentrationsangabe)	flussaufwärts (sauberes Wasser) dominiert <i>L. pneumophila</i> ; moderat durch Abwasser belastet flussabwärts mit höherer Diversität der Spezies	(Carvalho <i>et al.</i> 2007)
Süßwasserseen, Keller Halbinsel, (Südliche Shetlandinseln, Antarktis)	<u>kulturell</u> kein Nachweis (sporadischer Nachweis mittels Co-Kultur mit Amöben); <u>mittels PCR</u> Nachweis (ohne Konzentrationsangabe)	molekularbiologischer Nachweis bei extrem kalten Bedingungen	(Carvalho <i>et al.</i> 2008)

Untersuchungsbereich	Nachweisraten/Konzentrationen	Auffälligkeiten	Literatur
Seen, die für die Kühlung von Kraftwerken genutzt werden (nahe Pałnów und Konin, Polen)	<u>mittels FISH:</u> <i>Legionella</i> spp. Wasser: $1,5 \times 10^5$ Zellen/100 mL bis $4,5 \times 10^5$ Zellen/100 mL; Biofilm: $3,0 \times 10^5$ Zellen/100 mL bis $2,0 \times 10^6$ Zellen/100 mL; <i>L. pneumophila</i> max $3,0 \times 10^5$ Zellen/100 mL; Biofilm: $1,5 \times 10^5$ Zellen/100 mL bis $2,3 \times 10^5$ Zellen/100 mL	künstlich erhöhte Temperatur des Gewässers, Anreicherung im Biofilm, saisonale Schwankungen	(Żbikowska <i>et al.</i> 2014)
Regenwasser und Pfützen (Tokyo, Japan)	<u>kulturell</u> kein Nachweis von <i>L. pneumophila</i> in Regenwasser; Nachweisrate: 39% in Proben von Wasser aus Pfützen <i>L. pneumophila</i> (häufigste Spezies)	vor allem häufig nachgewiesen bei warmem Wetter	(Sakamoto <i>et al.</i> 2009)
gesammeltes Regenwasser (Queensland, Australien)	<u>mittels PCR</u> Nachweisrate von <i>L. pneumophila</i> : 5,6%; $6,0 \times 10^1$ bis $1,7 \times 10^2$ GU/L	QMRA für verschiedene Szenarios durchgeführt	(Ahmed <i>et al.</i> 2010)
Grundwasser für die Trinkwasseraufbereitung	<u>kulturell</u> kein Nachweis <u>mittels qPCR (<i>Legionella</i> spp.):</u> Bei niedrigem Gehalt an organischen Verbindungen $2,9 \times 10^3$ GU / 100 mL; Bei hohem Gehalt an organischen Verbindungen $2,5 \times 10^4$ GU / 100 mL	hohe Diversität bei niedrigem Gehalt an organischen Verbindungen und geringe Diversität bei hohem Gehalt an organischen Verbindungen	(Wullings <i>et al.</i> 2011)
Abwasserbehandlung und Einleitung in Küstengewässer (Miami, Florida, USA)	<u>kulturell</u> Nachweis von <i>Legionella</i> spp. Rohabwasser 10 KBE/mL , nach Primärbehandlung 33 KBE/mL , nach Sekundärbehandlung 500 KBE/mL	Legionellen finden gute Vermehrungsbedingungen während der Abwasserbehandlung vor und können über den Kläranlagenablauf in Gewässer eingetragen werden	(Palmer <i>et al.</i> 1993)

5.16. Risikobewertung von *Legionella* spp. im Ruhrwasser

Da sich Legionellen im Großteil des Jahres bei den vorliegenden Wassertemperaturen nicht stark vermehren, geht man hauptsächlich von einem Eintrag durch Kläranlagenabläufe oder Rückstände von stärkerem Wachstum in den Sommermonaten aus (Medema *et al.* (2004) wie in Wullings und van der Kooij (2006) zitiert). Die Erreger können dabei über einen sehr langen Zeitraum von über sechs Monaten im Süßwasser infektiös bleiben (Mendis *et al.* 2015). Durch Aufwirbeln der Luft-Wasser Grenzschicht kann es zu Aerosolbildung der darin enthaltenen Biofilme inkl. Legionellen kommen (Declerck 2010). Diese sind vor allem dort aufgrund der Erwärmung der Oberfläche und Aufnahme durch grasende Protozoen in besonders hoher Anzahl vorhanden (Rogers *et al.* 1994; Declerck *et al.* 2007). *L. pneumophila* kann anschließend noch bis zu zwei Stunden im Aerosol infektiös bleiben (Hambleton *et al.* 1983). Es wird davon ausgegangen, dass bereits eine Dosis von 50 KBE bis 100 KBE ein Erkrankungsrisiko bedingt (Jyoti *et al.* 2010). Da keine Routineüberwachung dieses Erregers durchgeführt wird, kann ein erhöhtes Risiko durch Legionellen meist erst durch Ausbrüche bemerkt werden (Phin *et al.* 2014).

Eine Infektion erfolgt vor allem über die Inhalation Legionellen-haltiger Aerosole. Eine Expositions-dosis konnte bisher nicht aus Expositionsstudien Badender abgeleitet werden, da diese in der Regel nur für die Bewertung fäkal-oral übertragbarer Erreger konzipiert sind. Für andere Anwendungsgebiete wie Whirlpools (Armstrong und Haas 2007) oder Duschen (Storey *et al.* 2004) sind QMRA-Konzepte entwickelt worden. Da sich die Umfelder stark unterscheiden, lassen sich diese Modelle jedoch nicht oder nicht vollständig übertragen. Auch wenn ein Risiko nicht quantitativ beziffert werden kann, sind daher hohe Legionellenkonzentrationen als kritisch zu werten, wenn das Gewässer zum Baden genutzt werden soll.

Im Untersuchungszeitraum ist das Risiko durch Legionellen mit einer ermittelten Spitzenkonzentration von 83 KBE insgesamt für den Badebetrieb als eher gering einzustufen. Andere Verwendungszwecke, bei denen es zu einer starken Vermehrung und Aerosolbildung (insbesondere bei hohen Wassertemperaturen) kommen kann, sind hingegen mit einem erhöhten Risiko verbunden (z. B. Verwendung von Oberflächenwasser als Nutzwasser zum Betrieb von Verdunstungskühlanlagen). Eine Orientierung zu Bewertungen von Legionellenkonzentrationen für diese Anwendungen können Veröffentlichungen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) geben (Dericks 2016). Ebenfalls sollte mit einbezogen werden, wie hoch das Risiko von Minderbefunden durch eine mangelnde Kultivierbarkeit ist. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen legen nahe, dass bei den Untersuchungen an der Ruhr mit einer Untererfassung zu rechnen ist. Es wurden durch einige Autoren bereits Legionelleninfektionen nach Beinahe-Ertrinken beschrieben, obwohl im Fluss selbst keine Legionellen nachweisbar waren (Farrant *et al.* 1988; Faris *et al.* 2005).

5.17. Elimination von *Legionella* spp. während der Trinkwasseraufbereitung

Oberflächenwasser wird häufiger als andere Rohwasserquellen mit Legionellennachweisen in Verbindung gebracht (Den Boer *et al.* 2008). Mit den gängigen kulturbasierten Methoden sind in der Regel keine Nachweise im Trinkwasser und den einzelnen Aufbereitungsstufen möglich (Wullings und van der Kooij 2006). Daher basieren die verfügbaren Daten zu Aufbereitungsprozessen häufig auf Untersuchungen mit kulturunabhängigen Methoden.

Tison und Seidler (1983) untersuchten verschiedene Aufbereitungsmethoden, die eine Reduktion der Zellzahlen von *Legionella* spp. um eine bis zwei log-Stufen bewirkten. Darunter Wasseraufbereitungsanlagen, die nur eine Chlorung beinhalteten sowie Verfahrenskombinationen aus Chlorung und Langsandsandfiltration sowie Flockungs- oder Mehrschichtfiltration mit anschließender Chlorung. Die Zellen wurden bei diesen Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Es gab dabei jedoch keine Anzeichen von Viabilität oder Virulenz im Trinkwasser innerhalb des

Aufbereitungsprozesses. Mit kulturbasierten Methoden konnten Legionellen nicht nachgewiesen werden.

Lin *et al.* (2014) konnten ebenfalls mittels PCR-Methode eine Abnahme von Legionellen während des Aufbereitungsprozesses und eine Anreicherung der Legionellen in den Biofilmen der Langsandsfilter feststellen. Bei Filtrationsmethoden sollte immer beachtet werden, dass es je nach Betriebsbedingungen auch zu einer Vermehrung von Legionellen kommen kann (Schwartz *et al.* 1998; Calvo-Bado *et al.* 2003; Wullings und van der Kooij 2006). Durch eine Ozonierung ist hingegen von einer mäßigen Reduktion um ca. eine log-Stufe auszugehen (Wullings und van der Kooij 2006).

Nach dem Eintrag von Legionellen in Trinkwassersysteme können sie sich in Biofilmen einnisten, wo sie vor äußeren Einflüssen geschützt lange überdauern und sich bei geeigneten Bedingungen vermehren können (Moritz *et al.* 2010; Schwartz *et al.* 1998).

5.18. Weitere wichtige wasserbürtige Pathogene

Für eine umfassende Risikobewertung ist es nötig, nicht nur die hier in dieser Arbeit ermittelten Daten einzubeziehen, sondern auch ein Vorkommen weiterer, nicht untersuchter hygienisch relevanter Mikroorganismen abzuwägen. Hierzu stehen Daten anderer Autoren teils für dasselbe Untersuchungsgebiet zur Verfügung, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Weitere bakterielle Pathogene mit einer Assoziation zur Nutzung von Freizeitgewässern sind z. B. pathogene *E. coli*-Stämme wie *E. coli* O157: H7 (Keene *et al.* 1994), *Shigella* spp. (Moore *et al.* 1993) oder atypische Mykobakterien (Fang *et al.* 2018). Eine gesonderte Bewertung von Cyanobakterien ist bei Oberflächengewässern vorzunehmen, die geeignete Vermehrungsbedingungen bieten. Viele Spezies der Cynaobakterien sind in der Lage Toxine zu bilden (z. B. Microcystin), die durch unterschiedliche Mechanismen Organe und Nerven schädigen können (Falconer 1999).

Neben bakteriellen Erregern besteht durch die Nutzung von Oberflächengewässern auch eine Exposition gegenüber Viren. Unter anderem wurden dabei Enteroviren, Noroviren, Astroviren, Rotaviren, Adenoviren und Hepatitis A und E mit wasserbedingten Ausbrüchen in Zusammenhang gebracht (Wyn-Jones und Sellwood 2001). Der Eintrag kann zum Beispiel durch Kläranlagenabläufe erfolgen. Viren finden aber auch in tierischen Wirten Reservoirs. In der Regel sind beim Nachweis in Wasser Saisonalitäten zu erkennen, wobei Noroviren im Winter häufiger nachgewiesen werden, Enteroviren hingegen in wärmeren Monaten. Mit dem Auftreten von Adenoviren ist ganzjährig zu rechnen (Selinka *et al.* 2011).

Im Untersuchungsgebiet dieser Arbeit konnten in einer parallelen Studie in fast allen Proben Adenoviren nachgewiesen werden; gefolgt von humanen Papillomaviren in mehr als der Hälfte der Proben. Etwas seltener wurden Enteroviren, Norovirus GII und Rotavirus gefunden, wobei im Falle von Norovirus GII eine im Gegensatz zu Selinka *et al.* (2011) erhöhte Nachweishäufigkeit innerhalb der Badesaison zu verzeichnen war (Timm *et al.* 2016). In Biofilmen und Sediment der Ruhr scheinen sich Coliphagen und humanpathogene Viren anzureichern (Mackowiak *et al.* 2018). Die Risikoabschätzung von Viren in Oberflächenwasser ist dabei komplex, da ein Nachweis sowie die Bewertungskriterien häufig nicht standardisiert sind (Seidel *et al.* 2016). Das Vorkommen von Viren sollte ebenfalls in die Beurteilung der Rohwasserqualität mit einbezogen werden. Unbehüllte Viren sind dabei von besonderem Interesse, da sie eine höhere Desinfektionsmittelresistenz besitzen (Selinka *et al.* 2011).

Parasitische Protozoen wurden ebenfalls im selben Untersuchungsgebiet und Zeitraum dieser Arbeit nachgewiesen. Bei Untersuchungen von Proben zu je 100 L wurden *Giardia* spp. an 80 % und *Cryptosporidium* spp. an 29 % der Zeitpunkte in niedrigen Konzentrationen gefunden. Diese Erreger können gastrointestinale Erkrankungen hervorrufen (Strathmann *et al.* 2016). Des Weiteren werden Meningoencephalitis-Erkrankungen durch das Protozoon *Naegleria* ebenfalls mit natürlichen

Gewässern in Verbindung gebracht (Moore *et al.* 1993). Hierzu liegen für das Untersuchungsgebiet keine genaueren Informationen zum Vorkommen vor.

Selbach *et al.* (2016) beschreiben das Risiko einer Badedermatitis an der Ruhr hervorgerufen durch Vogelschistosomen. Die Erkrankung verläuft in der Regel harmlos und ist durch Zerkarien bedingt, die in die Haut eindringen und eine Immunreaktion hervorrufen. Diese wurden auch in niedrigen Raten im Untersuchungsgebiet nachgewiesen.

5.19. Korrelation der untersuchten pathogenen Bakterien mit Indikatorbakterien

In der EU-Badegewässerrichtlinie bzw. der NRW-Badegewässerverordnung werden Indikatorbakterien zur Bewertung der Wasserqualität genutzt. Diese sind *E. coli* und intestinale Enterokokken, die den Eintrag von fäkal belastetem Wasser durch Punkt- oder diffuse Quellen abbilden sollen. Enterokokken sind hierbei widerstandsfähiger gegenüber Umwelteinflüssen als *E. coli* (Anderson *et al.* 2005). Bei einer systematischen Auswertung fanden Wu *et al.* (2011) und Korajkic *et al.* (2018) jedoch einen Anteil von einem Drittel bis eine Hälfte der Studien, die gegen eine ausreichende Korrelation der Pathogene mit Indikatorbakterien sprachen. Neben verlässlichen Korrelationen werden noch eine Reihe weiterer Anforderungen an Indikatoren gestellt: Sie sollten möglichst viele unterschiedliche lokale Einflussfaktoren und Ereignisse abbilden können. Die Zusammenhänge sollten durch epidemiologische Studien gut untersucht sein. Und es sollten zuverlässige Nachweismethoden zur Verfügung stehen (Boehm *et al.* 2009).

Ein Hauptkritikpunkt bei den in der Badegewässerrichtlinie festgelegten Anforderungen ist ein schlecht gewähltes Konzentrationsverhältnis von *E. coli* und intestinalen Enterokokken. Dabei seien die Grenzwerte für Enterokokken zu hoch angesetzt. Es sei zu erwarten, dass Einstufungen fast immer aufgrund des Gehaltes an *E. coli* vorgenommen würden (Dizer *et al.* 2005). Ebenfalls ist regelmäßig zu beobachten, dass das Wasser Pathogene enthalten kann, auch wenn die Kriterien der Badegewässerrichtlinie erfüllt sind (Schets *et al.* 2011).

Die Badegewässerrichtlinie definiert Grenzwerte, bei deren mehrmaliger Überschreitung ein zeitweiliges Badeverbot zu verhängen ist. Dieses ist bei einem Gehalt an *E. coli* von 1.800 KBE bzw. MPN/100 mL und/oder intestinalen Enterokokken von 800 KBE bzw. MPN/100 mL der Fall. An Probenahmeterminen, bei denen diese sehr hohen Konzentrationen überschritten wurden, lässt sich ein leichter Trend zu höheren Konzentrationen der Pathogene *Aeromonas* spp. und *P. aeruginosa* erkennen. Auch in dieser Arbeit konnte jedoch keine direkte Korrelation der Konzentrationen von Indikatorbakterien und untersuchten pathogenen Bakterien festgestellt werden.

Andere Autoren konnten ebenfalls häufig einen Zusammenhang zu den Gehalten von Aeromonaden finden (Wu *et al.* 2011). Ähnlich wie bei den überwachten Entnahmestellen fanden auch Guimarães *et al.* (1993) und Thorolfsdottir und Marteinson (2013) zwar häufiger *P. aeruginosa*, wenn ebenfalls erhöhte Konzentrationen der Indikatorbakterien gemessen wurden. Allerdings wurde das Bakterium aber auch während der Abwesenheit der Indikatorbakterien nachgewiesen.

Bei den Gehalten der obligat pathogenen Bakterien *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. lassen sich Tendenzen aufgrund des temporären Auftretens nur schwer ableiten. In beiden Fällen zeigten sich sowohl leicht erhöhte Nachweisraten als auch Konzentrationen bei extrem hohen Konzentrationen der Indikatoren. Dennoch waren einzelne Spitzenkonzentrationen auch an den übrigen Untersuchungsterminen zu beobachten, bei denen die Grenzwerte nicht überschritten wurden.

Ähnliche Erfahrungen finden sich auch in der Literatur wieder. Mansilha *et al.* (2010) konnten Salmonellen bei guter Gewässerqualität nachweisen ohne eine proportionale Relation zu Konzentrationen der Indikatorbakterien (Lemarchand und Lebaron 2003). Dennoch lässt sich häufig ein Zusammenhang zwischen erhöhten Werten von Indikatorbakterien und einem Nachweis von Salmonellen feststellen (Wilkes *et al.* 2009; Gemell und Schmidt 2013).

Hörman *et al.* (2004) leiten aus der Abwesenheit von Fäkalindikatoren ein geringeres Risiko einer Infektion mit *Campylobacter* spp. ab. Eine direkte Korrelation zwischen den Konzentrationen sei aber auch für diese Bakteriengruppe nicht erkennbar. Es gibt jedoch Hinweise, dass hohe Gehalte von Indikatorbakterien mit häufigeren Nachweisen zusammenhängen (Wilkes *et al.* 2009), besonders wenn diese mit starken Niederschlägen zusammenfallen (Hellein *et al.* 2011).

E. coli scheint als Indikator für diese beiden Bakterienarten etwas besser geeignet zu sein als intestinale Enterokokken (Wilkes *et al.* 2009), auch wenn Salmonellen gegenüber dem Indikator *E. coli* eine gesteigerte Fähigkeit zu haben scheinen außerhalb des Wirtsorganismus zu überleben (Winfield und Groisman 2003).

Balzer *et al.* (2006) konnten eine Anreicherung der Indikatoren in epilithischen Biofilmen und Sedimenten der Ruhr zeigen. Der gleiche Effekt konnte bei dieser Arbeit auch im Falle der fakultativ pathogenen Bakterien *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas aeruginosa* abgeleitet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass kein Indikator für alle Gewässertypen und Fragestellungen geeignet ist. *E. coli* scheint dennoch derzeit noch einer der zuverlässigsten Indikatoren für eine fäkale Belastung von Wässern zu sein (Tallon *et al.* 2005). Fleisher *et al.* (2010) konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Enterokokken und der Wahrscheinlichkeit, eine Hauterkrankung durch das Baden zu erleiden, wobei Enterokokken eigentlich eher für die Abschätzung des Risikos gastrointestinaler Erkrankungen herangezogen werden.

Eine Kombination von unterschiedlichen Parametern z. B. mit dem molekularbiologischen Nachweis von fäkalanaeroben Bakterien ermöglicht ein umfassenderes Bild der Art der Verschmutzung und somit auch die Zuordnung zu einer Kontaminationsquelle mittels Microbial Source tracking (Savichtcheva und Okabe 2006). Durch Fäkalindikatorbakterien allein ist dies aufgrund ihrer weiten Verbreitung nicht möglich (Harwood *et al.* 2014). Ebenfalls zu beachten ist, dass einige *E. coli*-Stämme in der Umwelt persistieren können und in einigen tropischen Gebieten sogar Bestandteil der natürlichen Flora geworden sind (Topp *et al.* 2003; Byappanahalli *et al.* 2003; Ishii *et al.* 2006; Ksoll *et al.* 2007; Badgley *et al.* 2011).

5.20. Schnelltests zur Bestimmung der Wasserqualität

Um möglichst schnell auf Schwankungen der Wasserqualität reagieren zu können, werden laufend neue Methoden entwickelt, die ein schnelleres Analyseergebnis versprechen und den Arbeitsaufwand verringern sollen. Im Praxistest erweisen sich jedoch viele der neu entwickelten Verfahren zur Bestimmung von Indikatoren der Wasserqualität als nicht zuverlässig genug (Griffith *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Schnelltestsysteme auf eine Anwendbarkeit zur Überwachung einzelner mikrobiologischer Parameter getestet.

5.20.1. Kommerzielle most probable number Methoden (IDEXX, Pseudalert[®])

Zum schnelleren Nachweis des fakultativen Pathogens *P. aeruginosa* wurde das MPN-System Pseudalert[®] erprobt. Dieses basiert auf der Spaltung eines fluorogenen Substrats durch den Zielorganismus und soll schon innerhalb eines Tages verlässliche Ergebnisse liefern. Zusätzlich bietet das System gegenüber der Referenzmethode den Vorteil ohne karzinogene Reagenzien auszukommen. In der Anwendungsstudie mit unterschiedlichen Laboren habe sich bereits eine gleichwertige oder sogar etwas bessere Sensitivität bei der Untersuchung von Trink- und Badebeckenwasserproben gezeigt (Semproni *et al.* 2014; Sartory *et al.* 2015a b).

Bei der Anwendung auf Ruhrwasser war ein gemeinsamer Trend der Konzentrationen erkennbar, aber Konzentrationen, die mittels Pseudalert[®] ermittelt wurden, waren um ein Vielfaches höher als bei genormten Referenzmethoden. Bei einer Subkultivierung der als positiv gewerteten Ansätze war sowohl ein hoher Anteil an falsch-positiven als auch falsch-negativen Ansätzen zu verzeichnen. Die

Auswertung wurde durch eine starke Hintergrundfluoreszenz erschwert. Spies *et al.* (2020) fanden bei Anwendung in Kühlwasserproben, die wie Oberflächenwasser eine hohe Begleitflora aufweisen, ebenfalls höhere Gehalte von *P. aeruginosa* verglichen mit der Referenzmethode. Eine Subkultivierung der Kühlwasseransätze bestätigte jedoch, im Gegensatz zur Anwendung bei Oberflächenwasser in dieser Arbeit, in den meisten Fällen das Auswertungsergebnis. Bei vereinzelt Proben beobachteten die Autoren falsch-positive Reaktionen, die vermutlich durch Kontamination des Kühlwassers mit Öl bedingt waren. Auch in anderen Studien zeichnete sich das Pseudalert[®]-System zwar durch eine bessere Sensitivität, andererseits aber auch durch geringere Selektivität als bei Membranfiltrationsmethoden aus (Ngwa *et al.* 2017).

Um routinemäßig für Untersuchungen im Oberflächenwasser nutzbar zu sein, muss es zunächst gelingen, die Störfaktoren, die eine falsche Fluoreszenz verursachen können, zu ermitteln und zu entfernen. Dies ist im Falle von Kühlwasser teilweise gelungen (Spies *et al.* 2020). Bei Oberflächenwasser ist dieses durch die vielen unterschiedlichen Einflussfaktoren voraussichtlich etwas komplexer. Zum Nachweis der Indikatoren *E. coli* und Enterokokken wurden ähnliche Systeme bereits entwickelt, die sich auch für belastete Wässer als gleichwertig bewiesen haben und schneller Ergebnisse liefern können als gängige Membranfiltrationsmethoden.

5.20.2. Semikontinuierliches Monitoring von *E. coli* (Coliguard[®], Fa. mbonline)

Für eine schnelle vor-Ort Messung des Gehaltes von coliformen Bakterien und *E. coli* im Ruhrwasser wurde das Messgerät Coliguard[®] der Fa. mbonline (übernommen durch Fa. microLAN) eingesetzt. Dieses beruht auf Messung der Enzymaktivität der β -Galaktosidase (coliforme Bakterien) beziehungsweise der β -D-Glukuronidase (*E. coli*) und soll auch diejenigen nicht kultivierbaren Zellen erfassen, die stoffwechselaktiv sind (Stadler *et al.* 2015).

Beim Einsatz des Messgerätes an zwei unterschiedlichen Stellen des Ruhrufers zeigten sich weder gute Übereinstimmungen der Daten mit kulturellen Nachweismethoden noch mit PCR-basierten Nachweismethoden. Innerhalb der Trinkwasseraufbereitung scheint sich diese Monitoringeinrichtung zur Überwachung zu eignen (Adomat *et al.* 2020; Gunnarsdottir *et al.* 2020). Bei Flusswasser ist die Anwendung jedoch problematisch (Panait und Iarim 2019). Eine ausreichende Korrelation mit Kulturmethode ist nicht vorhanden und das Gerät ist nicht geeignet für den dauerhaften Einsatz in belastetem Flusswasser, kann aber eventuell als Frühwarnsystem genutzt werden (Stadler *et al.* 2016).

Vom Entwickler wurden Verbesserungen der Probenahmetechnik vorgenommen, um Störungen der Messung durch Verschmutzungen und Biofilmbildung in den Messeinheiten zu vermeiden (Stadler *et al.* 2017). Noch ungelöst ist jedoch, dass auch weitere Organismen der Begleitflora ebenfalls die Ziel-Enzyme bilden und so die Messung stören können (Demeter *et al.* 2020). In der Ausführung, die für diese Arbeit genutzt wurde, erwies sich das System als nicht präzise und sensitiv genug, um kurzzeitige Verschmutzungen in der Ruhr abbilden zu können (Mälzer *et al.* 2016).

5.20.3. qPCR und andere molekularbiologische Methoden

Es wurde bereits eine Vielzahl von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis der gesuchten Zielorganismen im Oberflächenwasser entwickelt. Problematisch ist jedoch zum einen, dass es durch eine mangelnde Standardisierung der Methoden (Girones *et al.* 2010) zu einer geringen Vergleichbarkeit der Untersuchungen verschiedener Labore kommt (Shanks *et al.* 2012). Zudem ist es bei belasteten Wässern nötig, Studien zur Anwendbarkeit und Beeinflussung z. B. durch Inhibition der PCR-Reaktion durch Matrix-Effekte durchzuführen (Nevers *et al.* 2013). Eine Reduktion des Probevolumens zur Vermeidung von Inhibition steht dabei in Konflikt mit einem ausreichenden Probevolumen, um eine niedrige Bestimmungsgrenze erreichen zu können (Oliver *et al.* 2014). Ebenfalls können Nährmediennrückstände die Reaktion stören, falls eine Voranreicherung durchgeführt

wird (Gorski und Liang 2010). Bei dem Einsatz von FISH-Verfahren kann es zu einer Beeinträchtigung der Auswertung durch Eigenfluoreszenz einiger Organismen z. B. *P. aeruginosa* und *Legionella* oder natürlich fluoreszierende organische oder anorganische Rückstände in der Probenmatrix kommen (Moter, Göbel 2000).

In dieser Arbeit wurde der Nachweis von Enterokokken mittels qPCR als schnellere Alternative gegenüber dem kulturellen Nachweis erprobt. Dieses Verfahren wird häufig als Schnelltest zur Bestimmung der Badegewässerqualität vorgeschlagen, auch wenn der Zusammenhang zu Umweltbedingungen noch nicht in gleichem Maß wie bei kulturellen Ergebnissen geklärt ist (Byappanahalli *et al.* 2010). Eine Beziehung zwischen qPCR-Konzentrationen und gastrointestinalen Infektionen wurde bisher nur für Punktquellen gefunden (Wade *et al.* 2006, 2010). In Europa liegen jedoch häufig diffuse Einträge vor (Oliver *et al.* 2014). Bei einer Evaluierung einzelner Probenahmestellen mit einer Ermittlung eines Korrekturfaktors konnten durch Lavender und Kinzelman (2009) qPCR-Methoden zum Monitoring der Indikatorbakterien *E. coli* und intestinalen Enterokokken unter den meisten Fließbedingungen eingesetzt werden. Bei Hochwasser erwies sich jedoch die quantitative Erfassung von intestinalen Enterokokken mittels qPCR als ungeeignet.

Bei dem Nachweis von intestinalen Enterokokken mittels qPCR im Ruhrwasser zeigten sich erwartungsgemäß Inhibitionseffekte durch die komplexe Probenmatrix sowie höhere Konzentrationen als bei einem kulturellen Nachweis. An der Entnahmestelle „Fischereiverein“ war eine zeitliche Übereinstimmung zu den gemessenen Spitzenwerten mittels kultureller Methode zu beobachten, für eine andere überwachte Stelle (Seaside Beach) konnte dies nicht in gleichem Umfang beobachtet werden. Um die Methode innerhalb eines Frühwarnsystems nutzen zu können, sollte daher für jede zu überwachende Stelle eine Eignungsbewertung vorgenommen werden. Erhöhte Konzentrationen bei der Bestimmung mittels qPCR könnten schnell Hinweise auf einen Anstieg der kulturell nachweisbaren intestinalen Enterokokken geben.

5.21. Abschließende Risikobewertung pathogener Bakterien im Ruhrwasser und Einflussfaktoren auf die Gewässerqualität

Schon vor dem strukturellen Wandel des Ruhrgebiets war die Ruhr als Freizeitgewässer beliebt und es kam wiederholt die Frage nach einer Eignung als Badegewässer auf. Durch eine Polizeiverordnung wurde das Baden in der Ruhr im Jahr 1952 bis auf einige Badestellen verboten (Hygiene-Institut des Ruhrgebiets 1962). Diese wurden anschließend ebenfalls geschlossen, sodass ein geregelter Badebetrieb lange Zeit nicht stattfand. Dennoch wurde die Ruhr weiterhin zum Baden und für unterschiedliche Wassersportarten genutzt.

Untersuchungen zur Wasserqualität zeigten bereits in den 1960er Jahren, dass Werte durchaus unterhalb der damals geltenden Grenzwerte lagen. Dennoch kam es häufig zu stoßweisen Belastungen, von denen schwer absehbare gesundheitliche Auswirkungen befürchtet wurden. Gerade in Zeiten der Nutzung als Badegewässer in den Sommermonaten wurden zudem durch geringen Wasserdurchfluss und größere Entnahmemengen zusätzliche Einbußen bei der Wasserqualität erwartet. Vereinzelt wurden zudem Fälle von Typhus und Paratyphus erfasst, bei denen das Baden allein als mögliche Infektionsquelle festgestellt werden konnte (Hygiene-Institut des Ruhrgebiets 1962).

Die allgemeine Verbesserung der Wasserqualität der letzten Jahrzehnte könnten in der gesellschaftlichen Wahrnehmung bewirken, dass der Einfluss von Belastungsspitzen durch lokale Begebenheiten oder kurzfristige Schwankungen der Wasserqualität unterschätzt wird. Ziel bei der aktuellen Bearbeitung der Fragestellung sollte es daher sein, betroffene Personengruppen so transparent zu informieren, dass sie das Risiko selbstständig und realistisch einschätzen können. In der Abwägung gegen die individuellen Vorteile, die sich aus der Nutzung der Ruhr zum Flussbaden ergeben, wird eine Erkrankungswahrscheinlichkeit von 3 bis 5 % als akzeptabel bewertet (Schoenemann und Jardin 2015).

Nach wie vor wird regelmäßig von einem höheren Risiko einer gastrointestinalen Infektion von Badenden in natürlichen Gewässern im Vergleich zu Kontrollgruppen berichtet (Dale *et al.* 2010). Eine Korrelation zu Fäkalindikatorbakterien wird besonders häufig dann abgeleitet, wenn der Eintrag über eine Punktquelle erfolgt. Weil sie vermehrt humanpathogene Organismen enthalten können, werden häusliche Abwässer als Quelle besonders kritisch angesehen (Field und Samadpour 2007; Soller *et al.* 2010, 2014). Bei diffusen Einträgen sind die die Erkrankungswahrscheinlichkeiten in der Regel nicht mit einer allgemeingültigen Korrelation zu der Höhe der Fäkalindikatoren zu beschreiben. Man kann aber dennoch von einem erhöhten Risiko durch das Baden bei einem hohen Gehalt an Indikatororganismen ausgehen (Prieto *et al.* 2001; Dwight *et al.* 2004; Colford *et al.* 2007, 2012; Fleisher *et al.* 2010; Harwood *et al.* 2014). Daher sollte Microbial Source Tracking bei künftigen epidemiologischen Studien mit einbezogen werden, um Einflüsse der Eintragsquelle besser abbilden zu können (Fewtrell und Kay 2015). Durch geeignete Bewirtschaftungsstrategien kann die Wasserqualität an Badestränden positiv beeinflusst werden. Diese sollten an örtliche Gegebenheiten angepasst werden (Kelly *et al.* 2018). Konkrete Hinweise zur Umsetzung liefert hierzu ein Leitfaden, der durch den Ruhrverband erarbeitet wurde (Schoenemann und Jardin 2015).

Auch bei der Ausübung von Aktivitäten mit geringer Wasserexposition wird ein erhöhtes Risiko von gastrointestinalen Krankheiten berichtet. Ob ein erhöhtes Risiko von Hautkrankheiten und Ohrinfektionen besteht, ist vor allem durch den Grad der Exposition bestimmt. Irritationen der Augen sind häufiger bei einer durch den Einfluss von Abwässern verringerten Wasserqualität zu beobachten (Dorevitch *et al.* 2012). Laut einer Metaanalyse ist das Risiko, Symptome einer Atemwegserkrankung zu entwickeln, für Badende in derartigen Wässern größer als für Kontrollgruppen. Meist sind die Auslösenden Faktoren und Zusammenhänge noch nicht abschließend geklärt (Mannocci *et al.* 2016). Kueh *et al.* (1995) geben basierend auf einer epidemiologischen Studie mit 25.000 Strandbesuchern in Hongkong aus dem Jahr 1992 eine Gesamtinzidenz von 41 Erkrankungen bei 1000 Personen an, die durch Baden bedingt ist. Erkrankungen der Augen, der Haut und des Atemtraktes wurden bei Schwimmern 2 bis 20-mal häufiger festgestellt als in einer Vergleichsgruppe. Fleisher *et al.* (2010) ermittelten ein erhöhtes Risiko für Hauterkrankungen bei Schwimmern, auch wenn kein Einfluss durch Abwässer gegeben ist.

In Deutschland wurde eine umfangreiche Expositionsstudie von Badenden in unterschiedlichen Binnengewässern durch Wiedenmann *et al.* (2004) durchgeführt. Bei dieser konnte ein Zusammenhang zwischen Gastroenteritis und den Indikatorparametern *E. coli*, intestinalen Enterokokken, *C. perfringens* und somatischen Coliphagen festgestellt werden. Meist handelte es sich hierbei um milde Verlaufsformen. Auch in dieser Untersuchung war das Risiko höher, wenn es zum Verschlucken von Wasser gekommen war und Konzentrationen über einem festgelegten Schwellenwert lagen.

Starke Niederschläge, die Aufwirblung von Sedimenten (Heaney *et al.* 2012) und das Verschlucken von Wasser können die Infektionswahrscheinlichkeit erhöhen, während der Einfluss von Wildtieren eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Fewtrell und Kay 2015). Biofilme stellen ebenfalls ein Reservoir dar, in denen Bakterien längere Zeit aktiv bleiben können (Araya *et al.* 2003). Tageszeitbedingte Schankungen scheinen trotz der unterschiedlichen Intensitäten der natürlichen UV-Strahlung die Wasserqualität nicht wesentlich zu beeinflussen (Mudd *et al.* 2012).

Zudem sollte beachtet werden, dass einige Personengruppen durch gängige Bewertungskonzepte nicht ausreichend berücksichtigt werden. Touristen können beispielsweise eher gefährdet sein sich zu infizieren, da ihnen die Immunität gegen lokale endemische Pathogene fehlt (World Health Organization 2003). Bei Kindern unter 10 Jahren scheint ein besonderes Risiko für eine gastrointestinale Infektion durch das Schwimmen vorzuliegen (Wade *et al.* 2008). Das gilt auch, wenn sie nur am Wasser spielen (Cui *et al.* 2017). Bei Anglern ist besonders zu beachten, dass Fische hohe Konzentrationen von hygienisch relevanten Mikroorganismen aus Bodensedimenten mit der Nahrung

aufnehmen (Geldreich und Clarke 1966), die auch in das Muskelfleisch übergehen können (Buras *et al.* 1987).

Kistemann *et al.* (2016) fassten den aktuellen Wissensstand zur Eignung der Ruhr als Badegewässer zusammen. Als Haupteintragsquellen mikrobieller Kontamination in Flüsse identifizierten sie Abläufe von Abwasserbehandlung, oberflächliche Abläufe von landwirtschaftlich genutzten Flächen und Wildtiere, die bei Trockenwetterperioden den größten Einfluss auf die Wasserqualität haben (Tondera *et al.* 2016b). Bei starken Niederschlagsereignissen werden Mikroorganismen hauptsächlich über die Mischwasserentlastung eingetragen. Vor allem bei kleinen Gewässern ist im Gegensatz dazu der Anteil, der durch oberflächliche Abflüsse eingetragenen Organismen an der Gesamtkonzentration groß und es ist schwierig hierfür geeignete Indikatoren zu finden (Schreiber *et al.* 2015).

Die Rolle von Viren, die im untersuchten Ruhrabschnitt hauptsächlich über Kläranlagen eingetragen werden, ist dabei noch nicht abschließend geklärt (Schoenemann und Jardin 2015). Es ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit und weiterer mikrobiologisch-hygienischer Untersuchungen der Ruhr das höchste Risiko gastrointestinaler Erkrankungen durch Noro- und Rotaviren zu erwarten (Timm *et al.* 2016). Hinsichtlich der untersuchten bakteriellen Erreger geht das höchste Risiko von *Campylobacter* spp. aus, was auch Erfahrungen anderer Autoren widerspiegelt (Till *et al.* 2008). Die quantitativ ermittelten Erkrankungsrisiken dieser Erreger lagen dabei innerhalb der als akzeptabel angesehenen Grenzen (3 - 5% s. o.). Allgemeine Risiken sollten aber durch gezielte Bewirtschaftungsmaßnahmen weiter gesenkt werden (Schoenemann und Jardin 2015). Zusätzlich gab es an keiner der Stellen Hinweise für eine massenhafte Vermehrung von Algen oder Cyanobakterien und der damit verbundene Bildung von Cyanotoxinen (Schoenemann und Jardin 2015).

Ein Monitoring aller wasserbürtigen Pathogene kann aufgrund der großen Vielfalt und eingeschränkten Methoden zur Anreicherung und Analyse bei Freizeitgewässern nicht realisiert werden. Würden bei einer Routineanalytik nur einzelne Parameter analysiert, könnte dies einen falschen Eindruck der Sicherheit vermitteln (Harwood *et al.* 2014). Noch basieren zudem viele Konzepte zur Risikobewertung auf kulturellen Methoden. Hierbei ist die Gefahr einer Untererfassung gegeben, da VBNC-Zellen oder nicht kultivierbare Spezies nicht abgebildet werden können (McKay 1992). Zudem sollte bei den Ergebnissen der quantitativen Risikobewertung beachtet werden, dass Dosis-Wirkungsbeziehungen teilweise nicht für alle Spezies von Organismen bekannt sind und in der Routineanalytik auch nicht zwischen einzelnen Spezies bzw. Serogruppen unterschieden wird (Pitkänen 2013).

5.22. Regenereignisse

Eine Reihe von Untersuchungen zeigt, dass es bei hohen Niederschlagsraten häufig zu einer Erhöhung der Fäkalindikatoren kommt (Sinclair *et al.* 2009). Wie stark sich diese auswirken, hängt dabei von den örtlichen Gegebenheiten ab (Shah *et al.* 2007). Besteht im Einzugsgebiet ein Einfluss durch eine Abwasserbehandlung mit mehreren Aufbereitungsstufen, so sind in der Regel bei hohen Durchflussraten höhere Gehalte an Fäkalindikatoren im Abfluss zu beobachten. Bei einer primären Aufbereitung ist hingegen wegen Verdünnungseffekten bei hohen Durchflussraten mit niedrigeren Konzentrationen an Fäkalindikatoren zu rechnen (Kay *et al.* 2008). Ebenfalls ergab eine Auswertung von Gesundheitsdaten in Kanada über mehrere Jahrzehnte, dass wasserbedingte Krankheitsausbrüche bei höheren Temperaturen und Niederschlagsraten wahrscheinlicher sind (Thomas *et al.* 2006).

Im Untersuchungsgebiet dieser Arbeit konnten nach Regenereignissen leicht erhöhte Konzentrationen der Fäkalindikatoren gemessen werden. Tondera *et al.* (2016b) arbeiteten heraus, dass Mischwasserentlastungen bei Regenereignissen die Haupteintragsquelle darstellten. In Trockenzeiten hingegen ist ein Eintrag von Fäkalindikatoren zu großen Teilen durch Kläranlagenabläufe bedingt. Kistemann *et al.* (2002) untersuchten gezielt Starkregenereignisse an drei verschiedenen Flüssen in NRW und konnten ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Gehalte an Mikroorganismen während Starkregenereignissen feststellen. Es ist im Allgemeinen davon auszugehen, dass die Gehalte von

E. coli und Enterokokken nach 2-3 Tagen wieder auf den Ursprungswert zurückgehen (Roser *et al.* 2006).

Durch die Einbeziehung von Niederschlagsdaten in Vorhersagemodelle und in die Erstellung von Monitoring-Strategien können diese relevant verbessert werden. Die Entwicklung derartiger Modelle sollte dabei generell bei allen Gewässern und nicht nur bei akuten Verschmutzungen erfolgen. Dies bietet den Vorteil, dass die interessierte Öffentlichkeit transparent über das Erkrankungsrisiko aufgeklärt werden kann. Nach einer Ursachenermittlung kann dadurch zusätzlich mit angepassten Maßnahmen den Verschmutzungen entgegengewirkt werden (Wyer *et al.* 2010).

5.23. Planschzone und Aufwirbeln von Sedimenten

Sind hohe Raten an suspendierten Partikeln im Wasser vorhanden, so ist tendenziell auch mit höheren Gehalten an hygienisch relevanten Bakterien im Wasser zu rechnen (Sinclair *et al.* 2009). Neben oberflächlichen Abflüssen in das Gewässer stellt auch die Mobilisierung von Sedimenten eine Quelle für Partikel im Wasser dar. Durch suspendierte Partikel im Wasser können anhaftende Mikroorganismen innerhalb der Wasserphase transportiert werden (McBride und Mittinty 2007). Als Ursache für die Mobilisierung von Sedimenten im Wasser sind neben Stürmen und saisonalen Umwälzungen auch menschliche Aktivitäten wie zum Beispiel die Schifffahrt zu nennen (Van Donsel und Geldreich 1971).

Muirhead *et al.* (2004) konnten einen Anstieg von *E. coli* um 2-log Stufen durch eine Mobilisierung von Sedimenten nachweisen. Anstelle von epilithischen Biofilmen wurden tieferliegende Sedimente als Hauptursache angesehen. Bai und Lung (2005) entwickelten Modelle, um den Einfluss von Resuspension und Transport von hygienisch relevanten Mikroorganismen auf die Wasserqualität vorhersagen zu können. Es ist hierbei zu berücksichtigen, dass einige Organismengruppen häufiger an Partikeln gebunden sind als andere (Fang *et al.* 2018).

Im Hinblick auf die Nutzung des in dieser Arbeit untersuchten Gewässers als Badegewässer ist zu berücksichtigen, dass eine Resuspendierung bzw. ein Eintrag auch durch die Badenden selbst hervorgerufen werden kann (Graczyk *et al.* 2007; Kistemann *et al.* 2016). Vor allem an seichten Stellen spielt neben dem Baden auch die Nutzung des Gewässers für Wassersport-Aktivitäten eine Rolle bei der Resuspendierung von Biofilmen und Sedimenten. Eine Studie des ADAC zu der Wasserqualität in ufernahen Bereichen (Planschzone) deutete an, dass diese Bereiche, die insbesondere durch Kinder zum Spielen genutzt werden, häufig eine schlechtere mikrobiologische Qualität haben. Auch in dieser Arbeit wurde durch stichprobenhafte Untersuchungen die mikrobiologische Qualität (des Wassers in seichten Bereichen) direkt und nach Aufwirbeln von Sedimenten überprüft. Eine Verschlechterung der Wasserqualität in dem Ausmaß, wie in der Studie des ADAC beschrieben (ADAC Badegewässertest, 2013), konnte für die untersuchten bakteriellen Pathogene nicht nachgewiesen werden. In der Risikobewertung von Uferbereichen sollte dennoch berücksichtigt werden, dass im Vergleich zur Wasserphase eine Anreicherung von Mikroorganismen in Sedimenten und Biofilmen zu beobachten ist und dass in Uferbereichen ein direkter Kontakt von Badenden zu Sedimenten und Biofilmen erfolgt. Ebenfalls sollte in der Beurteilung beachtet werden, dass Sedimente in der Nähe von Einleitungen einen höheren Anteil von Bakterien fäkaler Herkunft beinhalten können (Haller *et al.* 2009).

5.24. Eignung als Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung

Bereits zu Beginn des Aufbereitungsprozesses des Ruhrwassers konnten keine hygienisch relevanten Bakterien mehr nachgewiesen werden. Es ist daher nicht von einem erhöhten Risiko durch Mikroorganismen für die Verbraucher bei der Aufbereitung mit den verwendeten Verfahren auszugehen. Für eine genauere Einschätzung der einzelnen Eliminationsleitungen wäre es nötig, sehr

große Wasservolumina zu untersuchen. Dies kann nur durch eine aufwändige vor-Ort Filtration gewährleistet werden (Hijnen *et al.* 2000), was innerhalb dieser Arbeit nicht umgesetzt werden konnte. Erfahrungswerte aus der Literatur deuten jedoch darauf hin, dass die Elimination -besonders durch die Verwendung von Verfahrenskombinationen- ausreichend sein sollte.

In zwei Untersuchungen konnten Auswirkungen auf die (Trink-)Wasserqualität bei der Wassergewinnung aus Oberflächenwasser festgestellt werden, wenn die Aufbereitung auf wenige Verfahren beschränkt und insbesondere auf eine Bodenpassage verzichtet wurde: Hou *et al.* (2018) und Gheorghe *et al.* (2015) konnten zeigen, dass bakterielle Pathogene nicht ausreichend eliminiert werden und sowohl innerhalb des Aufbereitungsprozesses als auch am Wasserwerksausgang und im Verteilungsnetzes nachgewiesen werden können. Extremwetterereignisse, die als Basis einer umfassenden Risikobewertung besonders berücksichtigt werden sollten (Kistemann *et al.* 2002), können bei unzureichenden Aufbereitungsmethoden die Wasserqualität durch das höher belastete Rohwasser zusätzlich stark negativ beeinflussen (Hou *et al.* 2018).

Bakterien können sich in Filtermaterialien vermehren, deshalb sollten diese regelmäßig gewartet werden. Dies dämmt ebenfalls das Vorkommen von Amöben ein, die das Wachstum einiger Bakterienarten wie Legionellen begünstigen (Thomas *et al.* 2008). Ob es innerhalb der Aufbereitung oder Trinkwasserverteilung zu einer Wiederverkeimung kommen kann, wird maßgeblich vom Gehalt und der Zusammensetzung von verfügbaren organischen Kohlenstoffverbindungen beeinflusst. Daher ist darauf zu achten, dass diese ebenfalls so weit wie möglich in ihrer Konzentration verringert werden (Vital *et al.* 2010).

Ein mikrobielles Restrisiko ist auch bei sehr umfangreichen Aufbereitungsprozessen immer vorhanden, da Mikroorganismen z. B. im VBNC-Zustand eine Reihe von Behandlungsprozessen überstehen können. Daher sollte auf Seiten der Wasserversorger eine Risikobewertung durchgeführt werden, bei der dem Schutz des Rohwassers eine hohe Priorität zugemessen wird (Szewzyk *et al.* 2000). Teilweise stehen auch automatisierte Berechnungssysteme zur Verfügung (Schijven *et al.* 2011). Auch der Endverbraucher sollte als Einflussfaktor berücksichtigt werden (Chaidez und Gerba 2004), da es bei nicht bestimmungsgemäßen Gebrauch von Trinkwasserinstallationen zu einer Verkeimung des Systems mit der Ausbildung von Biofilmen und Einnistung von Pathogenen kommen kann. Diese können die Trinkwasserqualität langfristig negativ beeinträchtigen und sind teils sehr schwer wieder zu entfernen (Wingender und Flemming 2011).

Der Gebrauch von Haushaltswasserfiltern kann die Bildung von Biofilmen fördern und so zu einem Wiederanstieg der Koloniezahlen und Gehaltes von hygienisch relevanten Organismen wie *Aeromonas* spp. oder *P. aeruginosa* führen (Chaidez und Gerba 2004).

5.25. Fazit

Die ausgewählten bakteriellen Pathogene konnten in Konzentrationen nachgewiesen werden, die verglichen mit dem Stand der Literatur typisch für urbane Fließgewässer sind.

Aeromonaden konnten hierbei zu jeder Zeit in hohen Konzentrationen ($> 10^3$ KBE/100 mL) nachgewiesen werden, wobei sich in den Sommermonaten tendenziell höhere Konzentrationen zeigten. Epidemiologische Studien zeigen, dass in den hier vorliegenden Konzentrationen ein signifikantes Risiko hinsichtlich einer *Aeromonas*-assoziierten Infektion besteht, insbesondere wenn die Haut bzw. Schleimhäute mit dem Wasser in Kontakt kommen oder es zu einer versehentlichen Aspiration von Wasser kommt. *P. aeruginosa* wurde in der Mehrzahl der untersuchten Wasserproben nur in geringen bis mäßig hohen Konzentrationen gefunden. Es ist zu beachten, dass in der Vergangenheit bereits Ausbruchssituationen von Ohrinfektionen mit ähnlich hohen Konzentrationen in Verbindung gebracht werden konnten. Da nur wenig zu Dosis-Infektionsbeziehungen beim Menschen bekannt ist, kann für diese beiden fakultativen Pathogene das Risiko nicht quantifiziert werden. Angehörige von Risikogruppen sollten daher die Notwendigkeit einer Exposition kritisch

abwägen und diese, wenn möglich, beschränken oder vermeiden. An ausgewählten Untersuchungsstellen konnte zudem eine Anreicherung der fakultativen Pathogene *Aeromonas* spp. und *P. aeruginosa* in Sedimenten und Biofilmen festgestellt werden. Bei einer Mobilisierung ist daher eine schlagartige Freisetzung hoher Dosen möglich, die bei den gängigen Monitoringstrategien der Wasserphase nicht erfasst können.

Campylobacter spp. und *Salmonella* spp. wurden sporadisch in meist geringen Konzentrationen nachgewiesen. Für diese beiden Pathogene sind aus Expositionsstudien Dosis-Infektionsbeziehungen und Erkrankungsraten bekannt, sodass mittels quantitativer mikrobiologischer Risikobewertung (QMRA) das Risiko einer Gastroenteritis berechnet werden kann. Im Falle von *Campylobacter* spp. betrug dieses bei 45 min Badezeit zum Zeitpunkt der höchsten Konzentration 0,9 % für Erwachsene bzw. 1,8 % für Kinder. Für eine Gastroenteritis bedingt durch *Salmonella* spp. wurden bei gleichen Expositionsbedingungen niedrigere Risiken von 0,8 % für Erwachsene und 0,2 % für Kinder kalkuliert.

Da eine Überwachung aller einzelnen Pathogene nicht realisierbar ist, wurde die Badegewässerrichtlinie konzipiert, die eine Risikoeinstufung von Badegewässern auf Basis der Gehalte der Fäkalindikatoren *E. coli* und intestinalen Enterokokken vorsieht. Zusätzlich sollen weitere Risiken ermittelt und bewertet werden. Bei sehr hohen Konzentrationen der Indikatorbakterien sieht die Richtlinie ein zeitweiliges Badeverbot vor. Während dieser zeitweiligen Verbote gab es ebenfalls eine Tendenz zu höheren Gehalten der untersuchten Pathogene. Jedoch konnten, auch wenn die Kriterien eines Badeverbots nicht erfüllt waren, vereinzelt hohe Spitzenwerte einiger bakterieller Erreger verzeichnet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass Zeiten mit erhöhten Risiken vor allem für fäkal-oral übertragenen Erkrankungen, auf die die Richtlinie abgestimmt ist, identifiziert werden können. Das Risiko für Erkrankungen durch die untersuchten Pathogene lässt sich jedoch bei Nutzung zu den übrigen Zeiten nicht mit absoluter Gewissheit ausschließen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Schnelltests lieferten häufig keine zuverlässigen Ergebnisse, da die Verfahren durch die Probenmatrix beeinflusst wurden. Auch ein semi-kontinuierliches Messverfahren erwies sich nicht als ausreichend geeignet zur Integration in ein Frühwarnsystem. Da jedoch Niederschlagsereignisse mit erhöhten Konzentrationen von Indikatorbakterien verbunden waren, wurden diese durch Mälzer *et al.* (2016) bei der Entwicklung von Vorhersagemodellen der hygienischen Wasserqualität einbezogen. Auch die Gehalte einiger in dieser Arbeit untersuchter Pathogene waren nach starken Niederschlägen tendenziell höher.

Neben der Nutzung als Freizeitgewässer wird das Ruhrwasser mittels mehrstufiger Verfahrenskombinationen zu Trinkwasser aufbereitet. Die ausgewählten Bakterien konnten hier innerhalb des Aufbereitungsprozesses bereits nach den ersten Reinigungsstufen kulturell nicht mehr nachgewiesen werden. Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft ist von einer ausreichenden Elimination aller untersuchten Bakterien durch die Kombination der unterschiedlichen Verfahren auszugehen.

5.26. Outlook

Um zeitnah auf erhöhte hygienische Risiken reagieren zu können, ist die Nutzung von solchen Methoden zur Untersuchung der Wasserqualität ratsam, die schnellere Ergebnisse am gleichen Tag liefern (Dorevitch *et al.* 2010). Dennoch kann auch hier die Bearbeitungszeit einen limitierenden Faktor darstellen, da sie maßgeblich von der Infrastruktur wie z. B. dem Probentransport beeinflusst wird (Oliver *et al.* 2014). Um diese Problematik zu umgehen und sogar hygienische Gefährdungen voraussagen zu können, nimmt die Modellierung der Wasserqualität eine immer bedeutendere Stellung ein (Kay *et al.* 2008; Oliver *et al.* 2009, 2014; Shibata *et al.* 2010; Nevers *et al.* 2013).

Durch Mälzer *et al.* (2016) wurden bereits verschiedene methodische Ansätze zur Entwicklung eines Vorhersagemodells erprobt. Diese werden kontinuierlich weiter an die lokalen Gegebenheiten

angepasst (Bachmann-Machnik *et al.* 2018). Als vielversprechend erwies sich der methodische Ansatz Niederschlagsereignisse mit einzubeziehen. In der Erprobungsphase zeigte sich, dass bei diesem Modell innerhalb von 2 Tagen nach relevant bewerteten Niederschlagsereignissen mit einer Warnung wegen hygienisch problematischer Wasserqualität zu rechnen sei. Ziel des Modells war es, möglichst praktikable, einfach zu kommunizierende Aussagen ableiten zu können. Dies könnte zum Beispiel mit einer einfachen Anzeige, z. B. einer roten Flagge in Zeiten eines erhöhten Infektionsrisikos, umgesetzt werden und so einen Mehrwert innerhalb der Risikokommunikation schaffen. Seis *et al.* (2018) entwickelten innerhalb der Initiative „Flusshygiene“ ebenfalls ein Vorhersagemodell für Flussbadestellen in Berlin, das eine differenzierte und unmittelbare Vorhersage der Wasserqualität erlaubt.

Um die Einflüsse fäkaler Verunreinigung weiter zu verringern, wurde die Reduktion von hygienisch relevanten Bakterien im Untersuchungsgebiet durch Behandlung von Kläranlagenabläufen und Mischwasserentlastungen mit unterschiedlichen Behandlungsmethoden erprobt (Schoenemann und Jardin 2015; Tondera *et al.* 2015, 2016a). Das Management der Einzugsquellen sollte dabei idealerweise in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaft und weiteren Anliegern der Gewässer erfolgen, um auch den Eintrag von pathogenen Mikroorganismen durch Oberflächenabflüsse zu vermeiden (Russell *et al.* 2014; Schreiber *et al.* 2015).

Zur effektiven Umsetzung von Maßnahmen und einer bürgernahen Kommunikation wurde die Interessengemeinschaft „Baden in der Ruhr“ gebildet, die Vertreter unterschiedlicher Beteiligter einschließt.

6. Literatur

- Aarestrup, F. M., Engberg, J. (2001)
Antimicrobial resistance of thermophilic Campylobacter. Veterinary Research 32, 311–321
- Abbott S.L., Seli L.S., Catino M., Hartley M.A., Janda J.M. (1998)
Misidentification of unusual Aeromonas species as members of the genus vibrio: A continuing problem. Journal of Clinical Microbiology 36, 1103–1104.
- Abdel-Monem, M. H., Dowidar, A. (1990)
Recoveries of Salmonella from soil in Eastern region of Saudi Arabia Kingdom. The Journal of the Egyptian Public Health Association 65, 61-75
- Abraham W., Rohde M. (2014)
The Prokaryotes. The Prokaryotes, 545–577
- Abu Kwaik, Y. (1998)
Fatal attraction of mammalian cells to Legionella pneumophila. Molecular Microbiology 30, 689–695
- Abulreesh, H.H., Paget, T.A., Goulder, R. (2004)
Waterfowl and the bacteriological quality of amenity ponds. Journal of Water and Health 2, 183–189.
- Abulreesh, H.H., Paget, T.A., Goulder, R. (2005)
Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. Water Research 39, 2877–2882.
- Abulreesh H.H., Paget, T.A., Goulder, R. (2006)
Campylobacter in Waterfowl and Aquatic Environments : Incidence and Methods of Detection. Environmental Science and Technology 40, 7122–7131.
- Acheson, D., Allos, B. M. (2001)
Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. Clinical Infectious Diseases 32, 1201–1206
- ADAC Badegewässer-Test (2013):
abgerufen unter <http://www.adac.de/infotestrat/tests/urlaub-reise/wasserqualitaet/2013/>
- zuletzt abgerufen 2016
- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., Fields, B. (1996)
Legionella-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. Emerging Infectious Diseases 2, 225–230
- Adomat Y., Orzechowski G.H., Pelger M., Haas R., Bartak R., Nagy-Kovács Z. ágnes, et al. (2020)
New Methods for Microbiological Monitoring at Riverbank Filtration Sites. Water (Switzerland) 12.
- Agger, W. A., Mardan, A. (1995)
Pseudomonas aeruginosa Infections of Intact Skin. Clinical Infectious Diseases 20, 302-308
- Ahmed W., Vieritz A, Goonetilleke A., Gardner T. (2010)
Health risk from the use of roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia, as potable or nonpotable water, determined using quantitative microbial risk assessment. Applied and Environmental Microbiology 76, 7382–91.
- Ahmed, W., Sawant, S., Huygens, F., Goonetilleke, A., Gardner, T. (2009)
Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. Water Research 43, 4918–4928
- Al-Bana, B. H., Haddad, M. T., Garduño, R. A. (2014)
Stationary phase and mature infectious forms of Legionella pneumophila produce distinct viable but non-culturable cells. Environmental Microbiology 16, 382–395
- Albert M.J., Ansaruzzaman M., Talukder K.A., Chopra A.K., Kuhn I., Rahman M., et al. (2000)
Prevalence of enterotoxin genes in Aeromonas spp. Isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. Journal of Clinical Microbiology 38, 3785–3790.

- Alexandrino, M., Grohmann, E., Szewzyk, U. (2004)
Optimization of PCR-based methods for rapid detection of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Yersinia enterocolitica serovar 0:3 in wastewater samples. Water Research 38, 1340–1346
- Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J. H., Pozzetto, B., Riffard, S. (2011)
Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve Legionella pneumophila serogroup 1 recovery from environmental samples. Journal of Applied Microbiology 110, 952–961
- Allen M.J., Geldreich E.E. (1975)
Bacteriological Criteria for Ground-Water Quality. Groundwater 13, 45–52.
- Alleron, L., Khemiri, A., Koubar, M., Lacombe, C., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T., Frere, J. (2013)
VBNC Legionella pneumophila cells are still able to produce virulence proteins. Water Research 47, 6606–6617
- Alonso J.L., Garay E., Hernandez E. (1989)
Membrane filter procedure for enumeration of Pseudomonas aeruginosa in water. Water Research 23, 1499–1502.
- Alonso, A., Rojo, F., Martínez, J. L. (1999)
Environmental and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. Environmental Microbiology 1, 421–430
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. (1990)
Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. Applied and Environmental Microbiology 56, 1919–1925.
- Amodeo, M. R., Murdoch, D. R., Pithie, A. D. (2010)
Legionnaires' disease caused by Legionella longbeachae and Legionella pneumophila: comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. Clinical Microbiology and Infection 16, 1405–1407
- Anderson K.L., Whitlock J.E., Harwood V.J. (2005)
Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. Applied and Environmental Microbiology 71, 3041–3048.
- Angulo F.J., Tippen S., Sharp D.J., Payne B.J., Collier C., Hill J.E., et al. (1997)
A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. American Journal of Public Health 87, 580–584.
- Aravena-Román M., Inglis T.J.J., Riley T. V, Chang B.J. (2014)
Distribution of 13 virulence genes among clinical and environmental Aeromonas spp. in Western Australia. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 33, 1889–95.
- Armon, R., Starosvetsky, J., Arbel, T., Green, M. (1997)
Survival of Legionella pneumophila and Salmonella typhimurium in biofilm systems. Water Science and Technology 35, 11-12
- Armstrong T.W., Haas C.N. (2007)
Quantitative Microbial Risk Assessment Model for Legionnaires' Disease: Assessment of Human Exposures for Selected Spa Outbreaks. Journal of Occupational and Environmental Hygiene 4, 634–646.
- Arvanitidou M., Constantinidis T.C., Katsouyannopoulos V. (1995)
A survey on Campylobacter and Yersinia spp. occurrence in sea and river waters in Northern Greece. Science of The Total Environment 171, 101–106.
- Arvanitidou M., Papa A., Constantinidis T.C., Danielides V., Katsouyannopoulos V. (1997)
The occurrence of Listeria spp. and Salmonella spp. in surface waters. Microbiological Research 152, 395–7.
- Axelsson-Olsson D., Waldenström J., Broman T., Olsen B., Holmberg M. (2005)
Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a Potential Reservoir for Campylobacter jejuni. Applied and Environmental Microbiology 71, 987–992.

- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Svensson, L., Griekspoor, P., Waldenström, J., Ellström, P., Olsen, B. (2010)
Amoebae and algae can prolong the survival of Campylobacter species in co-culture. Experimental Parasitology 126, 59–64
- Bachmann-Machnik A., Dittmer U., Schönfeld A. (2018)
Using Precipitation and Combined Sewer Overflow Data for Predicting Hygienic Contaminations in Bathing Waters – A Data Analysis. In: New Trends in Urban Drainage Modelling. Springer, Cham.
- Badgley B.D., Thomas F.I.M., Harwood V.J. (2011)
Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. Environmental Microbiology 13, 932–942.
- Bae S., Wuertz S. (2015)
Decay of host-associated Bacteroidales cells and DNA in continuous-flow freshwater and seawater microcosms of identical experimental design and temperature as measured by PMA-qPCR and qPCR. Water Research 70, 205–213.
- Bae, S., Wuertz, S. (2012)
Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with Enterococcus spp., Campylobacter jejuni, Salmonella enterica serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR. Applied and Environmental Microbiology 78, 922–32
- Baffone W., Casaroli A., Citterio B., Pierfelici L., Campana R., Vittoria E., et al. (2006)
Campylobacter jejuni loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. International Journal of Food Microbiology 107, 83–91.
- Bai S., Lung W.-S. (2005)
Modeling sediment impact on the transport of fecal bacteria. Water Research 39, 5232–5240.
- Balzer M., Witt N., Flemming H.-C., Wingender J. (2006)
Faecal indicator bacteria in river biofilms. Water Science and Technology 61, 1105–1111.
- Banihashemi, A., Dyke, M.I., Huck, P.M. (2012)
Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable Campylobacter and Salmonella. Journal of Applied Microbiology 113, 863–873.
- Barbau-Piednoir, E., Mahillon, J., Pillyser, J., Coucke, W., Roosens, N. H., Botteldoorn, N. (2014)
Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead Salmonella serovar Enteritidis. Journal of Microbiological Methods 103, 131–137
- Barker, J., Bloomfield, S. F. (2000)
Survival of Salmonella in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. Journal of Applied Microbiology 89, 137–144
- Bauer, M., Mathieu, L., Deloge-Abarkan, M., Remen, T., Tossa, P., Hartemann, P., Zmirou-Navier, D. (2008)
Legionella bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes. Journal of epidemiology and community health 62, 913–20
- Beaz-Hidalgo R., Figueras M.J. (2013)
Aeromonas spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. Journal of Fish Diseases 36, 371–388
- Behets J., Declerck P., Delaet Y., Creemers B., Ollevier F. (2007)
Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples. Journal of Microbiological Methods 68, 137–144.
- Bell, R. L., Jarvis, K. G., Ottesen, A. R., McFarland, M. A., Brown, E. W. (2016)
Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. Microbial Biotechnology 9, 279–292
- Benin, A. L., Benson, R. F., Besser, R. E. (2002)
Trends in Legionnaires Disease, 1980–1998: Declining Mortality and New Patterns of Diagnosis. Clinical Infectious Diseases 35, 1039–1046

- Berg K.A., Lyra C., Niemi R.M., Heens B., Hoppu K., Erkomaa K., *et al.* (2011)
Virulence genes of Aeromonas isolates, bacterial endotoxins and cyanobacterial toxins from recreational water samples associated with human health symptoms. Journal of Water and Health 9, 670–679.
- Berney M., Weilenmann H.U., Simonetti A., Egli T. (2006)
Efficacy of solar disinfection of Escherichia coli, Shigella flexneri, Salmonella Typhimurium and Vibrio cholerae. Journal of Applied Microbiology 101, 828–836.
- Beuchat L.R. (1991)
Behavior of Aeromonas species at refrigeration temperatures. International Journal of Food Microbiology 13, 217–224.
- Bhopal, R. S. (1993)
Geographical variation of Legionnaires' disease: a critique and guide to future research. International Journal of Epidemiology 22, 1127–1136
- Bhowmik P., Bag P.K., Hajra T.K., De R., Sarkar P., Ramamurthy T. (2009)
Pathogenic potential of Aeromonas hydrophila isolated from surface waters in Kolkata, India. Journal of Medical Microbiology 58, 1549–1558.
- Bio-Rad (2014)
RAPID[®] aeruginosa Agar Technical Sheet, V2 09/07/2014
- Black R.E., Levine M.M., Clements M. Lou, Hughes T.P., Blaser M.J. (1988)
Experimental Campylobacter jejuni Infection in Humans. The Journal of Infectious Diseases 157, 472–479.
- Blanc, D. S., Carrara, P., Zanetti, G., Francioli, P. (2005)
Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control Legionella: seven years of experience in a university teaching hospital. Journal of Hospital Infection 60, 69–72
- Blaser M.J., Cody H.J. (1986)
Methods for Isolating Campylobacter jejuni from Low-Turbidity Water. Applied and Environmental Microbiology 51, 312–315.
- Blaser M.J., Smith P.F., Wang W.L.L., Hoff J.C. (1986)
Inactivation of Campylobacter jejuni by chlorine and monochloramine. Applied and Environmental Microbiology 51, 307–311.
- Blaser, M. J., Hardesty, H. L., Powers, B., Wang, W. L. (1980)
Survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni in biological milieus. Journal of Clinical Microbiology 11, 309–313
- Blaser, M. J., Newman, L. S. (1982)
A Review of Human Salmonellosis: I. Infective Dose. Review of Infectious Diseases 4, 1096–1106
- Blatny, J. M., Reif, B. A. P., Skogan, G., Andreassen, O., Høiby, E. A., Ask, E., Waagen, V., Aanonsen, D., Aaberge, I. S. (2008)
Tracking Airborne Legionella and Legionella pneumophila at a Biological Treatment Plant. Environmental Science and Technology 42, 7360–7367
- Boehm, A.B., Ashbolt, N.J., Colford, J.M., Dunbar, L.E., Fleming, L.E., Gold, M.A., *et al.* (2009)
A sea change ahead for recreational water quality criteria. Journal of Water and Health 7, 9–20.
- Bolton F.J., Coates D., Hinchliffe P.M., Robertson L. (1983)
Comparison of selective media for isolation of Campylobacter jejuni/coli. Journal of Clinical Pathology 36, 78–83.
- Bolton F.J., Coates D., Hutchinson D.N. (1984)
The ability of campylobacter media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. Journal of Applied Bacteriology 56, 151–157.
- Bolton F.J., Coates D., Hutchinson D.N., Godfree A.F. (1987)
A study of thermophilic campylobacters in a river system. Journal of Applied Bacteriology 62, 167–176.

- Bolton F.J., Hinchliffe P.M., Coates D., Robertson L. (1982)
A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. The Journal of Hygiene 89, 185–90.
- Bolton F.J., Surman S.B., Martin K., Wareing D.R., Humphrey T.J. (1999)
Presence of Campylobacter and Salmonella in sand from bathing beaches. Epidemiology and Infection 122, 7–13.
- Bolton, D. J. (2015)
Campylobacter virulence and survival factors. Food Microbiology 48, 99–108
- Bomo, A. M., Storey, M. V., Ashbolt, N. J. (2004)
Detection, integration and persistence of aeromonads in water distribution pipe biofilms. Journal of Water and Health 2, 83–96
- Bonadonna L., Briancesco R., Ciccozzi M., Filetici E., Manuppella A., Pourshaban M., *et al.* (2001)
Biotyping, serotyping and genotyping of aeromonads from environmental and clinical samples. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17, 673–676.
- Bonadonna L., Briancesco R., Coccia A.M., Semperoni M., Stewardson D. (2002)
Occurrence of potential bacterial pathogens in coastal areas of the adriatic sea. Environmental Monitoring and Assessment 77, 31–49.
- Bonetta S., Borelli E., Bonetta S., Conio O., Palumbo F., Carraro E. (2011)
Development of a PCR protocol for the detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. in surface water. Environmental monitoring and assessment 177, 493–503.
- Boyle, M., Ford, T., Maki, J. S., Mitchell, R. (1991)
Biofilms and the survival of opportunistic pathogens in recycled water. Waste Management and Research 9, 465–470
- Brennhovd O., Kapperud G., Langeland G. (1992)
Survey of thermotolerant Campylobacter spp. and Yersinia spp. in three surface water sources in Norway. International Journal of Food Microbiology 15, 327–338.
- Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.-C., Wingender, J. (2009)
Persistence of Pseudomonas aeruginosa in drinking-water biofilms on elastomeric material. Water Science and Technology: Water Supply 9, 81 LP-87
- Broman T., Waldenström J., Dahlgren D., Carlsson I., Eliasson I., Olsen B. (2004)
Diversities and similarities in PFGE profiles of Campylobacter jejuni isolated from migrating birds and humans. Journal of Applied Microbiology 96, 834–843.
- Brookes, J. D., Antenucci, J., Hipsey, M., Burch, M. D., Ashbolt, N. J., Ferguson, C. (2004)
Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. Environment International 30, 741–759
- Brown, M., Eykyn, S. J. (2000)
Non-typhoidal Salmonella Bacteraemia Without Gastroenteritis: a Marker of Underlying Immunosuppression. Review of Cases at St. Thomas' Hospital 1970–1999. Journal of Infection 41, 256–259
- Buck A.C., Cooke E.M. (1969)
The fate of ingested Pseudomonas aeruginosa in normal persons. Journal of Medical Microbiology 2.
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. M., Hamilton M.A. (2007)
Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. Journal of Microbiological Methods 70, 236–244
- Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D., Partridge, K. (1984)
Isolation of Aeromonas hydrophila from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. Applied and environmental microbiology 48, 361–6
- Buse H.Y., Schoen M.E., Ashbolt N.J. (2012)
Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. Water Research 46, 921–933.

- Buswell C.M., Herlihy Y.M., Lawrence L.M., McGuiggan J.T.M., Marsh P.D., Keevil C.W., *et al.* (1998)
Extended Survival and Persistence of Campylobacter spp. in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA Staining. Applied and Environmental Microbiology 64, 733–741.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y., Keevil, C., Marsh, P.D., Leach, S. A. (1998a)
Carbon load in aquatic ecosystems affects the diversity and biomass of water biofilm consortia and the persistence of the pathogen Campylobacter jejuni within them. Journal of Applied Microbiology, 161–167
- Butzler, J. P. (2004)
Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clinical Microbiology and Infection 10, 868–876
- Byappanahalli M.N., Shively D.A., Nevers M.B., Sadowsky M.J., Whitman R.L. (2003)
Growth and survival of Escherichia coli and enterococci populations in the macro-alga Cladophora (Chlorophyta). FEMS Microbiology Ecology 46, 203 LP – 211.
- Byappanahalli M.N., Whitman R.L., Shively D.A., Nevers M.B. (2010)
Linking non-culturable (qPCR) and culturable enterococci densities with hydrometeorological conditions. Science of The Total Environment 408, 3096–3101.
- Byappanahalli, M. N., Sawdey, R., Ishii, S., Shively, D. A., Ferguson, J. A., Whitman, R. L., Sadowsky, M. J. (2009)
Seasonal stability of Cladophora-associated Salmonella in Lake Michigan watersheds. Water Research 43, 806–814
- Cabral, J. P. S. (2010)
Water microbiology. Bacterial pathogens and water. International Journal of Environmental Research and Public Health 7, 3657–703
- Calderon R., Mood E.W. (1982)
An Epidemiological Assessment of Water Quality and “Swimmer’s Ear.” Archives of Environmental Health 35, 300–305.
- Calva, J., Lopez-Vidal, A., Ruiz-Palacios, G., Ramos, A., Bojalil, R. (1988)
Cohort study of intestinal infection with Campylobacter in mexican children. The Lancet 331, 503–506
- Calvo-Bado L.A., Morgan J.A.W., Sergeant M., Pettitt T.R., Whipps J.M. (2003)
Molecular Characterization of Legionella Populations Present within Slow Sand Filters Used for Fungal Plant Pathogen Suppression in Horticultural Crops. Applied and Environmental Microbiology 69, 533–541.
- Canosa A., Pinilla G. (1999)
Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies (South America). Lakes, Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use 4, 23–27.
- Carducci, A., Verani, M., Battistini, R. (2010)
Legionella in industrial cooling towers: monitoring and control strategies. Letters in Applied Microbiology 50, 24–29
- Carter A.M., Pacha R.E., Clark G.W., Williams E.A. (1987)
Seasonal Occurrence of Campylobacter spp. in Surface Waters and Their Correlation with Standard Indicator Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 53, 523–526.
- Carvalho F.R.S., Nastasi F.R., Gamba R.C., Foronda A.S., Pellizari V.H. (2008)
Occurrence and Diversity of Legionellaceae in Polar Lakes of the Antarctic Peninsula. Current Microbiology 57, 294–300.
- Carvalho F.R.S., Vazoller R.F., Foronda A.S., Pellizari V.H. (2007)
Phylogenetic Study of Legionella Species in Pristine and Polluted Aquatic Samples from a Tropical Atlantic Forest Ecosystem. Current Microbiology 55, 288–293.
- Casabianca, A., Orlandi, C., Barbieri, F., Sabatini, L., Di Cesare, A., Sisti, D., Pasquaroli, S., Magnani, M., Citterio, B. (2015)
Effect of starvation on survival and virulence expression of Aeromonas hydrophila from different sources. Archives of Microbiology 197, 431–438

- Chaidez C., Gerba C.P. (2004)
Comparison of the microbiologic quality of point- of-use (POU) -treated water and tap water. International Journal of Environmental Health Research 14, 253–260.
- Chan, K. F., Tran, H. L., Kanenaka ,R. Y., Kathariou, S. (2001)
Survival of Clinical and Poultry-Derived Isolates of Campylobacter jejuni at a Low Temperature (4° C). Applied and Environmental Microbiology 67, 4186–4191
- Chandran, A., Mohamed Hatha, A. A. (2005)
Relative survival of Escherichia coli and Salmonella Typhimurium in a tropical estuary. Water Research 39, 1397–1403
- Chandran, A., Varghese, S., Kandeler, E., Thomas, A., Hatha, M., Mazumder, A. (2011)
An assessment of potential public health risk associated with the extended survival of indicator and pathogenic bacteria in freshwater lake sediments. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214, 258–264
- Chang B., Sugiyama K., Taguri T., Amemura-Maekawa J., Kura F., Watanabe H. (2009)
Specific Detection of Viable Legionella Cells by Combined Use of Photoactivated Ethidium Monoazide and PCR/Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology 75, 147–153.
- Chattopadhyay, S., Kaur, A., Jain, S., Sabharwal, P. K., Singh, H. (2016)
Functionalized polymeric magnetic nanoconstructs for selective capturing and sensitive detection of Salmonella Typhimurium. Analytica Chimica Acta 937, 127–135
- Chauret C., Volk C., Creason R., Jarosh J., Robinson J., Warnes C. (2001)
Detection of Aeromonas hydrophila in a drinking- water distribution system: a field and pilot study. Canadian Journal of Microbiology 47, 782–786.
- Chen N.-T., Chang C.-W. (2010)
Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. Journal of Applied Microbiology 109, 623–634.
- Cherry W.B., Hanks J.B., Thomason B.M., Murlin A.M., Biddle J.W., Croom J.M. (1972)
Salmonellae as an index of pollution of surface waters. Applied microbiology 24, 334–340.
- Cirillo, J. D., Cirillo, S. L. G., Yan, L., Bermudez, L. E., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1999)
Intracellular Growth in Acanthamoeba castellanii Affects Monocyte Entry Mechanisms and Enhances Virulence of Legionella pneumophila. Infection and Immunity 67, 4427–4434
- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1994)
Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. Infection and Immunity 62, 3254–3261
- Colford J.M., Schiff K.C., Griffith J.F., Yau V., Arnold B.F., Wright C.C., et al. (2012)
Using rapid indicators for Enterococcus to assess the risk of illness after exposure to urban runoff contaminated marine water. Water Research 46, 2176–2186.
- Colford J.M., Wade T.J., Schiff K.C., Wright C.C., Griffith J.F., Sandhu S.K., et al. (2007)
Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. Epidemiology 18, 27–35.
- Colwell, R. R. (2009)
Viable but Not Cultivable Bacteria - Uncultivated Microorganisms. (Ed. S.S. Epstein), pp. 121–129. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Cools I., Uyttendaele M., Caro C., D’Haese E., Nelis H.J., Debevere J. (2003)
Survival of Campylobacter jejuni strains of different origin in drinking water. Journal of Applied Microbiology 94, 886–892.
- Cooper, I. R., Hanlon, G. W. (2010)
Resistance of Legionella pneumophila serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. Journal of Hospital Infection 74, 152–159
- Corry J.E.L., Post D.E., Colin P., Laisney M.J. (1995)
Culture media for the isolation of campylobacters. International Journal of Food Microbiology 26, 43–76.

- Cotuk A., Dogruoz N. (2005)
The effects of Pseudomonas and Aeromonas strains on Legionella pneumophila growth. Annals of Microbiology 55, 219–224.
- Coulliette A.D., Enger K.S., Weir M.H., Rose J.B. (2013)
Risk reduction assessment of waterborne Salmonella and Vibrio by a chlorine contact disinfectant point-of-use device. International Journal of Hygiene and Environmental Health 216, 355–361.
- Craveiro S., Alves-Barroco C., Barreto Crespo M.T., Salvador Barreto A., Semedo-Lemsaddek T. (2015)
Aeromonas biofilm on stainless steel: Efficiency of commonly used disinfectants. International Journal of Food Science and Technology 50, 851–856.
- Culotti, A., Packman, A. I. (2015)
Pseudomonas aeruginosa facilitates Campylobacter jejuni growth in biofilms under oxic flow conditions. FEMS Microbiology Ecology 91, fiv136
- Cunha, B. A., Burillo, A., Bouza, E. (2016)
Legionnaires' disease. The Lancet 387, 376–385
- Daskalov H. (2006)
The importance of Aeromonas hydrophila in food safety. Food Control 17, 474–483.
- Dasti, J. I., Tareen, A. M., Lugert, R., Zautner, A. E., Groß, U. (2010)
Campylobacter jejuni: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology 300, 205–211
- Davies, R. H., Wray, C. (1996)
Seasonal Variations in the Isolation of Salmonella Typhimurium, Salmonella Enteritidis, Bacillus cereus and Clostridium perfringens from Environmental Samples. Journal of Veterinary Medicine, Series B 43, 119–127
- de Vicente A., Aviles M., Borrego J.J., Romero P. (1988)
Die-off and survival of Pseudomonas aeruginosa in freshwater. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive Medizin 185, 534–547.
- Declerck P. (2010)
Biofilms: the environmental playground of Legionella pneumophila. Environmental Microbiology 12, 557–566.
- Declerck P., Behets J., van Hoef V., Ollevier F. (2007)
Detection of Legionella spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. Water Research 41, 3159–3167.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., de Keersmaecker, B., Ollevier, F. (2009)
Replication of Legionella pneumophila in biofilms of water distribution pipes. Microbiological Research 164, 593–603
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P., Sternon, J. (1972)
Acute Enteritis Due to Related Vibrio: First Positive Stool Cultures. Journal of Infectious Diseases 125, 390–392
- Delgado-Viscogliosi P., Solignac L., Delattre J.-M. (2009)
Viability PCR, a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable Legionella pneumophila Cells in Environmental Water Samples. Applied and Environmental Microbiology 75, 3502–3512.
- Demeter K., Burnet J.-B., Stadler P., Kirschner A., Zessner M., Farnleitner A.H. (2020)
Automated online monitoring of fecal pollution in water by enzymatic methods. Current Opinion in Environmental Science, Health.
- Den Boer J.W., Coutinho R.A., Yzerman E.P.F., van der Sande M.A.B. (2008)
Use of surface water in drinking water production associated with municipal Legionnaires' disease incidence. Journal of Epidemiology and Community Health 62, e1–e1.

- Denis M., M.Tanguy, Chidaine B., Laisney M.-J., Mégraud F., Fravalo P. (2011)
Description and sources of contamination by Campylobacter spp. of river water destined for human consumption in Brittany, France. Pathologie Biologie 59, 256–263.
- Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., Nazaret, S. (2011)
Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of Pseudomonas aeruginosa. Research in Microbiology 162, 689-700
- Dericks B. (2016)
Vorkommen und Bewertung von Legionellen in Abwasser-, Oberflächenwasser- und Kühlwasserproben aus Nordrhein-Westfalen. Zwischenbericht zum Projekt „Risikoorientierte Gewässerbewirtschaftung im Hinblick auf wasserbürtige Krankheitserreger, insbesondere Legionellen“ mit Ergebnisdarstellung der LANUV-Messprogramme im Zeitraum April 2015 bis März 2016.
- Di Bari M., Elayse M. H., Adalgisa M. J. M., Sato M.I.Z. (2007)
Aeromonas spp. and microbial indicators in raw drinking water sources. Brazilian Journal of Microbiology 38, 516–521.
- Diederer, B. M. W. (2008)
Legionella spp. and Legionnaires' disease. Journal of Infection 56, 1–12
- Diergaardt S.M., Venter S.N., Chalmers M., Theron J., Brözel V.S. (2003)
Evaluation of the Cape Town Protocol for the isolation of Campylobacter spp. from environmental waters. Water SA 29, 225–229.
- Diergaardt S.M., Venter S.N., Spreeth A., Theron J., Brözel V.S. (2004)
The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. Water Research 38, 2589–2595.
- DIN 38411-8:1982-05 (1982): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K); Nachweis von Pseudomonas aeruginosa (K8). Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN 12879:2001 (2001): Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN 12880:2000 (2000): Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 11133 Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermittel und Wasser – Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 11731-2:2008 (2008): Wasserbeschaffenheit und Zählung von Legionellen - Teil 2 Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 16266:2008 (2008): Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Pseudomonas aeruginosa – Membranfiltrationsverfahren. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 19250:2013 (2013): Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von Salmonella spp.; Englische Fassung ISO 19250:2010. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 19458:2006 (2006): Wasserbeschaffenheit - Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 7899-1:1999 (1999): Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 7899-2:2000 (2000): Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken - Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 9308-2:2014 (2014): Wasserbeschaffenheit - Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien - Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- DIN EN ISO 9308-3:1999 (1999): Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Escherichia coli und coliformen Bakterien in Oberflächenwasser und Abwasser - Teil 3: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren). Beuth Verlag GmbH, Berlin

- Dizer H., Wolf S., Fischer M., López-Pila J.M., Röske I., Schmidt R., *et al.* (2005)
Die Novelle der EU-Badegewässerrichtlinie. Aspekte der Risikobewertung bei der Grenzwertsetzung. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 48, 607–614.
- Djaouda M., Gaké B., Ebang Menye D., Zébazé Togouet S.H., Nola M., Njiné T. (2013)
Survival and Growth of Vibrio cholerae, Escherichia coli, and Salmonella Spp. in Well Water Used for Drinking Purposes in Garoua (North Cameroon). International Journal of Bacteriology 2013, 1–7.
- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S. (2004)
Clinical and Environmental Distributions of Legionella Strains in France Are Different. Journal of Clinical Microbiology 42, 458–460
- Dolejšká, M., Bierošová, B., Kohoutová, L., Literák, I., Čížek A. (2009)
Antibiotic-resistant Salmonella and Escherichia coli isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. Journal of Applied Microbiology 106, 1941–1950
- Domingo, J. W. S., Harmon, S., Bennett, J. (2000)
Survival of Salmonella Species in River Water. Current Microbiology 40, 409–417
- Donnison, A. (2003)
Isolation of Thermotolerant Campylobacter – Review, Methods for New Zealand Laboratories. Client Report Prepared for the Ministry of Health, Revised May 2003
- Donofrio R.S., Aridi S., Saha R., Bechanko R., Schaefer K., Bestervelt L.L., *et al.* (2013)
Laboratory validation of an ozone device for recreational water treatment. Journal of Water and Health 11, 267–276.
- Dorevitch S., Ashbolt N.J., Ferguson C.M., Fujioka R., McGee C.D., Soller J.A., *et al.* (2010)
Meeting report: Knowledge and gaps in developing microbial criteria for inland recreational waters. Environmental Health Perspectives 118, 871–876.
- Dowling, J. N., Saha, A. K., Glew, R. H. (1992)
Virulence factors of the family Legionellaceae. Microbiological Reviews 56, 32–60
- Doyle, M. P., Roman, D.J. (1982)
Sensitivity of Campylobacter jejuni to Drying. Journal of Food Protection 45, 507–510
- Dufour A.P., Evans O., Behymer T.D., Cantú R. (2006)
Water ingestion during swimming activities in a pool: A pilot study. Journal of Water and Health 4, 425–430.
- Dunn, C. E., Rowlingson, B., Bhopal, R. S., Diggle, P. (2013)
Meteorological conditions and incidence of Legionnaires' disease in Glasgow, Scotland: application of statistical modelling. Epidemiology and Infection 141, 687–696
- Dusserre E., Ginevra C., Hallier-Soulier S., Vandenesch F., Festoc G., Etienne J., *et al.* (2008)
A PCR-Based Method for Monitoring Legionella pneumophila in Water Samples Detects Viable but Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. Applied and Environmental Microbiology 74, 4817–4824.
- Dwidjosiswojo Z., Richard J., Moritz M.M., Dopp E., Flemming H.C., Wingender J. (2011)
Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of Pseudomonas aeruginosa under conditions relevant to drinking water environments. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214, 485–492.
- Dwight R.H., Baker D.B., Semenza J.C., Olson B.H. (2004)
Health Effects Associated With Recreational Coastal Water Use: Urban Versus Rural California. American Journal of Public Health 94, 565–567.
- Dykes, G.A., Sampathkumar, B., Korber, D.R. (2003)
Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic Campylobacter jejuni strain. International Journal of Food Microbiology 89, 1–10.

- Economou, V., Gousia, P., Kansouzidou, A., Sakkas, H., Karanis, P., Papadopoulou, C. (2013)
Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of Salmonella enterica isolated from surface waters within an agricultural landscape. International Journal of Hygiene and Environmental Health 216, 435–444.
- EEA (2016)
European Bathing Water Quality in 2015. European Environment Agency, EEA Report No. 6/2016
- Egorov, A.I., Best, J.M.B., Frebis, C.P., Karapondo, M.S. (2011)
Occurrence of Aeromonas spp. in a random sample of drinking water distribution systems in the USA. Journal of Water and Health 9, 785–98.
- Eichler, S., Christen, R., Höltje, C., Westphal, P., Bötel, J., Brettar, I., Mehling, A., Elasm, M. O., Miller, R. V. (1999)
Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. Applied and Environmental Microbiology 65, 2025–2031
- EPA (1999)
Legionella : Human Health Criteria Document. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- EPA (2001)
Aeromonas in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V). Method 1605, EPA-821-R-01-034 U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- EPA (2006)
Aeromonas: Human Health Criteria Document. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- EPA (2007)
Report of the experts scientific Workshop on critical research needs for the development of new or revised recreational water quality criteria. EPA 823-R-07-006, U.S. Environmental Protection Agency, Warrenton, Virginia
- Exner M., Christiansen B., Flemming H.C., Gebel J., Kistemann T., Kramer A., et al. (2010)
Pseudomonas aeruginosa - Plädoyer für die Einführung eines technischen Maßnahmewertes in die Novelle der Trinkwasserverordnung. Hygiene und Medizin 35, 370–379.
- Ezzat S.M. (2014)
An approach using non-conventional indicators for detecting microbial water pollution. Clean - Soil, Air, Water 42, 1223–1231.
- Falconer I.R. (1999)
An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. Environmental Toxicology 14, 5–12.
- Falkinham, J. O., Hilborn, E. D., Arduino, M. J., Pruden, A., Edwards, M. A. (2015)
Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa. Environmental Health Perspectives 123, 749–758
- Fallon, R. J., Rowbotham, T.J. (1990)
Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to Legionella micdadei associated with use of a whirlpool. Journal of Clinical Pathology 43, 479–483
- Fang T., Cui Q., Huang Y., Dong P., Wang H., Liu W.T., et al. (2018)
Distribution comparison and risk assessment of free-floating and particle-attached bacterial pathogens in urban recreational water: Implications for water quality management. Science of the Total Environment 613–614, 428–438.
- Faris, B., Faris, C., Schousboe, M., Heath, C. H. (2005)
Legionellosis from Legionella pneumophila Serogroup 13. Emerging Infectious Diseases 11, 1405–1409

- Farrant, J. M., Drury, A. E. C., Thompson, R. P. H. (1988)
Legionnaires' Disease Following Immersion In A River. The Lancet 332, 460
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R.S., Gordon, M. A. (2012)
Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. The Lancet 379, 2489–2499
- Fernández M.C., Giampaolo B.N., Ibañez S.B., Guagliardo M.V., Esnaola M.M., Conca L., *et al.* (2000)
Aeromonas hydrophila and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentine. Genetica 108, 35–40.
- Fernandez R., Pizarro R.A. (1996)
Lethal Effect Induced in Pseudomonas aeruginosa Exposed to Ultraviolet-A Radiation. 64, 334–339.
- Fewtrell L., Kay D. (2015)
Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. Current Environmental Health Reports 2, 85–94.
- Field K.G., Samadpour M. (2007)
Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Research 41, 3517–3538.
- Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. (2002)
Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clinical Microbiology Reviews 15, 506–526.
- Fiorentini C., Barbieri E., Falzano L., Matarrese P., Baffone W., Pianetti A., *et al.* (1998)
Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. Journal of Applied Microbiology 85, 501–511.
- Fish, J. T., Pettibone, G. W. (1995)
Influence of freshwater sediment on the survival of Escherichia coli and Salmonella sp. as measured by three methods of enumeration. Letters in Applied Microbiology 20, 277–281
- Fisman, D. N., Lim, S., Wellenius, G. A., Johnson, C., Britz, P., Gaskins, M., Maher, J., Mittleman, M. A., Spain, C. V., Haas, C. N., Newbern, C. (2005)
It's Not the Heat, It's the Humidity: Wet Weather Increases Legionellosis Risk in the Greater Philadelphia Metropolitan Area. Journal of Infectious Diseases 192, 2066–2073
- Fitzgeorge, R. B., Baskerville, A., Broster, M., Hambleton, P., Dennis, P. J. (1983)
Aerosol infection of animals with strains of Legionella pneumophila of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. The Journal of Hygiene 90, 81–89
- Fleisher J.M., Fleming L.E., Solo-Gabriele H.M., Kish J.K., Sinigalliano C.D., Plano L., *et al.* (2010)
The BEACHES Study: health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine waters. International Journal of Epidemiology 39, 1291–1298.
- Flemming, H.-C., Wingender, J. (2010)
The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 8, 623–633
- Fletcher E.L., Fleiszig S.M., Brennan N.A. (1993)
Lipopolysaccharide in adherence of Pseudomonas aeruginosa to the cornea and contact lenses. Investigative Ophthalmology, Visual Science 34, 1930–1936.
- Flieger, A., Banerji, S., Broich, M., Rydzewski, K., Shadrach, W. S. (2003)
Pathogenese der Legionelleninfektion. Bundesgesundheitsblatt 46, 694–699
- Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L., Pope D.H. (1981)
Ecological distribution of Legionella pneumophila. Applied and Environmental Microbiology 41, 9–16.
- Fraser, D. W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., Brachman, P.S. (1977)
Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. New England Journal of Medicine 297, 1189–1197

- Fricker C.R. (1987)
The isolation of salmonellas and campylobacters. The Journal of applied Bacteriology 63, 99–116.
- Frost, J. A. (2001)
Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Symposium series (Society for Applied Microbiology), 85S–95S
- Füchslin, H. P., Kötzsch, S., Keserue, H., Egli, T. (2010)
Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry. Cytometry Part A 77A, 264–274
- Fukushima H., Katsube K., Hata Y., Kishi R., Fujiwara S. (2007)
Rapid Separation and Concentration of Food-Borne Pathogens in Food Samples Prior to Quantification by Viable-Cell Counting and Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology 73, 92–100.
- Furmanek-Blaszczak B. (2014)
Phenotypic and molecular characteristics of an Aeromonas hydrophila strain isolated from the River Nile. Microbiological Research 169, 547–552.
- Furtado, C., Adak, G. K., Stuart, J. M., Wall, P. G., Evans, H. S., Casemore, D. P. (1998)
Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5. Epidemiology and Infection 121, 109–119
- Furtado, C., Adak, G. K., Stuart, J. M., Wall, P.G., Evans, H. S., Casemore, D. P. (2006)
Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5. Epidemiology and Infection 134, 1141 - 1149
- Gavriel, A. A., Landre, J. P. B., Lamb, A. J. (1998)
Incidence of mesophilic Aeromonas within a public drinking water supply in north-east Scotland. Journal of Applied Microbiology 84, 383–92
- Gemmell M.E., Schmidt S. (2013)
Is the microbiological quality of the Msunduzi River (KwaZulu-Natal, South Africa) suitable for domestic, recreational, and agricultural purposes? Environmental Science and Pollution Research 20, 6551–6562.
- George S., Kohan M., Whitehouse D., Creason J., Kawanishi C., Sherwood R., et al. (1991)
Distribution, clearance, and mortality of environmental pseudomonads in mice upon intranasal exposure. Applied and environmental microbiology 57, 2420–2425.
- Georgiou, S., Bateman, I. J. (2005)
Revision of the EU Bathing Water Directive: economic costs and benefits. Marine Pollution Bulletin 50, 430–438
- Ghenghesh, K. S., El-Ghodban, A., Dkakni, R., Abeid, S., Altomi, A., Tarhuni, A., Marialigeti, K. (2001)
Prevalence, Species Differentiation, Haemolytic Activity, and Antibiotic Susceptibility of Aeromonads in Untreated Well Water. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 96, 169–173
- Gheorghie S., Catrangiu A., Lucaciu I., Tiron O., Cosma C., Stoica C., et al. (2015)
Water microbial quality during drinking water treatment technology and distribution provided by two Romanian companies. Water Science and Technology: Water Supply 15, 66–74.
- Ghinsberg R.C., Bar Dov L., Rogol M., Sheinberg Y., Nitzan Y. (1994)
Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and sea water along the Tel Aviv coast. Microbios 77, 29–40.
- Gibotti A., Saridakis H.O., Pelayo J.S., Tagliari K.C., Falcão D.P. (2000)
Prevalence and virulence properties of Vibrio cholerae non-O1 Aeromonas spp. and Plesiomonas shigelloides isolated from Cambe Stream (State of Parana, Brazil). Journal of Applied Microbiology 89, 70–75.
- Girones R., Ferrús M.A., Alonso J.L., Rodriguez-Manzano J., Calgua B., de Abreu Corrêa A., et al. (2010)
Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. Water Research 44, 4325–4339.

- Goeres, D. M., Palys, T., Sandel, B. B., Geiger, J. (2004)
Evaluation of disinfectant efficacy against biofilm and suspended bacteria in a laboratory swimming pool model. Water Research 38, 3103–3109
- Gomba, A., Chidamba, L., Korsten L. (2016)
Prevalence and serovar diversity of Salmonella spp. in primary horticultural fruit production environments. Food Control 69, 13–19
- González M., Hänninen M.-L. (2012)
Effect of temperature and antimicrobial resistance on survival of Campylobacter jejuni in well water: application of the Weibull model. Journal of applied microbiology 113, 284–293.
- González-Escalona, N., Hammack, T. S., Russell, M., Jacobson, A. P., De Jesús, A. J., Brown, E. W., Lampel, K. A. (2009)
Detection of Live Salmonella sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting invA mRNA. Applied and Environmental Microbiology 75, 3714–3720
- González-Serrano C.J., Santos J.A., García-López M.L., Otero A. (2002)
Virulence markers in Aeromonas hydrophila and Aeromonas veronii biovar sobria isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. Journal of Applied Microbiology 93, 414–419.
- Gordon, M. A. (2008)
Salmonella infections in immunocompromised adults. Journal of Infection 56, 413–422
- Gorski L. (2012)
Selective Enrichment Media Bias the Types of Salmonella enterica Strains Isolated from Mixed Strain Cultures and Complex Enrichment Broths. PLoS ONE 7, e34722.
- Gorski L., Liang A.S. (2010)
Effect of enrichment medium on real-time detection of Salmonella enterica from lettuce and tomato enrichment cultures. Journal of Food Protection 73, 1047–1056.
- Gorski L., Parker C.T., Liang A., Cooley M.B., Jay-Russell M.T., Gordus A.G., et al. (2011)
Prevalence, Distribution, and Diversity of Salmonella enterica in a Major Produce Region of California. Applied and Environmental Microbiology 77, 2734–2748.
- Graczyk T.K., Sunderland D., Tamang L., Lucy F.E., Breyse P.N. (2007)
Bather density and levels of Cryptosporidium, Giardia, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. Parasitology Research 101, 1729–1731.
- Griffith J.F., Cao Y., McGee C.D., Weisberg S.B. (2009)
Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. Water Research 43, 4900–4907.
- Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Hacker, J., Brand, B. C. (1998)
Specific detection of Legionella pneumophila: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. Applied and environmental microbiology 64, 2686–2690
- Grobe S. (1996) *Bedeutung des extrazellulären Polysaccharids Alginate für die Resistenz aquatischer Stämme von Pseudomonas aeruginosa gegenüber Chlor*. Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, Deutschland.
- Grobe, S., Wingender, J., Flemming, H.-C. (2001)
Capability of mucoid Pseudomonas aeruginosa to survive in chlorinated water. International Journal of Hygiene and Environmental health 204, 139–142
- Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Borella, P., Messi, P. (2008)
Effect of Bacterial Interference on Biofilm Development by Legionella pneumophila. Current Microbiology 57, 532–536
- Guimarães V.F., Araújo M.A. V, Mendonça-hagler L.C.S., Hagler A.N. (1993)
Pseudomonas aeruginosa and other microbial indicators of pollution in fresh and marine waters of rio de janeiro, Brazil. Environmental Toxicology and Water Quality 8, 313–322.
- Gunnarsdottir M.J., Gardarsson S.M., Figueras M.J., Puigdomènech C., Juárez R., Saucedo G., et al. (2020)
Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. Science of the Total Environment 698, 134185.

- Gunther N.W., Chen C.Y. (2009)
The biofilm forming potential of bacterial species in the genus Campylobacter. Food Microbiology 26, 44–51.
- Gustafson, T. L., Band, J. D., Hutcheson Jr., R. H., Schaffner, W. (1983)
Pseudomonas folliculitis: an outbreak and review. Reviews of Infectious Diseases 5, 1–8
- Haas, C.N., Rose, J.B. and Gerba, C.P. (1999)
Quantitative Microbial Risk Assessment. John Wiley and Sons, New York.
- Hajjartabar M. (2010)
Pseudomonas aeruginosa isolated from otitis externa associated with recreational waters in some public swimming pools in Tehran. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases 5, 142–151.
- Haley B.J., Cole D.J., Lipp E.K. (2009)
Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne Salmonellae in a Rural Watershed. Applied and Environmental Microbiology 75, 1248–1255.
- Haller L., Poté J., Loizeau J.-L., Wildi W. (2009)
Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. Ecological Indicators 9, 540–547.
- Hambleton P., Broster M.G., Dennis P.J., Henstridge R., Fitzgeorge R., Conlan J.W. (1983)
Survival of virulent Legionella pneumophila in aerosols. The Journal of Hygiene 90, 451–460.
- Handfield M., Simard P., Letarte R. (1996)
Differential media for quantitative recovery of waterborne Aeromonas hydrophila. Applied and Environmental Microbiology 62, 3544–3547.
- Hänninen M., Haajanen H., Pummi T., Katila M., Sarkkinen H., Miettinen I. (2003)
Detection and Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli and Analysis of Indicator Organisms in Three Waterborne Outbreaks in Finland. Applied and Environmental Microbiology 69, 1391–1396.
- Hardalo, C., Edberg, S. C. (1997)
Pseudomonas aeruginosa: Assessment of Risk from Drinking Water. Critical Reviews in Microbiology 23, 47–75
- Harrison, T. G., Saunders, N. A. (1994)
Taxonomy and typing of Legionellae. Reviews in Medical Microbiology 5, 79-90
- Harwani D. (2016)
The Great Plate Count Anomaly and the Unculturable Bacteria. International Journal of Scientific Research 9, 350-351
- Harwood V.J., Staley C., Badgley B.D., Borges K., Korajkic A. (2014)
Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. FEMS Microbiology Reviews 38, 1–40.
- Havelaar A.H., During M., Versteegh J.F. (1987)
Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of Aeromonas species in water by membrane filtration. The Journal of applied Bacteriology 62, 279–287.
- Havelaar, A. H., Bosman, M., Borst J. (1983)
Otitis externa by Pseudomonas aeruginosa associated with whirlpools. The Journal of Hygiene 90, 489–498
- Havelaar, A. H., Schets, F. M., van Silfhout, A., Jansen, W. H., Wieten, G., van der Kooij, D. (1992)
Typing of Aeromonas strains from patients with diarrhoea and from drinking water. Journal of Applied Bacteriology 72, 435–444
- Heinemeyer, E.-A., Luden, K. (2009)
Probleme bei der Anwendung der DIN EN 12780 zum Nachweis von Pseudomonas aeruginosa aus Schwimmteichen und Oberflächengewässern. Bundesgesundheitsblatt 52, 345–51

- Hellein K.N., Battie C., Tauchman E., Lund D., Oyarzabal O. A, Lepo J.E. (2011)
Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with Campylobacter spp. in recreational waters. Journal of Water and Health 9, 695–707.
- Hellein, K. N., Kennedy, E. M., Harwood, V. J., Gordon, K. V., Wang, S. Y., Lepo J. E. (2012)
A filter-based propidium monoazide technique to distinguish live from membrane-compromised microorganisms using quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods 89, 76–78
- Hendricks, C. W. (1971)
Increased Recovery Rate of Salmonellae from Stream Bottom Sediments Versus Surface Waters. Applied Microbiology 21, 379–380
- Hentges D.J., Stein A.J., Casey S.W., Que J.U. (1985)
Protective role of intestinal flora against infection with Pseudomonas aeruginosa in mice: influence of antibiotics on colonization resistance. Infection and immunity 47, 118–122.
- Heuzenroeder M.W., Wong C.Y.F., Flower R.L.P. (1999)
Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of Aeromonas spp.: Correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiology Letters 174, 131–136.
- Highsmith A.K., Abshire R.L. (1975)
Evaluation of a most-probable-number technique for the enumeration of Pseudomonas aeruginosa. Applied Microbiology 30, 596–601.
- Hijnen W., Medema G. (2007)
Elimination of Microorganisms by Drinking Water Treatment Processes: A Review. Water Intelligence Online 9.
- Hijnen W.A. M., Schijven J.F., Bonn  P., Visser A., Medema G.J. (2004)
Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. Water Science and Technology 50, 147–54.
- Hijnen W.A., Van Veenendaal D., van der Speld W.M., Visser A., Hoogenboezem W., van der Kooij D. (2000)
Enumeration of faecal indicator bacteria in large water volumes using on site membrane filtration to assess water treatment efficiency. Water Research 34, 1659–1665.
- Hijnen W.A.M., Schijven J.F., Bonn  P., Visser A., Medema G.J. (2004)
Elimination of viruses, bacteria and protozoan oocysts by slow sand filtration. Water Science and Technology 50, 147–54.
- Hill V.R., Kahler A.M., Jothikumar N., Johnson T.B., Hahn D., Cromeans T.L. (2007a)
Multistate Evaluation of an Ultrafiltration-Based Procedure for Simultaneous Recovery of Enteric Microbes in 100-Liter Tap Water Samples. Applied and Environmental Microbiology 73, 6327–6327.
- Hill V.R., Kahler A.M., Jothikumar N., Johnson T.B., Hahn D., Theresa L., et al. (2007b)
Multistate Evaluation of an Ultrafiltration-Based Procedure for Simultaneous Recovery of Enteric Microbes in 100-Liter Tap Water Samples Multistate Evaluation of an Ultrafiltration-Based Procedure for Simultaneous Recovery of Enteric Microbes in 100-Liter. Applied and Environmental Microbiology 73, 4218–25.
- Ho, B. S. W., Tam, T. Y. (2000)
Rapid enumeration of Salmonella in environmental waters and wastewater. Water Research 34, 2397–2399
- H fle, M. G. (2006)
Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology 72, 1858–1872.
- Hokaj rvi A.-M., Pitkänen T., Siljanen H.M.P., Nakari U.-M., Torvinen E., Siitonen A., et al. (2013)
Occurrence of thermotolerant Campylobacter spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. Journal of Water and Health 11, 120 LP – 134.

- Holmes P., Niccolls L.M., Sartory D.P. (1996)
The ecology of mesophilic Aeromonas in the aquatic environment. The Genus *Aeromonas*, 127–150. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, UK
- Hörman A., Rimhanen-Finne R., Maunula L., von Bonsdorff C.-H., Torvela N., Heikinheimo A., *et al.* (2004)
Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp., Noroviruses, and Indicator Organisms in Surface Water in Southwestern Finland, 2000-2001. Applied and Environmental Microbiology 70, 87–95.
- Hornig, Y. T., Soo, P. C., Shen, B. J., Hung, Y. L., Lo, K. Y., Su, H. P., Wei, J. R., Hsieh, S. C., Hsueh, P. R., Lai, H. C. (2006)
Development of an improved PCR–ICT hybrid assay for direct detection of Legionellae and Legionella pneumophila from cooling tower water specimens. Water Research 40, 2221–2229
- Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., DuPont, H. L., Dawkins, A. T., Snyder, M. J. (1970)
Typhoid Fever: Pathogenesis and Immunologic Control. New England Journal of Medicine 283, 686–691
- Horstkott M., Strathmann M., Flemming H.-C., Wingender J. (2014)
Belastung der Ruhr mit hygienisch relevanten Bakterien. Vom Wasser 112, 52–55.
- Hou L., Zhou Q., Wu Q., Gu Q., Sun M., Zhang J. (2018)
Spatiotemporal changes in bacterial community and microbial activity in a full-scale drinking water treatment plant. Science of the Total Environment 625, 449–459.
- Humphrey T.J. (1989)
An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of Campylobacter jejuni from water and food. Journal of Applied Microbiology 66, 119–126.
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M. (2007)
Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. International journal of food microbiology 117, 237–257
- Huys, G. (2014)
The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg S. 27–57
- Huysmans M.B., Turnidge J.D., Williams J.H. (1995)
Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. Journal of clinical Microbiology 33, 3345–3346.
- Hygiene-Institut des Ruhrgebiets zu Gelsenkirchen (1962)
Denkschrift – “Sommerbäder an der Ruhr“. Selbstverlag verfasst von Wüstenberg, J. und Haak, K., Gelsenkirchen, Deutschland
- Ica, T., Caner, V., Istanbulu, O., Nguyen, H.D., Ahmed, B., Call, D.R., *et al.* (2012)
Characterization of mono- and mixed-culture Campylobacter jejuni biofilms. Applied and Environmental Microbiology 78, 1033–1038.
- Igbiosa I.H., Okoh A.I. (2013)
Detection and distribution of putative virulence associated genes in Aeromonas species from freshwater and wastewater treatment plant. Journal of Basic Microbiology 53, 895–901.
- Igbiosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A. I. (2012)
Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health. The Scientific World Journal 2012, 1–13
- Imzilin B., Krovacek K., Baloda S.B., Kühn I., Gonzalez-Rey C., Svenson S.B. (1998)
Characterisation of potential virulence markers in Aeromonas caviae isolated from polluted and unpolluted aquatic environments in Morocco. FEMS Microbiology Ecology 27, 153–161.
- Ishii S., Ksoll W.B., Hicks R.E., Sadowsky M.J. (2006)
Presence and Growth of Naturalized Escherichia coli in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. Applied and Environmental Microbiology 72, 612–621.
- ISO 11731:1998 (1998): Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Legionellen. Beuth Verlag GmbH, Berlin

- ISO 17995:2005 (2005): Water quality - Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- ISO/TS 12869:2012 (2012): Water quality - Detection and quantification of *Legionella* spp. and or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) Beuth Verlag GmbH, Berlin
- Isonhood, J. H., Drake, M. (2002)
Aeromonas Species in Foods. Journal of Food Protection 65, 575–582
- Itoh S. (2013)
Effect of the Ratio of Illness to Infection of Campylobacter on the Uncertainty of DALYs in Drinking Water. Journal of Water and Environment Technology 11, 209–224.
- Ivanova, E. P., Zhukova, N. V, Gorshkova, N. M., Chaikina, E. L. (2001)
Characterization of Aeromonas and Vibrio species isolated from a drinking water reservoir. Journal of applied microbiology 90, 919–27
- Janda, J. M., Abbott, S. L. (1998)
Evolving concepts regarding the genus Aeromonas: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clinical infectious diseases 27, 332–344
- Janda, J. M., Abbott, S. L. (2010)
The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical microbiology reviews 23, 35–73
- Jenkins M.B., Endale D.M., Fisher D.S. (2008)
Most probable number methodology for quantifying dilute concentrations and fluxes of Salmonella in surface waters. Journal of Applied Microbiology 104, 1562–1568.
- Jokinen C.C., Schreier H., Mauro W., Taboada E., Isaac-Renton J.L., Topp E., et al. (2010)
The occurrence and sources of Campylobacter spp., Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. Journal of Water and Health 8, 374–386.
- Jokinen, C., Edge, T. A., Ho, S., Koning, W., Laing, C., Mauro, W., Medeiros, D., Miller, J., Robertson, W., Taboada, E., Thomas, J. E., Topp, E., Ziebell, K., Gannon, V. P. J. (2011)
Molecular subtypes of Campylobacter spp., Salmonella enterica, and Escherichia coli O157:H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada. Water Research 45, 1247–1257
- Jones D.M., Sutcliffe E.M., Curry A. (1991)
Recovery of viable but non-culturable Campylobacter jejuni. Journal of General Microbiology 197, 2477–2482.
- Jones K. (2001)
Campylobacters in water, sewage and the environment. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 90, 68S-79S.
- Jones, K. (2005)
Flying hazards: birds and the spread of disease. Microbiology Today Nov, 175–177
- Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., Hoorfar, J. (2010)
Rapid Quantification of Viable Campylobacter Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment. Applied and Environmental Microbiology 76, 5097–5104
- Jules, M., Buchrieser, C. (2007)
Legionella pneumophila adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics. FEBS Letters 581, 2829–2838
- Jyoti A., Ram S., Vajpayee P., Singh G., Dwivedi P.D., Jain S.K., et al. (2010)
Contamination of surface and potable water in South Asia by Salmonellae: Culture-independent quantification with molecular beacon real-time PCR. Science of The Total Environment 408, 1256–1263.

- Jyoti, A., Vajpayee, P., Singh, G., Patel, C. B., Gupta, K. C., Shanker, R. (2011)
Identification of Environmental Reservoirs of Nontyphoidal Salmonellosis: Aptamer-Assisted Bioconcentration and Subsequent Detection of Salmonella Typhimurium by Quantitative Polymerase Chain Reaction. Environmental Science and Technology 45, 8996–9002
- Kapperud G., Espeland G., Wahl E., Walde A., Herikstad H., Gustavsen S., *et al.* (2003)
Factors Associated with Increased and Decreased Risk of Campylobacter Infection: A Prospective Case-Control Study in Norway. American Journal of Epidemiology 158, 234–242.
- Katz, S. M., Hammel, J. M. (1987)
The effect of drying, heat, and pH on the survival of Legionella pneumophila. Annals of Clinical, Laboratory Science 17, 150–156
- Kay D., Crowther J., Stapleton C.M., Wyer M.D., Fewtrell L., Anthony S., *et al.* (2008)
Faecal indicator organism concentrations and catchment export coefficients in the UK. Water Research 42, 2649–2661.
- Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Williams L.P., Hedberg K., Oxman G.L., *et al.* (1994)
A Swimming-Associated Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by Escherichia coli O157:H7 and Shigella sonnei. New England Journal of Medicine 331, 579–584.
- Kelly E.A., Feng Z., Gidley M.L., Sinigalliano C.D., Kumar N., Donahue A.G., *et al.* (2018)
Effect of beach management policies on recreational water quality. Journal of Environmental Management 212, 266–277.
- Kemp R., Leatherbarrow A.J.H., Williams N.J., Hart C.A., Clough H.E., Turner J., *et al.* (2005)
Prevalence and Genetic Diversity of Campylobacter spp. in Environmental Water Samples from a 100-Square-Kilometer Predominantly Dairy Farming Area. Applied and Environmental Microbiology 71, 1876–1882.
- Kerckhoffs, A. P. M., Ben-Amor, K., Samsom, M., van der Rest, M. E., de Vogel, J., Knol, J., Akkermans, L. M. (2011)
Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of Pseudomonas aeruginosa in irritable bowel syndrome. Journal of Medical Microbiology 60, 236–245
- Kerstens I., Vooren L. Van, Huys G., Janssen P., Kersters K., Verstraete W. (1995)
Influence of Temperature and Process Technology on the Occurrence of Aeromonas Species and Hygienic Indicator Organisms in Drinking Water Production Plants. Microbial Ecology 30, 203–218.
- Khajanchi B.K., Fadl A.A., Borchardt M.A., Berg R.L., Horneman A.J., Stemper M.E., *et al.* (2010)
Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of Aeromonas species isolates from water and clinical samples: Suggestive evidence of water-to-human transmission. Applied and Environmental Microbiology 76, 2313–2325.
- Khan I.U.H., Gannon V., Jokinen C.C., Kent R., Koning W., Lapen D.R., *et al.* (2014)
A national investigation of the prevalence and diversity of thermophilic Campylobacter species in agricultural watersheds in Canada. Water Research 61, 243–252.
- Khan N.H., Ahsan M., Taylor W.D., Kogure K. (2010)
Culturability and Survival of Marine, Freshwater and Clinical Pseudomonas aeruginosa. Microbes and Environments 25, 266–274.
- Khan, A. A., Cerniglia, C. E. (1994)
Detection of Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Applied and Environmental Microbiology 60, 3739–3745
- Khan, N. H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M., Kogure, K. (2007)
Isolation of Pseudomonas aeruginosa from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. Microbial ecology 53, 173–86
- Khor W.C., Puah S.M., Tan J.A.M.A., Puthuchearry S., Chua K.H. (2015)
Phenotypic and Genetic Diversity of Aeromonas Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. Plos One 10, e0145933.
- Kim S.A., Lee Y.M., Hwang I.G., Kang D.H., Woo G.J., Rhee M.S. (2009)
Eight enrichment broths for the isolation of Campylobacter jejuni from inoculated suspensions and ground pork. Letters in Applied Microbiology 49, 620–626.

- King, C. H., Shotts, E. B., Wooley, R. E., Porter K.G. (1988)
Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Applied and Environmental Microbiology 54, 3023–3033.
- Kingombe C.I., Huys G., Tonolla M., Albert M.J., Swings J., Peduzzi R., et al. (1999)
PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in Aeromonas spp. Applied and Environmental Microbiology 65, 5293–5302.
- Kinzelman J., Ng C., Jackson E., Gradus S., Bagley R. (2003)
Enterococci as Indicators of Lake Michigan Recreational Water Quality: Comparison of Two Methodologies and Their Impacts on Public Health Regulatory Events. Applied and Environmental Microbiology 69, 92–96.
- Kirov S.M., Castrisios M., Shaw J.G. (2004)
Aeromonas Flagella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. Infection and Immunity 72, 1939–1945.
- Kistemann T., Claßen T., Koch C., Dangendorf F., Fischeder R., Gebel J., et al. (2002)
Microbial Load of Drinking Water Reservoir Tributaries during Extreme Rainfall and Runoff. Applied and Environmental Microbiology 68, 2188–2197.
- Kistemann T., Flemming H. (2016)
Editorial. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 627–628
- Kistemann T., Schmidt A., Flemming H.C. (2016)
Post-industrial river water quality—Fit for bathing again? International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 629–642.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., Tümmler, B. (2011)
Pseudomonas aeruginosa genomic structure and diversity. Frontiers in Microbiology 2, 1–18
- Knöchel S. (1989)
Effect of temperature on hemolysin production in Aeromonas spp. isolated from warm and cold environments. International journal of food microbiology 9, 225–35.
- Koenraad P.M.F.J., Rombouts F.M., Notermans S.H.W. (1997)
Epidemiological aspects of thermophilic Campylobacter in water-related environments : A review. Water Environment Research 69, 52–63.
- Koenraad, P. M. F. J., Hazeleger, W. C., van der Laan, T., Beumer, R. R., Rombouts, F. M. (1994)
Survey of Campylobacter spp in sewage plants in The Netherlands. Food Microbiology 11, 65–73
- Konkel, M. E., Kim, B. J., Klena, J. D., Young, C. R., Ziprin, R. (1998)
Characterization of the Thermal Stress Response of Campylobacter jejuni. Infection and Immunity 66, 3666–3672
- Korajkic A., McMinn B.R., Harwood V.J. (2018)
Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings. International Journal of Environmental Research and Public Health 15, 1–39.
- Korhonen L.K., Martikainen P.J. (1991)
Survival of Escherichia coli and Campylobacter jejuni in untreated and filtered lake water. Journal of Applied Bacteriology 71, 379–382.
- Körkoca H., Alan Y., Bozari S., Berktaş M., Goz Y. (2014)
Detection of putative virulence genes in Aeromonas isolates from humans and animals. The Journal of Infection in Developing Countries; Vol 8, No 11: November 2014.
- Kozlica J., Claudet A.L., Solomon D., Dunn J.R., Carpenter L.R. (2010)
Waterborne outbreak of Salmonella i 4,[5],12:i:-. Foodborne Pathogens and Disease 7, 1431–1433.
- Krovacek K., Faris A., Baloda S.B., Lindberg T., Peterz M., Månsson I. (1992)
Isolation and virulence profiles of Aeromonas spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. Food Microbiology 9, 215–222.
- Krovacek K., Faris A., Månsson I. (1991)
Growth of and toxin production by Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria at low temperatures. International Journal of Food Microbiology 13, 165–175.

- Ksoll W.B., Ishii S., Sadowsky M.J., Hicks R.E. (2007)
Presence and Sources of Fecal Coliform Bacteria in Epilithic Periphyton Communities of Lake Superior. Applied and Environmental Microbiology 73, 3771–3778.
- Kueh C.S.W., Tam T.-Y., Lee T., Wong S.L., Lloyd O.L., Yu I.T.S., *et al.* (1995)
Epidemiological study of swimming-associated illnesses relating to bathing-beach water quality. Water Science and Technology 31, 1–4.
- Kühn I., Allestam G., Huys G., Janssen P., Kersters K., Krovacek K., *et al.* (1997)
Diversity, persistence and virulence of Aeromonas strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. Applied and Environmental Microbiology 63, 2708–2715.
- LaGier, M. J., Joseph, L. A., Passaretti, T. V., Musser, K. A., Cirino N. M. (2004)
A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Molecular and Cellular Probes 18, 275–282
- Lamy, B., Kodjo, A., Laurent, F. (2009)
Prospective nationwide study of Aeromonas infections in France. Journal of Clinical Microbiology 47, 1234–1237
- Lamy, B., Kodjo, A., Laurent, F. (2011)
Identification of Aeromonas isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 71, 1–5
- Lamy, B., Laurent, F., Verdier, I., Decousser, J. W., Lecaillon, E., Marchandin, H., Roger, F., Tigaud, S., de Montclos, H.; colBVH Study Group, Kodjo, A. (2010)
Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical Aeromonas isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 67, 9–14
- Lastovica, A. J., Roux, E. (2000)
Efficient Isolation of Campylobacteria from Stools. Journal of Clinical Microbiology 38, 2798–2800
- Laube, T., Cortés, P., Llagostera, M., Alegret, S., Pividori, M. I. (2014)
Phagomagnetic immunoassay for the rapid detection of Salmonella. Applied Microbiology and Biotechnology 98, 1795–1805
- Lavender J.S., Kinzelman J.L. (2009)
A cross comparison of QPCR to agar-based or defined substrate test methods for the determination of Escherichia coli and enterococci in municipal water quality monitoring programs. Water Research 43, 4967–4979.
- Le Bars H., Kayal S., Bonnaure-Mallet M., Minet J. (2011)
CASA Chromogenic Medium for Enteric Campylobacter Species. Journal of Clinical Microbiology 49, 3675–3677.
- Leclerc, H., Mossel, D. A. A., Edberg, S. C., Struijk, C. B. (2001)
Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annual review of microbiology 55, 201–234
- Lee J. V., Lai S., Exner M., Lenz J., Gaia V., Casati S., *et al.* (2011)
An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. Journal of Applied Microbiology 110, 1032–1044.
- Lee T.C., Vickers R.M., Yu V.L., Wagener M.M. (1993)
Growth of 28 Legionella species on selective culture media: a comparative study. Journal of Clinical Microbiology 31, 2764–2768.
- Lehtola M.J., Loades C.J., Keevil C.W. (2005)
Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter lari. Journal of Microbiological Methods 62, 211–219.
- Lehtola M.J., Pitkänen T., Miebach L., Miettinen I.T. (2006)
Survival of Campylobacter jejuni in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. Water Science and Technology 54, 57 LP – 61.

- Lemarchand K., Lebaron P. (2003)
Occurrence of Salmonella spp. and Cryptosporidium spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. FEMS Microbiology Letters 218, 203 LP – 209.
- Lesnik, R., Brettar, I., Hofle, M. G. (2016)
Legionella species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaptation to thermophily. ISME J 10, 1064–1080
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., Tandoi, V. (2012)
Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. Food Research International 45, 587–602
- Lévesque S., St-Pierre K., Frost E., Arbeit R.D., Michaud S. (2011)
Determination of the optimal culture conditions for detecting thermophilic campylobacters in environmental water. Journal of microbiological methods 86, 82–88.
- Levin, R. E. (2007)
Campylobacter jejuni: A Review of its Characteristics, Pathogenicity, Ecology, Distribution, Subspecies Characterization and Molecular Methods of Detection. Food Biotechnology 21, 271–347
- Li, B., Chen, J.Q. (2013)
Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live Salmonella spp. in food. BMC Microbiol 13, 273.
- Li F., Wang W., Zhu Z., Chen A., Du P., Wang R., et al. (2015a)
Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of Aeromonas isolates from diarrheal patients and water, China. Journal of Infection 70, 600–608.
- Li H., Xin H., Li S.F.Y. (2015b)
Multiplex PMA-qPCR Assay with Internal Amplification Control for Simultaneous Detection of Viable Legionella pneumophila, Salmonella typhimurium, and Staphylococcus aureus in Environmental Waters. Environmental Science and Technology 49, 14249–14256.
- Liang Z., Keeley A. (2013) *Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples*. Environmental Science, Technology 47, 9324–9331.
- Lin W., Yu Z., Zhang H., Thompson I.P. (2014)
Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. Water Research 52, 218–230.
- Liu H., Whitehouse C.A., Li B. (2018)
Presence and Persistence of Salmonella in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. Frontiers in Public Health 6, 1–13.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H. (2000)
How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? Systematic and applied microbiology 23, 556–62
- Lund V. (1996)
Evaluation of E. coli as an indicator for the presence of Campylobacter jejuni and Yersinia enterocolitica in chlorinated and untreated oligotrophic lake water. Water Research 30, 1528–1534.
- Luo J.F., Lin W.T., Guo Y. (2010)
Method to detect only viable cells in microbial ecology. Appl Microbiol Biotechnol 86.
- Maalej S., Denis M., Dukan S. (2004)
Temperature and growth-phase effects on Aeromonas hydrophila survival in natural seawater microcosms: Role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. Microbiology 150, 181–187.
- Maalej S., Mahjoubi A., Elazri C., Dukan S. (2003)
Simultaneous effects of environmental factors on motile Aeromonas dynamics in an urban effluent and in the natural seawater. Water Research 37, 2865–2874.
- Mackowiak M., Leifels M., Hamza I.A., Jurzik L., Wingender J. (2018)
Distribution of Escherichia coli, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. Science of the Total Environment 626, 650–659.

- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2005)
Brock - Biology of Microorganisms. Pearson Prentice, Upper Saddle River, New Jersey
- Madsen M. (1994)
Enumeration of salmonellae in crocodile pond water by direct plate counts and by the mpn technique. Water Research 28, 2035-2037.
- Maiwald, M., Helbig, J. H., Lück, P. C. (1998)
Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. Journal of Microbiological Methods 33, 59–79
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., Hoekstra, R. M. (2010)
The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. Clinical Infectious Diseases 50, 882–889
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., Helmuth, R. (2003)
Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. Applied and Environmental Microbiology 69, 290–296
- Mälzer H.J., aus der Beek T., Müller S., Gebhardt J. (2016)
Comparison of different model approaches for a hygiene early warning system at the lower Ruhr River, Germany. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 671–680.
- Mansilha C.R., Coelho C. a, Reinas A., Moutinho A., Ferreira S., Pizarro C., et al. (2010)
Salmonella: the forgotten pathogen: health hazards of compliance with European bathing water legislation. Marine pollution bulletin 60, 819–26.
- Mansilha, C. R., Coelho, C. A., Heitor, A. M., Amado, J., Martins, J. P., Gameiro, P. (2009)
Bathing waters: New directive, new standards, new quality approach. Marine Pollution Bulletin 58, 1562–1565
- Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenstrom T., Hutzler P., Schleiffner K.H. (1995)
In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA- targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. Microbiology-Uk 141, 29–39.
- Marrie, T. J., Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R. J., De Carolis, E., Duperval, R., Field, S., Louie, T., Houston, S., Gribble, M., Williams, K., Nicolle, L., Grossman, R., Salit, I., Saginur, R., Gregson, D., Laverdiere, M., Joly, J., Marrie, T., Hutchinson, J. (2001)
Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. Emerging Infectious Diseases 7, 1026–1029
- Martikainen P.J., Korhonen L.K., Kosunen T.U. (1990)
Occurrence of thermophilic campylobacters in rural and urban surface waters in central finland. Water Research 24, 91–96.
- Martiny D., Dediste A., Debruyne L., Vlaes L., Haddou N.B., Vandamme P., et al. (2011)
Accuracy of the API Campy system, the Vitek 2 Neisseria–Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of Campylobacter and related organisms. Clinical Microbiology and Infection 17, 1001–1006.
- Mary, P., Chihib, N. E., Charafeddine, O., Defives, C., Hornez, J. P. (2002)
Starvation survival and viable but nonculturable states in Aeromonas hydrophila. Microbial Ecology 43, 250–258
- Massa S., Altieri C., D'Angela A. (2001)
The occurrence of Aeromonas spp. in natural mineral water and well water. International Journal of Food Microbiology 63, 169–73.
- Mauchline, W. S., Keevil, C. W. (1991)
Development of the BIOLOG substrate utilization system for identification of Legionella spp. Applied and Environmental Microbiology 57, 3345–3349
- McBride G.B., Mittinty M.N. (2007)
Explaining differential timing of peaks of a pathogen versus a faecal indicator during flood events. MODSIM07 - Land, Water and Environmental Management: Integrated Systems for Sustainability, Proceedings, 2417–2423.

- McCullough N.B., Eisele C.W. (1951) *Experimental Human Salmonellosis : I . Pathogenicity of Strains of Salmonella meleagridis and Salmonella anatum Obtained from Spray-Dried Whole Egg*. The Journal of Infectious Diseases 88, 278–289.
- McCullough N.B., Eisele C.W. (1951a) *Experimental Human Salmonellosis: III. Pathogenicity of Strains of Salmonella newport, Salmonella derby, and Salmonella bareilly Obtained from Spray-Dried Whole Egg*. The Journal of Infectious Diseases 89, 209–213.
- McCullough N.B., Eisele C.W. (1951b) *Experimental Human Salmonellosis: IV. Pathogenicity of Strains of Salmonella pullorum Obtained from Spray-Dried Whole Egg*. The Journal of Infectious Diseases 89, 259–265.
- McEgan, R., Mootian, G., Goodridge, L. D., Schaffner, D. W., Danyluk, M. D. (2013) *Predicting Salmonella Populations from Biological, Chemical, and Physical Indicators in Florida Surface Waters*. Applied and Environmental Microbiology 79, 4094–4105
- McKay A.M. (1992) *Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water*. Letters in Applied Microbiology 14, 129–135.
- McQuiston, J. R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B. C., Doyle, J., Fields, P. I., Tauxe, R. V, Logsdon, J. M. (2008) *Molecular Phylogeny of the Salmonellae: Relationships among Salmonella Species and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events*. Journal of Bacteriology 190, 7060–7067
- Medema G., Wullings B., Roeleveld P., van der Kooij D. (2004) *Risk assessment of Legionella and enteric pathogens in sewage treatment works*. Water Science and Technology: Water Supply 4, 125 LP – 132.
- Medema, G. J., Teunis, P. F., Havelaar, A. H., Haas C.N. (1996) *Assessment of the dose-response relationship of Campylobacter jejuni*. International journal of food microbiology 30, 101–111
- Mekkour, M., Driss, E. K. B., Tai, J., Cohen, N. (2013) *Legionella pneumophila: An Environmental Organism and Accidental Pathogen*. International Journal of Science and Technology 2, 187–196
- Mena K.D., Gerba C.P. (2009) *Risk Assessment of Pseudomonas aeruginosa in Water*. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201. (Ed. D.M. Whitacre), pp. 71–115. Springer US, Boston, MA.
- Mendis N., McBride P., Faucher S.P. (2015) *Short-Term and Long-Term Survival and Virulence of Legionella pneumophila in the Defined Freshwater Medium Fraquil*. PLoS ONE 10, e0139277.
- Merino F.J., Agulla A., Villasante P.A., Díaz A., Saz J. V, Velasco A.C. (1986) *Comparative efficacy of seven selective media for isolating Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology 24, 451–452.
- Meyer-Hoffert, U., Zimmermann, A., Czapp, M., Bartels, J., Koblyakova, Y., Gläser, R., Schröder, J. M., Gerstel, U. (2011) *Flagellin Delivery by Pseudomonas aeruginosa Rhamnolipids Induces the Antimicrobial Protein Psoriasin in Human Skin*. PLOS ONE 6, e16433
- Mezrioui, N., Baleux, B., Troussellier M. (1995) *A microcosm study of the survival of Escherichia coli and Salmonella Typhimurium in brackish water*. Water Research 29, 459–465
- Mihaljevic, R. R., Sikic, M., Klančnik, A., Brumini, G., Mozina, S.S., Abram, M. (2007) *Environmental stress factors affecting survival and virulence of Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis 43, 120–125
- Miller R.S., Speegle L., Oyarzabal O.A., Lastovica A.J. (2008) *Letters to the Editor: Evaluation of Three Commercial Latex Agglutination Tests for Identification of Campylobacter spp*. Journal of Clinical Microbiology 46, 3546–3547.

- Ministerium für Inneres und Kommunales Nordrhein-Westfalen (2007): Verordnung über die Qualität und die Bewirtschaftung der Badegewässer (Badegewässerverordnung) vom 11. Dezember 2007, zuletzt geändert 6.12.2013
- Miyake M., Iga K., Izumi C., Miyagawa A., Kobashi Y., Konishi T. (2000)
Rapidly Progressive Pneumonia Due to Aeromonas hydrophila Shortly after Near-drowning. Internal Medicine 39, 1128–1130
- Moore A.C., Herwaldt B.L., Craun G.F., Calderon R.L., Highsmith A.K., Juranek D.D. (1993)
Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks—United States, 1991–1992. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries 42, 1–22.
- Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Kempf, I., Lastovica, A. J., Lowery, C. J., Matsuda, M., McDowell, D. A., McMahon, A., Cherie Millar, B., Rao, J. R., Rooney, P. J., Seal, B. S., Snelling, W. J., Tolba, O. (2006)
The epidemiology of antibiotic resistance in Campylobacter. Microbes and Infection 8, 1955–1966
- Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell, D. A., Mégraud, F., Cherie Millar, B., O’Mahony, R., O’Riordan, L., O’Rourke, M., Rao, J. R., Rooney, P. J., Sails, A., Whyte, P. (2005)
Campylobacter. Veterinary Research 36, 351–382
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Alonso, L., Ferrús, M. A., Hernández, M., Hernández, J. (2003)
Specific Detection of Arcobacter and Campylobacter Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. Applied and environmental microbiology 69, 1181–1186
- Morgan D.R., Johnson P.C., DuPont H.L., Satterwhite T.K., Wood L. V. (1985)
Lack of correlation between known virulence properties of Aeromonas hydrophila and enteropathogenicity for humans. Infection and Immunity 50, 62–65.
- Moriñigo M.A., Córnaux R., Muñoz M.A., Romero P., Borrego J.J. (1990)
Relationships between salmonella spp and indicator microorganisms in polluted natural waters. Water Research 24, 117–120.
- Morio F., Corvec S., Caroff N., Le Gallou F., Drugeon H., Reynaud A. (2008)
Real-time PCR assay for the detection and quantification of Legionella pneumophila in environmental water samples: Utility for daily practice. International Journal of Hygiene and Environmental Health 211, 403–411.
- Moritz M.M., Flemming H., Wingender J. (2010)
Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. International Journal of Hygiene and Environmental Health 213, 190–197.
- Moter, A., Göbel, U.B. (2000)
Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. Journal of microbiological methods 41, 85–112.
- Muder, R. R., Yu, V. L. (2002)
Infection Due to Legionella Species Other Than L. pneumophila. Clinical Infectious Diseases 35, 990–998
- Mughini-Gras L., Penny C., Ragimbeau C., Schets F.M., Blaak H., Duim B., et al. (2016)
Quantifying potential sources of surface water contamination with Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Water Research 101, 36–45.
- Mughini-Gras, L., Smid, J. H., Wagenaar, J. A., de Boer, A. G., Havelaar, A. H., Friesema, I. H. M., French, N. P., Busani, L. van Pelt, W. (2012)
Risk Factors for Campylobacteriosis of Chicken, Ruminant, and Environmental Origin: A Combined Case-Control and Source Attribution Analysis. PLoS ONE 7, e42599
- Muirhead R.W., Davies-Colley R.J., Donnison A.M., Nagels J.W. (2004)
Faecal bacteria yields in artificial flood events: quantifying in-stream stores. Water Research 38, 1215–1224.

- Mukhopadhyay, C., Bhargava, A., Ayyagari A. (2003)
Aeromonas hydrophila and aspiration pneumonia: A diverse presentation. *Yonsei Medical Journal* 44, 1087–1090
- Muller, D., Edwards, M. L., Smith, D. W. (1983)
Changes in Iron and Transferrin Levels and Body Temperature in Experimental Airborne Legionellosis. *Journal of Infectious Diseases* 147, 302–307
- Murphy H.M., Thomas M.K., Schmidt P.J., Medeiros D.T., McFadyen S., Pinta K.D.M. (2016)
Estimating the burden of acute gastrointestinal illness due to Giardia, Cryptosporidium, Campylobacter, E. coli O157 and norovirus associated with private wells and small water systems in Canada. *Epidemiology and Infection* 144, 1355–1370.
- Murphy, C., Carroll, C., Jordan, K. N. (2003)
Identification of a novel stress resistance mechanism in Campylobacter jejuni. *Journal of Applied Microbiology* 95, 704–708
- Murphy, C., Carroll, C., Jordan, K. N. (2005)
The effect of different media on the survival and induction of stress responses by Campylobacter jejuni. *Journal of Microbiological Methods* 62, 161–166
- Murphy, C., Carroll, C., Jordan, K. N. (2006)
Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen Campylobacter jejuni. *Journal of Applied Microbiology* 100, 623–632
- Nachamkin, I. (2002)
Chronic effects of Campylobacter infection. *Microbes and Infection* 4, 399–403
- Nachamkin, I., Barbagallo, S. (1990)
Culture confirmation of Campylobacter spp. by latex agglutination. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 817–818
- Neal, K. R., Scott, H. M., Slack, R. C. B., Logan, R. F. A. (1996)
Omeprazole as a risk factor for campylobacter gastroenteritis: case-control study. *BMJ* 312, 414 LP-415
- Neal, K. R., Slack, R. C. (1997)
Diabetes mellitus, anti-secretory drugs and other risk factors for campylobacter gastro-enteritis in adults: a case-control study. *Epidemiology and Infection* 119, 307–311
- Nevers M.B., Byappanahalli M.N., Whitman R.L. (2013)
Choices in Recreational Water Quality Monitoring: New Opportunities and Health Risk Trade-Offs. *Environmental Science and Technology* 47, 3073–3081.
- Ngwa G.A., Schop R., Chow J., Lukic L., McKague K. (2017)
Comparative detection and recovery of Pseudomonas aeruginosa by membrane filtration and a Most Probable Number technique. *Journal of Microbiological Methods* 133, 76–81.
- Nocker, A., Camper, A. K. (2006)
Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1997–2004
- Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. (2006)
Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67
- Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A. K., Brousseau, R. (2009)
Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods* 76
- Nogva, H. K., Drømtorp, S. M., Nissen, H., Rudi, K. (2003)
Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 34, 804–813
- O'Neill, E., Humphreys, H. (2005)
Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? *Journal of Hospital Infection* 59, 273–279

- Obiri-Danso K., Paul N., Jones K. (2001)
The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of Campylobacter jejuni, Camp. coli, Camp. lari and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters. Journal of Applied Microbiology 90, 256–267.
- Ohman D.E., Chakrabarty A.M. (1981)
Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate. Infection and Immunity 33, 142–148.
- Olaniran A.O., Nzimande S.B.T., Mkize N.G. (2015)
Antimicrobial resistance and virulence signatures of Listeria and Aeromonas species recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa. BMC microbiology 15, 234.
- Oliver D.M., Heathwaite A.L., Fish R.D., Chadwick D.R., Hodgson C.J., Winter M., et al. (2009)
Scale appropriate modelling of diffuse microbial pollution from agriculture. Progress in Physical Geography 33, 358–377.
- Oliver D.M., van Niekerk M., Kay D., Heathwaite A.L., Porter J., Fleming L.E., et al. (2014)
Opportunities and limitations of molecular methods for quantifying microbial compliance parameters in EU bathing waters. Environment International 64, 124–128.
- Oliver, J. D. (2005)
The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of Microbiology 43, 93–100.
- Olsen J.S., Aarskaug T., Thrane I., Pourcel C., Ask E., Johansen G., et al. (2010)
Alternative Routes for Dissemination of Legionella pneumophila Causing Three Outbreaks in Norway. Environmental Science and Technology 44, 8712–8717.
- Ortiz-Roque C.M., Hazen T.C. (1987)
Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. Applied and Environmental Microbiology 53, 2231–2236.
- Oscar T. (2004)
Dose-Response Model for 13 Strains of Salmonella. Risk Analysis 24, 41–49.
- Ottaviani D., Parlani C., Citterio B., Masini L., Leoni F., Canonico C., et al. (2011)
Putative virulence properties of Aeromonas strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. International Journal of Food Microbiology 144, 538–545.
- Pablos M., Remacha M.A., Rodríguez-Calleja J.M., Santos J.A., Otero A., García-López M.L. (2010)
Identity, virulence genes, and clonal relatedness of Aeromonas isolates from patients with diarrhea and drinking water. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 29, 1163–1172.
- Pablos M., Rodríguez-Calleja J.M., Santos J.A., Otero A., García-López M.L. (2009)
Occurrence of motile Aeromonas in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. International Journal of Food Microbiology 135, 158–164.
- Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., Santos, J. A., García-López, M. L. (2011)
Identification and epidemiological relationships of Aeromonas isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. International Journal of Food Microbiology 147, 203–210
- Palmer C.J., Tsai Y.L., Paszko-Kolva C., Mayer C., Sangermano L.R. (1993)
Detection of Legionella species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. Applied and Environmental Microbiology 59, 3618–3624.
- Panait V., Iarim F. (2019)
Bactcontrol - on line analyzer for water microbiology. International Symposium “The Environmental and The Industry,” 61–62.
- Park, S. F. (2002)
The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology 74, 177–188

- Park, S. H., Hanning, I., Jarquin, R., Moore, P., Donoghue, D. J., Donoghue, A. M., Ricke, S.C. (2011)
Multiplex PCR assay for the detection and quantification of Campylobacter spp., Escherichia coli O157:H7, and Salmonella serotypes in water samples. FEMS Microbiology Letters 316, 7–15
- Parker, J. L., Shaw, J. G. (2011)
Aeromonas spp. clinical microbiology and disease. Journal of Infection 62, 109–118
- Parthuisot N., West N.J., Lebaron P., Baudart J. (2010)
High Diversity and Abundance of Legionella spp. in a Pristine River and Impact of Seasonal and Anthropogenic Effects. Applied and Environmental Microbiology 76, 8201–8210.
- Patrone V., Campana R., Vallorani L., Dominici S., Federici S., Casadei L., et al. (2013)
CadF expression in Campylobacter jejuni strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. Antonie van Leeuwenhoek 103, 979–988.
- Paulin, S. M., On, S. L. W. (2010)
Campylobacter fact sheet: taxonomy, pathogenesis, isolation, detection and future perspectives. Quality Assurance and Safety of Crops and Foods 2, 127–132
- Payment P., Gamache F., Paquette G. (1988)
Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. Canadian Journal of Microbiology 34, 1304–1309.
- Pellett S., Bigley D. V, Grimes D.J. (1983)
Distribution of Pseudomonas aeruginosa in a Riverine Ecosystem. Applied and Environmental Microbiology 45, 328–332.
- Phin N., Parry-Ford F., Harrison T., Stagg H.R., Zhang N., Kumar K., et al. (2014)
Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. The Lancet Infectious Diseases 14, 1011–1021.
- Pirnay, J.-P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J., De Vos, D., Zizi, M., Triest, L., Comelis, P. (2005)
Global Pseudomonas aeruginosa biodiversity as reflected in a Belgian river. Environmental microbiology 7, 969–80
- Pitkänen T. (2013)
Review of Campylobacter spp. in drinking and environmental waters. Journal of Microbiological Methods 95, 39–47.
- Pitkänen, T., Bräcker, J., Miettinen, I. T., Heitto, A., Pesola, J., Hakalehto, E. (2009)
Enhanced enrichment and detection of thermotolerant Campylobacter species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR. Canadian Journal of Microbiology 55, 849–858
- Polo F., Figueras M.J., Inza I., Sala J., Fleisher J.M., Guarro J. (1999)
Prevalence of Salmonella serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. Antonie van Leeuwenhoek 75, 285–92.
- Polo F., Figueras M.J., Inza I., Sala J., Fleisher J.M., Guarro J. (1998)
Relationship between presence of Salmonella and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. FEMS Microbiology Letters 160, 253 LP – 256.
- Poppert, S., Haas, M., Yildiz, T., Alter, T., Bartel, E., Fricke, U., Essig, A. (2008)
Identification of Thermotolerant Campylobacter Species by Fluorescence In Situ Hybridization. Journal of Clinical Microbiology 46, 2133–2136
- Price D., Ahearn D.G. (1988)
Incidence and Persistence of Pseudomonas aeruginosa in Whirlpools. Journal of Clinical Microbiology 26, 1650–1654.
- Prieto M.D., Lopez B., Juanes J. a, Revilla J. a, Llorca J., Delgado-Rodríguez M. (2001)
Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. Journal of Epidemiology and Community Health 55, 442–7.

- Prüss, A. (1998)
Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. International Journal of Epidemiology 27, 1–9
- Pund, R. P., Theegarten, D. (2008)
Die Bedeutung der beweglichen Aeromonaden als Krankheitserreger für den Menschen. Bundesgesundheitsblatt 51, 569–576
- Quilliam, R. S., Kinzelman, J., Brunner, J., Oliver, D. M. (2015)
Resolving conflicts in public health protection and ecosystem service provision at designated bathing waters. Journal of Environmental Management 161, 237 - 242
- Rabsch, W., Tschäpe, H., Bäumler, A. J. (2001)
Non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems. Microbes and Infection 3, 237–247
- Rahman, M., Abd, H., Romling, U., Sandstrom, G., Möllby, R. (2008)
Aeromonas-Acanthamoeba interaction and early shift to a viable but nonculturable state of Aeromonas by Acanthamoeba. Journal of Applied Microbiology 104, 1449–1457
- Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F., Shao J., Tompkins R.G., Ausubel F.M. (1995)
Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268, 1899 LP – 1902.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss III, R., Gyles, C. L. (1992)
Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Molecular and Cellular Probes 6, 271–279
- Ramteke P.W., Pathak S.P., Gautam A.R., Bhattacharjee J.W. (1993)
Association of aeromonas caviae with sewage pollution. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology 28, 859–870.
- Razzolini M.T.P., Günther W.M.R., Martone-Rocha S., Luca H.D. de, Cardoso M.R.A. (2010)
Aeromonas presence in drinking water from collective reservoirs and wells in peri-urban area in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 41, 694–699.
- Rechenburg, A., Kistemann, T. (2009)
Sewage effluent as a source of Campylobacter sp. in a surface water catchment. International Journal of Environmental Health Research 19, 239–249.
- Reeser R.J., Medler R.T., Billington S.J., Jost B.H., Joens L.A. (2007)
Characterization of Campylobacter jejuni Biofilms under Defined Growth Conditions. Applied and Environmental Microbiology 73, 1908–1913.
- Reuter M., Mallett A., Pearson B.M., Van Vliet A.H.M. (2010)
Biofilm formation by Campylobacter jejuni is increased under aerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 76, 2122–2128.
- Rhodes M.W., Kator H. (1988)
Survival of Escherichia coli and Salmonella spp. in estuarine environments. Applied and Environmental Microbiology 54, 2902–2907.
- Rice S.A., van den Akker B., Pomati F., Roser D. (2012)
A risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in swimming pools: a review. Journal of Water and Health 10, 181–96.
- Richards A.M., Von Dwingelo J.E., Price C.T., Kwaik Y.A. (2013)
Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella-amoeba interaction. Virulence 4, 307–314.
- RICHTLINIE 2006/7/EG “EU-Badegewässerrichtlinie“
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
- Rippey, S. R., Cabelli, V. J. (1980)
Occurrence of Aeromonas hydrophila in Limnetic Environments: Relationship of the Organism to Trophic State. Microbial Ecology 6, 45–54

- RKI (2002)
Pseudomonas aeruginosa in einem Trinkwassernetz - Erfahrungsbericht zu den eingeleiteten Maßnahmen des Gesundheitsamtes. Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 40, 337–338
- RKI (2013)
Epidemiologisches Bulletin 35/2013. Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
- Rodda N., Bateman B., Kfir R. (1993)
Removal of Salmonella typhi, Shigella dysenteriae, Vibrio cholerae and rotavirus from water using a water treatment tablet. Water Science and Technology 27, 347–350.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J. V, Keevil, C.W. (1994)
Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora. Applied and Environmental Microbiology 60, 1585–1592.
- Roll, B. M., Fujioka, R. S. (1995)
Detection of legionella bacteria in sewage by polymerase chain reaction and standard culture method. Water Science and Technology 31, 409 LP-416
- Rollins D.M., Colwell R.R. (1986)
Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology 52, 513–538.
- Römling U., Bian Z., Hammar M., Sierralta W.D., Normark S. (1998)
Curli Fibers Are Highly Conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with Respect to Operon Structure and Regulation. Journal of Bacteriology 180, 722–731.
- Römling, U., Wingender, J., Müller, H., Tümmler, B. (1994)
A Major Pseudomonas aeruginosa Clone Common to Patients and Aquatic Habitats. Applied and Environmental Microbiology 60, 1734–1738
- Rose H.D., Franson T.R., Sheth N.K., Chusid M.J., Macher A.M., Zeirdt C.H. (1983)
Pseudomonas Pneumonia Associated With Use of a Home Whirlpool Spa. JAMA 250, 2027–2029.
- Rosef O., Rettedal G., Lågeide L. (2001)
Thermophilic campylobacters in surface water: A potential risk of campylobacteriosis. International Journal of Environmental Health Research 11, 321–327.
- Roser D.J., Davies C.M., Ashbolt N.J., Morison P. (2006)
Microbial exposure assessment of an urban recreational lake: A case study of the application of new risk-based guidelines. Water Science and Technology 54, 245–252.
- Roser D.J., van den Akker B., Boase S., Haas C.N., Ashbolt N.J., Rice S.A. (2014)
Pseudomonas aeruginosa dose response and bathing water infection. Epidemiology and Infection 142, 449–462.
- Roser D.J., Van Den Akker B., Boase S., Haas C.N., Ashbolt N.J., Rice S.A. (2015)
Dose-response algorithms for water-borne Pseudomonas aeruginosa folliculitis. Epidemiology and Infection 143, 1524–1537.
- Roszak D.B., Grimes D.J., Colwell R.R. (1984)
Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems. Can J Microbiol 30, 334–338.
- Rowan, N. J. (2004)
Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? Trends in Food Science and Technology 15, 462–467
- Ruhrgütebericht 2012 (2013): Ruhrverband, Essen
Ruhrgütebericht 2013 (2014): Ruhrverband, Essen
Ruhrgütebericht 2014 (2015): Ruhrverband, Essen
Ruhrverband (2013)
Zeit im Fluss. Selbstverlag, Essen, Deutschland

- Rusin P.A., Rose J.B., Haas C.N., Gerba C.P. (1997)
Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 152, 57–83.
- Russell T.L., Sassoubre L.M., Zhou C., French-Owen D., Hassaballah A., Boehm A.B. (2014)
Impacts of Beach Wrack Removal via Grooming on Surf Zone Water Quality. Environmental Science, Technology 48, 2203–2211.
- Saha S.K., Saha S., Sanyal S.C. (1991)
Recovery of injured Campylobacter jejuni cells after animal passage. Applied and Environmental Microbiology 57, 3388–3389.
- Sahlström L., Aspan A., Bagge E., Tham M.-L.D., Albiñ A., Danielsson-Tham M.L., et al. (2004)
Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. Water Research 38, 1989–1994.
- Sails, A. D., Bolton, F. J., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., Greenway, A., Greenway, D. L. A. (2002)
Detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Applied and Environmental Microbiology 68, 1319–1324
- Sakamoto R., Ohno A., Nakahara T., Satomura K., Iwanaga S., Kouyama Y., et al. (2009)
Legionella pneumophila in Rainwater on Roads. Emerging Infectious Disease journal 15, 1295.
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., Gómez-Duarte, O. G. (2011)
Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Medicine and Infectious Disease 9, 263–277
- Santiago-Rodríguez, T. M., Dávila, C., González, J., Bonilla, N., Marcos, P., Urdaneta, M., Cadete, M., Monteiro, S., Santos, R., Domingo, J. S., Toranzos, G. A. (2010)
Characterization of Enterococcus faecalis-infecting phages (enterophages) as markers of human fecal pollution in recreational waters. Water Research 44, 4716–4725
- Sartory D. (1998) *Guidelines for drinking-water quality. -Aeromonas*. World Health Organization, Geneva.
- Sartory D.P., Brewer M., Beswick A., Steggles D. (2015a)
Evaluation of the Pseudalert®/Quanti-Tray® MPN Test for the Rapid Enumeration of Pseudomonas aeruginosa in Swimming Pool and Spa Pool Waters. Current Microbiology 71, 699–705.
- Sartory D.P., Pauly D., Garrec N., Bonadonna L., Semproni M., Schell C., et al. (2015b)
Evaluation of an MPN test for the rapid enumeration of Pseudomonas aeruginosa in hospital waters. Journal of Water and Health 13, 427–436.
- Sassoubre, L. M., Walters, S. P., Russell, T. L., Boehm, A. B. (2011)
Sources and fate of Salmonella and fecal indicator bacteria in an urban creek. Journal of Environmental Monitoring 13, 2206–2212
- Savichtcheva O., Okabe S. (2006)
Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. Water Research 40, 2463–2476.
- Schets F.M., Schijven J.F., Maria A., Husman D.R. (2011)
Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. Water Research 45, 2392–2400.
- Schets, F. M., De Roda Husman, A. M. und Havelaar, A.H. (2010)
Disease outbreaks associated with untreated recreational water use. Epidemiology and Infection, 1–12.
- Schijven J.F., Teunis P.F.M., Rutjes S.A., Bouwknecht M., de Roda Husman A.M. (2011)
QMRAspot: A tool for Quantitative Microbial Risk Assessment from surface water to potable water. Water Research 45, 5564–5576.
- Schlichter B., Mavrov V., Chmiel H. (2004)
Study of a hybrid process combining ozonation and microfiltration/ultrafiltration for drinking water production from surface water. Desalination 168, 307–317.

- Schneider, S. (2011)
Bestimmung von Pseudomonas aeruginosa im Schwimm-und Badebeckenwasser mit dem Pseudalert®-Verfahren. Der Hygieneinspektor 13, 44–47
- Schoenemann B., Jardin N. (2015)
Baden in Fließgewässern. Ein Handlungsleitfaden am Beispiel des Baldeneysees, der Unteren Ruhr im Rahmen des BMBF-Projekts Sichere Ruhr. Essen.
- Schönberg-Norio D., Takkinen J., Hänninen M.-L., Katila M.-L., Rautelin H. (2004)
Swimming and Campylobacter Infections. Emerging Infectious Diseases 10, 1474–1477.
- Schreiber C., Rechenburg A., Rind E., Kistemann T. (2015)
The impact of land use on microbial surface water pollution. International Journal of Hygiene and Environmental Health 218, 181–187.
- Schultz-Fademrecht C., Wichem M., Horn H. (2008)
The impact of sunlight on inactivation of indicator microorganisms both in river water and benthic biofilms. Water Research 42, 4771–4779.
- Schwartz T., Hoffmann S., Obst U. (1998)
Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. Water Research 32, 2787–2797.
- Seidel M., Jurzik L., Brettar I., Höfle M.G., Griebler C. (2016)
Microbial and viral pathogens in freshwater: current research aspects studied in Germany. Environmental Earth Sciences 75.
- Seinige D., von Köckritz-Blickwede M., Krischek C., Klein G., Kehrenberg C. (2014)
Influencing Factors and Applicability of the Viability EMA-qPCR for a Detection and Quantification of Campylobacter Cells from Water Samples. PLoS ONE 9, e113812.
- Seis W., Zamzow M., Caradot N., Rouault P. (2018)
On the implementation of reliable early warning systems at European bathing waters using multivariate Bayesian regression modelling. Water Research 143, 301–312.
- Selbach C., Soldánová M., Sures B. (2016)
Estimating the risk of swimmer's itch in surface waters – A case study from Lake Baldeney, River Ruhr. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 693–699.
- Selinka H.C., Botzenhart K., Feuerpfeil I., Puchert W., Schmoll O., Szewzyk R., et al. (2011)
Nachweis von Viren im Rohwasser als Grundlage einer Risikoabschätzung.
Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 54, 496–504.
- Semproni M., Briancesco R., Giampaoli S., Gianfranceschi G., Paradiso R., Romano Spica V., et al. (2014)
[Comparison of cultural methods for the recovery of Pseudomonas aeruginosa: the UNI EN ISO 16266 reference method and the alternative method Pseudalert®]. Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita 26, 110—118.
- Sen K., Rodgers M. (2004)
Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities: A PCR identification. Journal of Applied Microbiology 97, 1077–1086.
- Seyfried P.L., Cook R.J. (1984)
Otitis Externa Infections Related to Pseudomonas aeruginosa Levels in Five Ontario Lakes. Canadian Journal of Public Health / Revue Canadienne de Sante'e Publique 75, 83–91.
- Sha Q., Gunathilake A., Forstner M.R.J., Hahn D. (2011)
Temporal analyses of the distribution and diversity of Salmonella in natural biofilms. Systematic and Applied Microbiology 34, 353–359.
- Sha Q., Vattam D.A., Forstner M.R.J., Hahn D. (2013) *Quantifying Salmonella Population Dynamics in Water and Biofilms*. Microbial Ecology 65, 60–67.
- Shah V.G., Dunstan R.H., Geary P.M., Coombes P., Roberts T.K., Rothkirch T. (2007)
Comparisons of water quality parameters from diverse catchments during dry periods and following rain events. Water Research 41, 3655–3666.

- Shanks O.C., Sivaganesan M., Peed L., Kelty C.A., Blackwood A.D., Greene M.R., *et al.* (2012) *Interlaboratory Comparison of Real-Time PCR Protocols for Quantification of General Fecal Indicator Bacteria*. Environmental Science, Technology 46, 945–953.
- Shannon K.E., Lee D.-Y., Trevors J.T., Beaudette L.A. (2007) *Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment*. Science of The Total Environment 382, 121–129.
- Shibata T., Solo-Gabriele H.M., Sinigalliano C.D., Gidley M.L., Plano L.R.W., Fleisher J.M., *et al.* (2010) *Evaluation of Conventional and Alternative Monitoring Methods for a Recreational Marine Beach with Nonpoint Source of Fecal Contamination*. Environmental Science, Technology 44, 8175–8181.
- Sichere Ruhr (2015): Gemeinsamer Abschlussbericht aller Verbundprojektpartner
- Sinclair A., Hebb D., Jamieson R., Gordon R., Benedict K., Fuller K., *et al.* (2009) *Growing season surface water loading of fecal indicator organisms within a rural watershed*. Water Research 43, 1199–1206.
- Singh, G., Vajpayee, P., Rani, N., Jyoti, A., Gupta, K. C., Shanker, R. (2012) *Bio-capture of S. Typhimurium from surface water by aptamer for culture-free quantification*. Ecotoxicology and Environmental Safety 78, 320–326
- Sinton, L., Hall, C., Braithwaite, R. (2007) *Sunlight inactivation of Campylobacter jejuni and Salmonella enterica, compared with Escherichia coli, in seawater and river water*. Journal of Water and Health 5, 357–365
- Skirrow, M. B. (1977) *Campylobacter enteritis: a “new“ disease*. British Medical Journal 2, 9-11
- Skirrow, M. B. (2006) *John McFadyean and the Centenary of the First Isolation of Campylobacter Species*. Clinical Infectious Diseases 43, 1213–1217
- Slimani S., Robyns A., Jarraud S., Molmeret M., Dusserre E., Mazure C., *et al.* (2012) *Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable Legionella by qPCR*. Journal of Microbiological Methods 88, 319–321.
- Smeets P.W.M.H., Medema G.J., Van Dijk J.C. (2009) *The Dutch secret: How to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands*. Drinking Water Engineering and Science 2, 1–14.
- Smith R.J., Kehoe S.C., Mcguigan K.G., Barer M.R. (2000) *Effects of simulated solar disinfection of water on infectivity of Salmonella typhimurium*. Letters in Applied Microbiology 31, 284–288.
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. (2005) *Under the microscope: Campylobacter jejuni*. Letters in Applied Microbiology 41, 297–302.
- Snelling W.J., Stern N.J., Lowery C.J., Moore J.E., Gibbons E., Baker C., *et al.* (2008) *Colonization of broilers by Campylobacter jejuni internalized within Acanthamoeba castellanii*. Archives of Microbiology 189, 175–179.
- Soller J.A., Schoen M.E., Bertrand T., Ravenscroft J.E., Ashbolt N.J. (2010) *Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination*. Water Research 44, 4674–4691.
- Soller J.A., Schoen M.E., Varghese A., Ichida A.M., Boehm A.B., Eftim S., *et al.* (2014) *Human health risk implications of multiple sources of faecal indicator bacteria in a recreational waterbody*. Water Research 66, 254–264.
- Soller, J. A., Bertrand, T., Ashbolt, N. J., Ravenscroft, J., Wade T. J. (2010) *Estimating the primary etiologic agents in recreational freshwaters impacted by human sources of faecal contamination*. Water Research 44, 4736–4747
- Spector, M. P., Kenyon, W. J. (2012) *Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses*. Food Research International 45, 455–481

- Spies K., Pleischl S., Sartory D. (2020)
Comparison of the Pseudalert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of Pseudomonas aeruginosa in cooling tower water with the ISO 16266 membrane filtration culture-based method. Journal of Applied Microbiology 128, 1843–1850.
- Springer G.L., Shapiro E.D. (1985)
Fresh Water Swimming as a Risk Factor for Otitis Externa: A Case-Control Study. Archives of Environmental Health: An International Journal 40, 202–206.
- Stadler P., Blöschl G., Vogl W., Koschelnic J., Epp M., Lackner M., et al. (2016)
Real-time monitoring of beta-d-glucuronidase activity in sediment laden streams: A comparison of prototypes. Water Research 101, 252–261.
- Stadler P., Farnleitner A.H., Zessner M. (2017)
Development and evaluation of a self-cleaning custom-built auto sampler controlled by a low-cost RaspberryPi microcomputer for online enzymatic activity measurements. Talanta 162, 390–397.
- Stadler P., Vogl W., Koschelnic J., Epp M., Lackner M., Oismüller M., et al. (2015)
Testing the applicability of rapid on-site enzymatic activity detection for surface water monitoring. Geophysical Research Abstracts 17, EGU2015-10547.
- Stanley K., Cunningham R., Jones K. (1998)
Isolation of Campylobacter jejuni from groundwater. Journal of Applied Microbiology 85, 187–191.
- Stanley, K., Jones, K. (2003)
Cattle and sheep farms as reservoirs of Campylobacter. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 94, 104S–113S
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. (2012)
Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International 45, 502–531.
- Steinert, M., Hentschel, U., Hacker, J. (2002)
Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiology Reviews 26, 149 LP-162
- Stelzer W., Jacob J. (1991)
A Study of Campylobacter in Sewage, Sewage Sludge and in River Water. Water Science and Technology 24, 117–120.
- Storey M. V., Ashbolt N.J., Stenström T.A. (2004)
Biofilms, thermophilic amoebae and Legionella pneumophila - A quantitative risk assessment for distributed water. Water Science and Technology 50, 77–82.
- Stout, J. E., Yu, V. L., Best M. G. (1985)
Ecology of Legionella pneumophila within water distribution systems. Applied and Environmental Microbiology 49, 221–228
- St-Pierre K., Lévesque S., Frost E., Carrier N., Arbeit R.D., Michaud S. (2009)
Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for Campylobacter spp. in environmental water. Applied and Environmental Microbiology 75, 6736–6744.
- Strathmann M., Horstkott M., Koch C., Gayer U., Wingender J. (2016)
The River Ruhr – an urban river under particular interest for recreational use and as a raw water source for drinking water: The collaborative research project “Safe Ruhr” – microbiological aspects. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 643–661.
- Surman, S. B., Morton, L. H. G., Keevil, C. W. (1994)
The dependence of Legionella pneumophila on other aquatic bacteria for survival on R2A medium. International Biodeterioration, Biodegradation 33, 223–236
- Swaminathan, B., Barrett T. J., Hunter, S. B., Tauxe, R. V., Force C. D. C. P. T. (2001)
PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerging Infectious Diseases 7, 382–389

- Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W., Schleifer K.-H. (2000)
Microbial Safety of Drinking Water. Annual review of microbiology 54, 81–127.
- Szewzyk, R., Knobling, A. (2007)
Umsetzung der neuen EG-Badegewässerrichtlinie in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt 50, 354–8
- Taguri, T., Oda, Y., Sugiyama, K., Nishikawa, T., Endo, T., Izumiyama, S., Yamazaki, M., Kura, F. (2011)
A rapid detection method using flow cytometry to monitor the risk of Legionella in bath water. Journal of Microbiological Methods 86, 25–32
- Talagrand-Reboul E., Jumas-Bilak E., Lamy B. (2017)
The social life of Aeromonas through biofilm and quorum sensing systems. Frontiers in Microbiology 8.
- Talibart R., Denis M., Castillo A., Cappelier J.M., Ermel G. (2000)
Survival and recovery of viable but noncultivable forms of Campylobacter in aqueous microcosm. International Journal of Food Microbiology 55, 263–267.
- Tallon P., Magajna B., Lofranco C., Leung K.T. (2005)
Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. Water, Air, and Soil Pollution 166, 139–166.
- Tatchou-Nyamsi-König J.-A., Moreau A., Fédérighi M., Block J.-C. (2007)
Behaviour of Campylobacter jejuni in experimentally contaminated bottled natural mineral water. Journal of Applied Microbiology 103, 280–288.
- Taylor M.J., Bentham R.H., Ross K.E. (2014)
Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead Legionella in Biofilm Samples. Microbiology Insights 7, 15–24.
- ten Veldhuis, J. A. E., Clemens, F. H. L. R., Sterk, G., Berends, B. R. (2010)
Microbial risks associated with exposure to pathogens in contaminated urban flood water. Water Research 44, 2910–8
- Teunis, P., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H., van Pelt, W. (2005)
A reconsideration of the Campylobacter dose-response relation. Epidemiology and Infection 133, 583–592
- Tewes, M. (2012): *Association of hygienically relevant microorganisms with freshwater plankton*. Dissertation
- Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., Federighi, M. (1999)
Physiological Characterization of Viable-but-Nonculturable Campylobacter jejuni Cells. Applied and Environmental Microbiology 65, 1110–1116
- Thomas C., Hill D.J., Mabey M. (1999)
Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of Campylobacter spp. in water microcosms. Journal of Applied Microbiology 86, 1024–1032.
- Thomas J.L., Slawson R.M., Taylor W.D. (2013)
Salmonella serotype diversity and seasonality in urban and rural streams. Journal of Applied Microbiology 114, 907–922.
- Thomas M.K., Charron D.F., Waltner-Toews D., Schuster C., Maarouf A.R., Holt J.D. (2006)
A role of high impact weather events in waterborne disease outbreaks in Canada, 1975-2001. International Journal of Environmental Health Research 16, 167–180.
- Thomas V., Loret J.F., Jousset M., Greub G. (2008)
Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. Environmental Microbiology 10, 2728–2745.
- Thomas, C., Gibson, H., Hill, D. J., Mabey, M. (1999a)
Campylobacter epidemiology: an aquatic perspective. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 85, 168S–177S
- Thomas, J. L., Slawson, R. M., Taylor W. D. (2013)
Salmonella serotype diversity and seasonality in urban and rural streams. Journal of Applied Microbiology 114, 907–922

- Thomason B.M., Dodd D.J., Cherry W.B. (1977)
Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. Applied and Environmental Microbiology 34, 270–273.
- Thomason, B. M., Biddle, J. W., Cherry, W. B. (1975)
Detection of Salmonellae in the Environment. Applied Microbiology 30, 764–767
- Thorolfsdottir B.O.T., Marteinson V.T. (2013)
Microbiological analysis in three diverse natural geothermal bathing pools in Iceland. International Journal of Environmental Research and Public Health 10, 1085–1099.
- Till D., McBride G., Ball A., Taylor K., Pyle E. (2008)
Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. Journal of Water and Health 6, 443–60.
- Timm C., Luther S., Juristic L., Hamza I.A., Kistemann T. (2016)
Applying QMRA and DALY to assess health risks from river bathing. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 681–692.
- Tison D.L., Seidler R.J. (1983)
Legionella Incidence and Density in Potable Drinking Water Suppliest. Applied and Environmental Microbiology 45, 337–339.
- Tondera K., Klaer K., Gebhardt J., Wingender J., Koch C., Horstkott M., et al. (2015)
Reducing pathogens in combined sewer overflows using ozonation or UV irradiation. International Journal of Hygiene and Environmental Health 218, 731–741.
- Tondera K., Klaer K., Koch C., Hamza I.A., Pinnekamp J. (2016a)
Reducing pathogens in combined sewer overflows using performic acid. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 700–708.
- Tondera K., Klaer K., Roder S., Brueckner I., Strathmann M., Kistemann T., et al. (2016b)
Developing an easy-to-apply model for identifying relevant pathogen pathways into surface waters used for recreational purposes. International Journal of Hygiene and Environmental Health 219, 662–670.
- Toplak, N., Kovač, M., Piskernik, S., Možina, S. S., Jeršek, B. (2012)
Detection and quantification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli using real-time multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology 112, 752–764
- Topp E., Welsh M., Tien Y.-C., Dang A., Lazarovits G., Conn K., et al. (2003)
Strain-dependent variability in growth and survival of Escherichia coli in agricultural soil. FEMS Microbiology Ecology 44, 303 LP – 308.
- Trevors, J. T. (2011)
Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. Journal of Microbiological Methods 86, 266–273
- Triassi, M., Di Popolo, A., D’Alcalà, G. R., Albanese, Z., Cuccurullo, S., Montegrosso, S., Crispino, M., Borella, P., Zarrilli, R. (2006)
Clinical and environmental distribution of Legionella pneumophila in a university hospital in Italy: Efficacy of ultraviolet disinfection. Journal of Hospital Infection 62, 494–501
- TrinkwV (2001) Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 20. Dezember 2019 (BGBl. I S. 2934) geändert worden ist. Trinkwasserverordnung.
- Tümmler, B., Wiehlmann, L., Klockgether, J., Cramer, N. (2014)
Advances in understanding Pseudomonas. F1000prime reports 6, 9
- UBA (2002)
Empfehlung der Trinkwasserkommission zur Risikoeinschätzung, zum Vorkommen und zu Maßnahmen beim Nachweis von Pseudomonas aeruginosa in Trinkwassersystemen. Umweltbundesamt, Bundesgesundheitsblatt 45, 187–188
- UBA (2009)
Hinweise für die Überwachung von Kleinbadeteichen zur Bestimmung von P. aeruginosa nach dem DIN EN ISO 16266 Verfahren. Bundesgesundheitsblatt 52, 370–371.

- van Asperen, I.A., de Rover, C.M., Schijven, J.F., Oetomo, S.B., Schellekens, J.F., van Leeuwen, N.J., *et al.* (1995)
Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing Pseudomonas aeruginosa. BMJ (Clinical research ed.) 311, 1407–10.
- van der Kooij D., Oranje J.P., Hijnen W.A.M. (1982)
Growth of Pseudomonas aeruginosa in Tap Water in Relation to Utilization of Substrates at Concentrations of a Few Micrograms per Liter. Applied and Environmental Microbiology 44, 1086–1095.
- van der Kooij, D. (1988)
Properties of aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive Medizin 187, 1–17
- van der Kooij, D. (1991)
Multi-author Review Research on Aeromonas and Plesiomonas: Nutritional requirements of aeromonads and their multiplication in drinking water. Experimentia 47, 444–446
- van Donsel D.J., Geldreich E.E. (1971)
Relationships of salmonellae to fecal coliforms in bottom sediments. Water Research 5, 1079–1087.
- van Heijnsbergen, E., Schalk, J. A. C., Euser, S. M., Brandsema, P. S., den Boer, J. W. , de Roda Husman, A. M. (2015)
Confirmed and Potential Sources of Legionella Reviewed. Environmental Science and Technology 49, 4797–4815
- van Vliet, A. H. M., Ketley, J. M., Park, S. F., Penn, C. W. (2002)
The role of iron in Campylobacter gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. FEMS Microbiology Reviews 26, 173–186
- Vávrová A., Balážová T., Sedláček I., Tvrzová L., Šedo O. (2014)
Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described Aeromonas spp. Folia Microbiologica 60, 375–383.
- Vereen E., Lowrance R.R., Cole D.J., Lipp E.K. (2007)
Distribution and Ecology of Campylobacters in Coastal Plain Streams (Georgia, United States of America). Applied and Environmental Microbiology 73, 1395–1403.
- Vereen E., Lowrance R.R., Jenkins M.B., Adams P., Rajeev S., Lipp E.K. (2013)
Landscape and seasonal factors influence Salmonella and Campylobacter prevalence in a rural mixed use watershed. Water Research 47, 6075–6085.
- Villari P., Pucino A., Santagata N., Torre I. (1999)
A comparison of different culture media for the membrane filter quantification of Aeromonas in water. Letters in Applied Microbiology 29, 253–7.
- Vital M., Stucki D., Egli T., Hammes F. (2010)
Evaluating the growth potential of pathogenic bacteria in water. Applied and Environmental Microbiology 76, 6477–6484.
- von Graevenitz A. (2007)
The role of Aeromonas in diarrhea: A review. Infection 35, 59–64
- Wade T.J., Calderon R.L., Sams E., Beach M., Brenner K.P., Williams A.H., *et al.* (2006)
Rapidly Measured Indicators of Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. Environmental Health Perspectives 114, 24–28.
- Wade T.J., Sams E., Brenner K.P., Haugland R., Chem E., Beach M., *et al.* (2010)
Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. Environmental Health 9, 66.
- Wade, T. J., Sams, E., Brenner, K. P., Haugland, R., Wymer, L., Dufour, A. P. (2008)
High Sensitivity of Children to Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. Epidemiology 19, 375–383

- Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Yoshida, S. I. (2000)
A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of Aeromonas hydrophila. Archives of Microbiology 173, 307–310
- Walters, S. P., Gannon, V. P. J., Field, K. G. (2007)
Detection of Bacteroidales Fecal Indicators and the Zoonotic Pathogens E. coli O157:H7, Salmonella, and Campylobacter in River Water. Environmental Science, Technology 41, 1856–1862
- Wellinghausen N., Köthe J., Wirths B., Sigge A., Poppert S. (2005)
Superiority of Molecular Techniques for Identification of Gram-Negative, Oxidase-Positive Rods, Including Morphologically Nontypical Pseudomonas aeruginosa, from Patients with Cystic Fibrosis. Journal of Clinical Microbiology 43, 4070–4075.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.-P., Godon, J.-J. (2008)
Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. Water Research 42, 53-62
- Wheater D., Mara D., Jawad L., Oragui J. (1980)
Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli in sewage and fresh water. Water Research 14, 713–721.
- WHO (2003)
Guidelines for safe recreational water - Volume 1: Coastal and Fresh Waters. World Health Organization, Genf, Schweiz
- WHO (2013)
The Global View of Campylobacteriosis: Report of an Expert Consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012. World Health Organization, WHO Document Production Services, Genf, Schweiz
- Wiedenmann, A., Krüger, P., Dietz, K., López-Pila, J.M., Szewzyk, R., Botzenhart, K. (2006)
A Randomized Controlled Trial Assessing Infectious Disease Risks from Bathing in Fresh Recreational Waters in Relation to the Concentration of Escherichia coli, Intestinal Enterococci, Clostridium perfringens, and Somatic Coliphages. Environmental Health Perspectives 114, 228 - 236
- Wilkes G., Edge T., Gannon V., Jokinen C., Lyautey E., Medeiros D., et al. (2009)
Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. Water Research 43, 2209–2223.
- Wilkes G., Edge T.A., Gannon V.P.J., Jokinen C., Lyautey E., Neumann N.F., et al. (2011)
Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds. Water Research 45, 5807–5825.
- Wilks, S. A., Keevil, C. W. (2006)
Targeting Species-Specific Low-Affinity 16S rRNA Binding Sites by Using Peptide Nucleic Acids for Detection of Legionellae in Biofilms. Applied and Environmental Microbiology 72, 5453–5462
- Wilson, D. J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A. J. H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C. A., Diggle, P. J. (2008)
Tracing the Source of Campylobacteriosis. PLoS Genet 4, e1000203
- Wilson, I. G. (1997)
Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology 63, 3741–3751
- Wilson, S., Hamilton, M. A., Hamilton, G. C., Schumann, M. R., Stoodley, P. (2004)
Statistical Quantification of Detachment Rates and Size Distributions of Cell Clumps from Wild-Type (PAO1) and Cell Signaling Mutant (JPI) Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Applied and Environmental Microbiology 70, 5847–5852
- Winfield M.D., Groisman E.A. (2003)
Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology 69, 3687–3694.

- Wingender J., Flemming H. (2011)
Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214, 417–423.
- Wingender, J., Hambsch, B.; Schneider, S. (2009)
Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von Pseudomonas aeruginosa im Trinkwasser. Energie-Wasser-Praxis 60, 60–66
- Wolfe R.L. (1990)
Ultraviolet disinfection of potable water. Environmental Science and Technology 24, 768-773.
- WHO (2012)
The Global View of Campylobacteriosis. World Health Organization, Genf
- Wu, J., Long, S.C., Das, D., Damer, S.M. (2011)
Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. Journal of Water and Health 9, 265-278.
- Wuertz, S., Reis, M. (2010)
Editorial for special issue on shifting paradigms in assessment of recreational water quality. Water Research 44, 4661
- Wullings B.A., Bakker G., van der Kooij D. (2011)
Concentration and Diversity of Uncultured Legionella spp. in Two Unchlorinated Drinking Water Supplies with Different Concentrations of Natural Organic Matter. Applied and Environmental Microbiology 77, 634–641.
- Wullings B.A., van der Kooij D. (2006)
Occurrence and Genetic Diversity of Uncultured Legionella spp. in Drinking Water Treated at Temperatures below 15 °C. Applied and Environmental Microbiology 72, 157–166.
- Wyer M.D., Kay D., Watkins J., Davies C., Kay C., Thomas R., et al. (2010)
Evaluating short-term changes in recreational water quality during a hydrograph event using a combination of microbial tracers, environmental microbiology, microbial source tracking and hydrological techniques: A case study in Southwest Wales, UK. Water Research 44, 4783–4795.
- Wyn-Jones A.P., Sellwood J. (2001)
A review: Enteric viruses in the aquatic environment. Journal of Applied Microbiology 91, 945–962.
- Xiao G., Wang Z., Chen J., Qiu Z., Li Y., Qi J., et al. (2013)
Occurrence and infection risk of waterborne pathogens in Wanzhou watershed of the Three Gorges Reservoir, China. Journal of Environmental Sciences 25, 1913–1924.
- Yáñez M.A., Carrasco-Serrano C., Barberá V.M., Catalán V. (2005)
Quantitative Detection of Legionella pneumophila in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of the dotA Gene. Applied and Environmental Microbiology 71, 3433–3441.
- Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., Múrtula R., Martínez L., Catalán V. (2011)
Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods 85, 124–130.
- Yates, M. V. (2007)
Classical Indicators in the 21st Century -Far and Beyond the Coliform. Water Environment Research 79, 279–286
- Yun J., Greiner M., Höller C., Messelhäuser U., Rampp A., Klein G. (2016)
Association between the ambient temperature and the occurrence of human Salmonella and Campylobacter infections. Scientific Reports 6, 28442.
- Zaleski, K. J., Josephson, K. L., Gerba, C. P., Pepper, I. L. (2005)
Potential Regrowth and Recolonization of Salmonellae and Indicators in Biosolids and Biosolid-Amended Soil. Applied and Environmental Microbiology 71, 3701–3708
- Żbikowska E., Kletkiewicz H., Walczak M., Burkowska A. (2014)
Coexistence of Legionella pneumophila Bacteria and Free-Living Amoebae in Lakes Serving as a Cooling System of a Power Plant. Water, Air and Soil Pollution 225, 1–10.

- Zhou, G., Wen, S., Liu, Y., Li, R., Zhong, X., Feng, L., Wang, L., Cao, B. (2011)
Development of a DNA microarray for detection and identification of Legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water. International Journal of Food Microbiology 145, 293–300
- Zibuschka, F., Lendenfeld, T., Lindner, G. (2010)
Near Real Time Monitoring von E. coli in Wasser. Österreichische Wasser- und Abfallwirtschaft 62, 215–219
- Ziprin, R.L., Harvey, R. B. (2004)
Inability of cecal microflora to promote reversion of viable nonculturable Campylobacter jejuni. Avian Diseases 48, 647–650
- Obiri-Danso, K., Jones, K. (1999)
The effect of a new sewage treatment plant on faecal indicator numbers, campylobacters and bathing water compliance in Morecambe Bay. Journal of Applied Microbiology 86, 603–614

7. Anhang

7.1. Optimierung und Evaluierung des Nachweises der hygienisch relevanten Zielorganismen im Oberflächenwasser

Tabelle 45: Einfluss der Inkubationstemperatur beim quantitativen Nachweis von *Aeromonas* spp. in Oberflächenwasser, angelehnt an Havelaar *et al.* (1987). Es wurden Proben aus Oberflächenwasser an unterschiedlichen Zeitpunkten oder Terminen entnommen. Die angegebenen Werte sind das arithmetische Mittel einer Vierfachbestimmung (#1,2) bzw. Doppelbestimmung (#3)

Probe		Anzahl charakteristischer Kolonien bei jeweiliger Inkubationstemperatur			
		20 °C	28 °C	30 °C	36 °C
Oberflächenwasser #1	nach 24 h	-	198	171	143
	nach 48 h	168	n. b.	n. b.	n. b.
Oberflächenwasser #2	nach 24 h	-	48	62	54
	nach 48 h	40	n. b.	n. b.	n. b.
Oberflächenwasser #3	nach 24 h	-	605	520	545
	nach 48 h	565	n. b.	n. b.	n. b.
<i>A. hydrophila</i> DSM 30187	nach 24 h	-	+	+	+
	nach 48 h	+	n. b.	n. b.	n. b.

n. b. nicht bestimmt, “-“ kein Wachstum, “+“ Wachstum

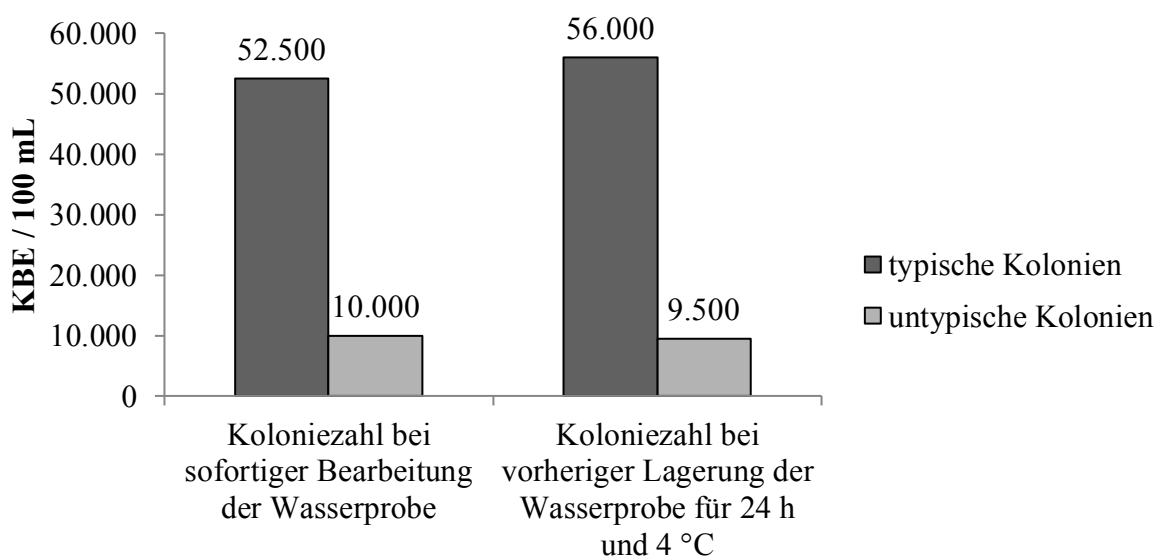


Abbildung 58: Ermittelte Konzentrationen von *Aeromonas* spp. in einer Probe aus Oberflächenwasser nach unterschiedlichen Lagerbedingungen.

Tabelle 46: Überprüfung verschiedener Isolate von *Aeromonas* spp. aus Oberflächenwasser auf verschiedene Virulenzfaktoren. Die Isolate mit der Kennung RW wurden aus der Wasserphase des Flusses Ruhr gewonnen, diejenigen mit der Kennung BST aus dem epilithischen Biofilm und die mit der Kennung BSed aus dem Sediment. Die Gene der Pathogenitätsfaktoren wurden mittels PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen und die Hämolyse durch Ausstreichen des Isolats auf Columbia-Blutagar. Zusätzlich ist die Identifizierung durch das API® 20 NE-Testsystem und die Färbung der ursprünglichen Kolonie angegeben.

Isolat	Herkunft	Koloniefärbung	Identifizierung API® 20 NE	Gene der Pathogenitätsfaktoren					16S rRNA	Hämolyse
				<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i> , <i>pla</i> , <i>lipH3</i> , <i>alp-1</i>	<i>ahyB</i>		
RW-1	Wasserphase Ruhr	orange	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
RW-2	Wasserphase Ruhr	orange	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>positiv</u>	negativ	n. b.	α
RW-3	Wasserphase Ruhr	orange	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
RW-4	Wasserphase Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	γ
RW-5	Wasserphase Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	γ
RW-6	Wasserphase Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas</i> sp.	nicht mehr kultivierbar						
RW-7	Wasserphase Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>schwach positiv</u>	<u>schwach positiv</u>	n. b.	β
RW-8	Wasserphase Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	β
RW-9	Wasserphase Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	β

Isolat	Herkunft	Koloniefärbung	Identifizierung API® 20 NE	Gene der Pathogenitätsfaktoren					16S rRNA	Hämolyse
				<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i> , <i>pla</i> , <i>lipH3</i> , <i>alp-1</i>	<i>ahyB</i>		
RW-10	Wasserphase Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas sobria</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	γ
RW-11	Wasserphase Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	negativ	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
RW-12	Wasserphase Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas</i> sp.	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>positiv</u>	negativ	n. b.	α
RW-13	Wasserphase Ruhr	farblos, untypisch	Geringe Selektivität	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	γ
RW-14	Wasserphase Ruhr	farblos, untypisch	Geringe Selektivität	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
RW-15	Wasserphase Ruhr	farblos, untypisch	Geringe Selektivität	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	γ
BSt-1	epilithischer Biofilm Ruhr	orange	<i>Aeromonas</i> sp.	negativ	negativ	negativ	negativ	falsche Größe	n. b.	α
BSt-2	epilithischer Biofilm Ruhr	orange	<i>Aeromonas sobria</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	α
BSt-3	epilithischer Biofilm Ruhr	orange	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
BSt-4	epilithischer Biofilm Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas</i> sp.	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	α
BSt-5	epilithischer Biofilm Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
BSt-6	epilithischer Biofilm Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
BSt-7	epilithischer Biofilm Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>caviae</i>	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>positiv?</u>	negativ	n. b.	β

Isolat	Herkunft	Koloniefärbung	Identifizierung API® 20 NE	Gene der Pathogenitätsfaktoren					16S rRNA	Hämolyse
				<i>act</i> , <i>aerA</i> , <i>hlyA</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>lip</i> , <i>pla</i> , <i>lipH3</i> , <i>alp-1</i>	<i>ahyB</i>		
BSt-8	epilithischer Biofilm Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	<u>positiv</u>	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>schwach positiv</u>	n. b.	β
BSt-9	epilithischer Biofilm Ruhr	heller Kern	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	<u>positiv</u>	<u>schwach positiv</u>	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	β
BSt-10	epilithischer Biofilm Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>schwach positiv</u>	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	β
BSt-11	epilithischer Biofilm Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	α
BSt-12	epilithischer Biofilm Ruhr	gelb-orange	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	α
BSt-13	epilithischer Biofilm Ruhr	farblos, untypisch	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	α
BSt-14	epilithischer Biofilm Ruhr	farblos, untypisch	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
BSt-15	epilithischer Biofilm Ruhr	farblos, untypisch	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Bsed-1	Sediment Ruhr	orange	<i>Pseudomonas luteola</i>	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	α
Bsed-2	Sediment Ruhr	orange	<i>Aeromonas</i> sp.	negativ	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α
Bsed-3	Sediment Ruhr	orange	<i>Aeromonas sobria</i>	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	n. b.	α
Bsed-4	Sediment Ruhr	oranges Zentrum	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i>	Amplikon zu groß	negativ	negativ	<u>positiv</u>	<u>positiv</u>	n. b.	α

Tabelle 47: Auswertung der Fluoreszenz unter UV-Licht (365 nm) nach Einsetzen verschiedener *Pseudomonas*-Referenzstämmen sowie dem Umweltisolat *P. aeruginosa* AdS und *A. hydrophila* in das kommerzielle MPN-Testsystem Pseudalert®. Eine Inkubation erfolgte für 24 h bei 38 °C im Hybridisierungssofen.

Getesteter Stamm	Auswertung unter UV-Licht
<i>P. aeruginosa</i> AdS	Starke blaue Fluoreszenz
<i>P. aeruginosa</i> DSM 50071	Starke blaue Fluoreszenz
<i>P. alcaligenes</i> DSM 50342	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>P. fluorescens</i> DSM 50090	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>P. luteola</i> DSM 6975	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>P. mendocina</i> DSM 50017	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>P. putida</i> DSM 291	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle
<i>A. hydrophila</i> DSM 30187	Keine blaue Fluoreszenz, leicht grüne Färbung entsprechend der Negativkontrolle

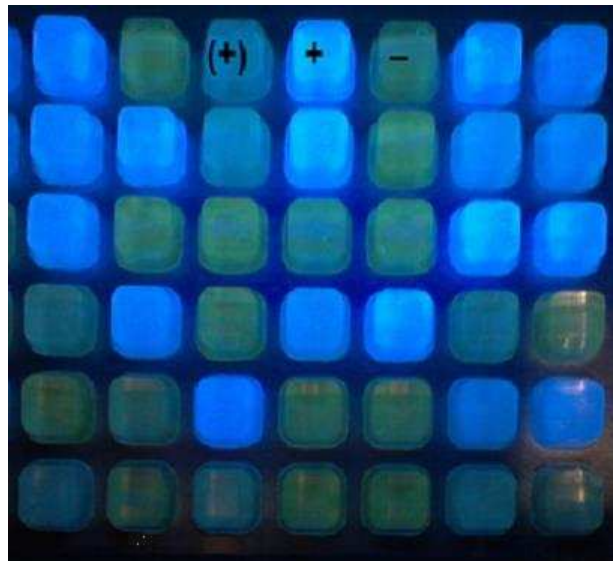


Abbildung 59: Auswertung eines Pseudalert® Folienträgers mit einer eingesetzten Zellkonzentration einer Suspension *P. aeruginosa* DSM 50071 von 30 Zellen pro 100 mL Probe. Es zeigten sich sowohl als positiv zu wertende, stark fluoreszierende Vertiefungen (+), schwächer fluoreszierende Vertiefungen ((+)), sowie als negativ zu wertende grünliche Vertiefungen ohne Fluoreszenz (-). (Foto: Julia Heise)

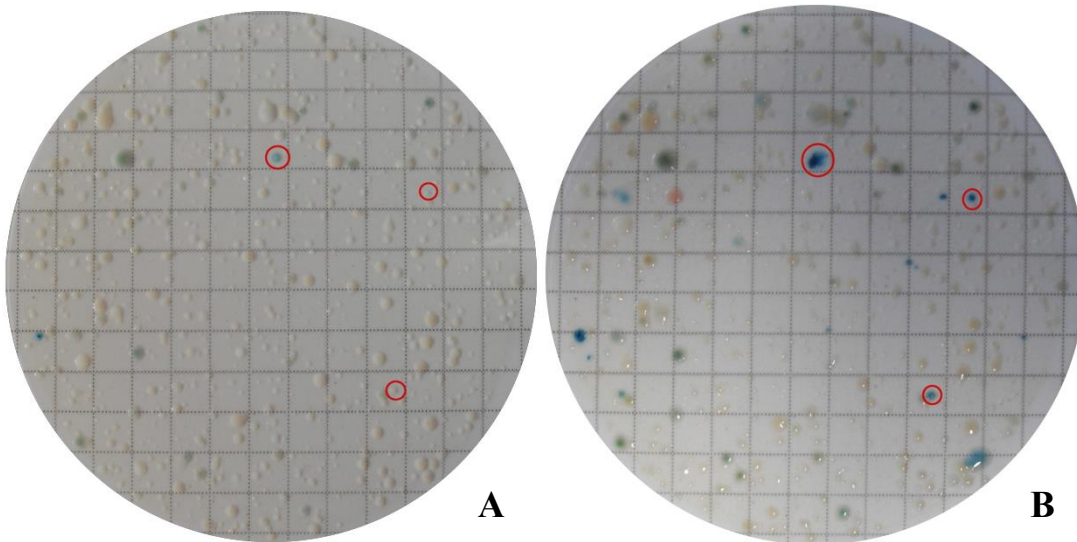


Abbildung 60: Oberflächenwasserprobe nach Inkubation des Membranfilters für 22 h (A) und 28 h (B) bei 36 °C auf RAPID'*P.aeruginosa*-Agar (Foto: Tim Wiese, 2014)

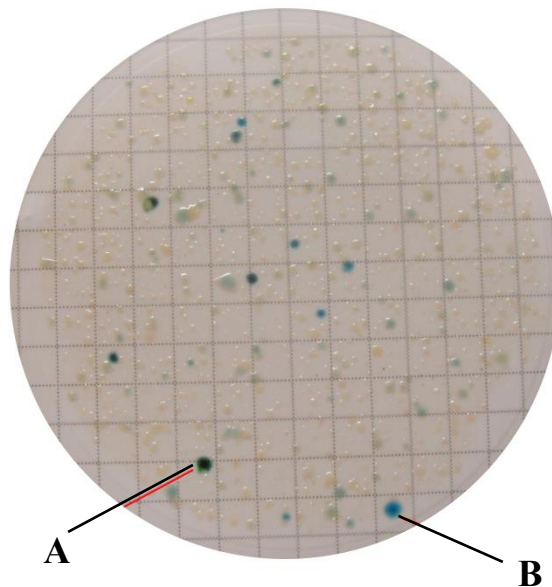


Abbildung 61: Unterschiedliche Kolonietypen auf einem Membranfilter beim quantitativen Nachweis von *P. aeruginosa* mittels RAPID'*P.aeruginosa*-Agar (Bio-Rad). (Foto: Tim Wiese, 2014)

Tabelle 48: Untersuchung der Färbung verschiedener *P. aeruginosa* Referenzstämmen und Umweltisolate beim Nachweis mittels RAPID'*P.aeruginosa*-Agar. Es wurde je eine Suspension von 10 bis 100 Zellen in den Untersuchungsgang eingesetzt und nach einer Inkubationszeit von 20 bzw. 40 h bei 36 °C die Färbung abgelesen.

Getesteter Stamm	Färbung der Einzelkolonien auf Membranfilter		Färbung des Dreiösenausstrichs	
	nach 20 h	nach 40 h	nach 20 h	nach 40 h
<i>P. aeruginosa</i> DSM 50071	grün (hell)	grün	grünblau (dunkel)	grünblau (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1117	grünblau (blasser Rand)	grünblau (dunkel, Rand heller)	grün (dunkel)	grün (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> DSM 1128	grünblau (blasser Rand)	grünblau	grün (dunkel)	grün (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> AdS	grünblau	grünblau (dunkel, Rand heller)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> SG 17	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> SG 18	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau (dunkel)	grünblau (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> SG 29	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> SG 31	grünblau (blasser Rand)	grünblau (dunkel)	grün (dunkel)	grün (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> SG 50	grünblau (hell)	grünblau (dunkel)	grün (dunkel)	grün (dunkel)
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	grünblau	grünblau	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1 (BP)	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> PT 1	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> PT 31	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> PA 14	grünblau	grünblau (dunkel)	grünblau	grünblau
<i>P. aeruginosa</i> FRD 1 (mucoid)	farblos	farblos (brauner Kern)	farblos (brauner Kern)	farblos (brauner Kern)
<i>P. aeruginosa</i> SG 81 (mucoid)	farblos (brauner Kern)	braun	farblos (brauner Kern)	farblos (brauner Kern), Ränder des ersten Ausstrichs grün

Tabelle 49: Untersuchung verschiedener *Pseudomonas*-Referenzstämmen und *Aeromonas hydrophila* auf ihr Wachstum und ihre Färbung bei Verwendung des Selektivmediums RAPID'*P.aeruginosa*-Agar bei einer Inkubationszeit von 28 h bei 30 °C und 36 °C. (“+“ - deutlich erkennbarer Bewuchs des Mediums; “(+)“ – schwacher Bewuchs des Mediums; “-“ – kein Bewuchs des Mediums; n. b. – nicht bestimmt)

Getesteter Stamm	Inkubation bei 30 °C für 28 h	Inkubation bei 36 °C für 28 h
<i>P. aeruginosa</i> AdS	n. b.	+, grünblaue Färbung
<i>P. aeruginosa</i> DSM 50071	n. b.	+, dunkle, grünblaue Färbung
<i>P. alcaligenes</i> DSM 50342	-	-
<i>P. corrugata</i> DSM 7228	-	-
<i>P. fluorescens</i> DSM 50090	-	-
<i>P. luteola</i> DSM 6975	-	-
<i>P. mendocina</i> DSM 50017	-	-
<i>P. putida</i> DSM 291	(+), farblos	-
<i>P. stutzeri</i> DSM 5190	n. b.	-
<i>A. hydrophila</i> DSM 30187	-	-

7.2. Bestandsaufnahme der hygienisch relevanten Zielorganismen im Fließgewässer Ruhr

Tabelle 50: Identifizierungsergebnisse der aus Oberflächenwasser gewonnenen *Campylobacter*-Umweltisolate mit dem API® Campy-Testsystem. Zum Vergleich ist ebenfalls das Resultat der Fluoreszenz in situ Hybridisierung derselben Isolate aufgeführt. Dabei wurden die Sonden Catherm (spezifisch für thermotolerante *Campylobacter* spp.) und Cajej (spezifisch für *Campylobacter jejuni*) verwendet.

Identifizierungsergebnis API® Campy	Anzahl	Davon zusätzlich FISH positiv	
		Catherm	Cajej
<i>Campylobacter</i> sp. Identifizierung auf Genusebene	38	38	38
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1	2	2	2
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 2	7	7	7
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 1 / <i>jejuni</i> 2	2	2	2
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	1	1	1
<i>Campylobacter coli</i>	10	10	10*
<i>Campylobacter lari</i>	3	3	2
gesamt bestätigt durch API® Campy Identifizierungsergebnis: 63 Isolate (84 %)			
<i>Helicobacter</i> sp.	1	0	0
Keine Identifizierung möglich	11	8*	5*
gesamt getestet: 75 Isolate (100%)			
* davon einige Proben mit nur teilweise FISH positiven Zellen (Mischkultur)			

Tabelle 51: Identifizierungsergebnisse der aus Oberflächenwasser gewonnenen *Salmonella enterica*-Umweltisolate mit dem API® 20 E-Testsystem

Identifizierungsergebnis API® 20 E	Anzahl
<i>Salmonella</i> spp.	172
gesamt bestätigt durch API® 20 E Identifizierungsergebnis: 172 Isolate (97 %)	
<i>Edwardsiella tarda</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	1
gesamt getestet: 178 Isolate (100%)	

7.3. Rohdaten der Bestandsaufnahme der bakteriellen Pathogene im urbanen Fluss Ruhr

7.3.1. Rohdaten *Aeromonas* spp.

Tabelle 52: Rohdaten der Bestimmung von *Aeromonas* spp. im Fluss Ruhr. Die Konzentrationen sind in KBE/100 mL angegeben. n. b. entspricht nicht bestimmt.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
23.04.2012	19.650	12.750	20.650	33.500	45.000	49.500	47.000	55.500
07.05.2012	24.600	28.800	30.000	33.000	21.500	32.600	51.000	51.500
21.05.2012	29.200	13.200	4.850	15.300	24.700	39.000	38.400	35.000
04.06.2012	81.000	215.000	47.500	84.000	58.500	66.500	68.500	82.000
18.06.2012	16.400	25.000	23.600	22.900	14.800	19.300	28.600	28.500
02.07.2012	31.000	21.000	20.500	10.800	14.750	19.500	33.500	40.500
16.07.2012	45.000	45.000	37.000	58.000	42.000	44.500	51.000	54.500
30.07.2012	14.000	23.550	15.750	15.400	23.750	28.500	34.500	28.500
13.08.2012	11.450	28.550	27.325	10.075	23.200	22.075	25.850	19.550
27.08.2012	19.700	44.500	48.000	16.050	28.000	31.000	42.000	40.000
10.09.2012	8.200	27.675	13.800	4.700	14.575	20.525	20.550	23.400
24.09.2012	19.775	38.500	11.225	10.200	11.900	140.000	36.000	80.500
08.10.2012	14.975	13.450	12.575	13.625	16.225	21.300	20.975	19.650
22.10.2012	5.100	3.550	4.350	5.750	3.950	6.800	5.000	4.180
05.11.2012	23.075	32.500	17.450	11.367	15.050	10.367	10.400	8.833
19.11.2012	20.500	770.000	8.800	5.750	7.137	5.703	4.067	7.200
17.12.2012	61.000	60.500	53.500	52.500	68.500	69.000	65.500	72.000
18.02.2013	3.400	3.550	2.950	3.050	3.750	3.450	5.967	5.050
18.03.2013	5.250	4.300	3.750	4.400	5.000	4.100	4.000	4.000
08.04.2013	2.300	3.800	3.150	2.250	2.550	2.700	2.900	4.600
22.04.2013	18.100	16.975	10.050	14.550	28.500	41.000	35.000	44.000
06.05.2013	90.000	31.000	9.900	31.000	33.000	59.500	64.000	81.000
27.05.2013	20.500	35.000	24.500	38.500	42.500	38.000	40.000	42.500
17.06.2013	n. b.	n. b.	15.825	n. b.	24.000	n. b.	n. b.	n. b.
01.07.2013	n. b.	n. b.	19.400	n. b.	16.550	n. b.	n. b.	n. b.
15.07.2013	n. b.	n. b.	11.100	n. b.	13.175	n. b.	n. b.	n. b.
29.07.2013	n. b.	n. b.	131.000	n. b.	16.150	n. b.	n. b.	n. b.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
12.08.2013	n. b.	n. b.	33.000	n. b.	26.500	n. b.	n. b.	n. b.
26.08.2013	n. b.	n. b.	24.500	n. b.	24.500	n. b.	n. b.	n. b.
23.09.2013	n. b.	n. b.	9.400	n. b.	13.350	n. b.	n. b.	n. b.
07.10.2013	n. b.	n. b.	9.750	n. b.	9.800	n. b.	n. b.	n. b.
21.10.2013	n. b.	n. b.	9.050	n. b.	9.600	n. b.	n. b.	n. b.
04.11.2013	n. b.	n. b.	54.000	n. b.	17.500	n. b.	n. b.	n. b.
18.11.2013	n. b.	n. b.	8.050	n. b.	6.000	n. b.	n. b.	n. b.
02.12.2013	n. b.	n. b.	17.050	n. b.	10.200	n. b.	n. b.	n. b.
17.03.2014	n. b.	n. b.	5.650	n. b.	15.900	n. b.	n. b.	n. b.
31.03.2014	n. b.	n. b.	5.650	n. b.	18.725	n. b.	n. b.	n. b.
14.04.2014	n. b.	n. b.	14.500	n. b.	75.500	n. b.	n. b.	n. b.
28.04.2014	n. b.	n. b.	30.500	n. b.	35.500	n. b.	n. b.	n. b.
02.06.2014	n. b.	n. b.	8.650	n. b.	10.900	n. b.	n. b.	n. b.

7.3.2. Rohdaten *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt nach Flüssiganreicherung gemäß DIN 38411-8:1982

Tabelle 53: Rohdaten der Bestimmung von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt durch Flüssiganreicherung gemäß DIN 38411-8:1982 im Fluss Ruhr. Die Konzentrationen sind in KBE/100 mL angegeben. n. b. entspricht nicht bestimmt.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
23.04.2012	0,0	0,0	0,0	2,8	2,8	1,6	2,4	0,4
07.05.2012	2,8	4,8	16,0	1,6	2,0	4,0	2,8	2,8
21.05.2012	0,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,2	0,4
04.06.2012	7,2	360,0	2,4	360,0	38,0	53,2	11,2	77,2
18.06.2012	0,4	0,8	2,8	2,4	0,4	1,2	0,8	0,4
02.07.2012	0,4	0,4	1,0	0,4	1,5	360,0	1,0	0,4
16.07.2012	18,0	11,2	38,0	77,2	29,2	11,2	16,0	18,0
30.07.2012	0,4	1,2	2,8	2,4	1,6	53,2	11,2	53,2
27.08.2012	11,2	0,0	120,0	1,2	18,0	7,2	31,2	18,0
10.09.2012	10,0	0,0	11,2	0,0	0,4	11,2	0,4	1,2
24.09.2012	4,0	1,2	0,0	0,4	0,4	18,0	4,0	53,2
08.10.2012	7,2	0,0	4,0	4,0	7,2	7,2	5,2	1,6
22.10.2012	1,6	0,0	1,2	1,6	0,4	0,4	0,0	2,8
05.11.2012	6,0	0,0	7,2	2,8	1,6	1,2	2,8	0,0
19.11.2012	4,0	360,0	0,4	0,4	4,8	1,6	0,0	0,0
17.12.2012	11,2	49,2	38,0	31,2	49,2	120,0	120,0	31,2
18.02.2013	3,2	0,4	0,4	1,6	1,6	0,8	1,6	4,0
18.03.2013	0,8	0,4	0,4	0,4	1,6	0,0	0,4	0,0
08.04.2013	0,0	1,6	0,8	0,0	1,2	0,4	0,0	0,4
22.04.2013	0,0	2,8	0,4	1,2	0,0	0,0	0,0	0,4
06.05.2013	0,0	0,0	0,0	18,0	0,0	0,0	1,2	0,4
27.05.2013	0,4	18,0	11,2	7,2	7,2	1,6	2,8	1,6
17.06.2013	n. b.	n. b.	0,5	n. b.	0,5	n. b.	n. b.	n. b.
01.07.2013	n. b.	n. b.	5,2	n. b.	0,4	n. b.	n. b.	n. b.
15.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
29.07.2013	n. b.	n. b.	0,8	n. b.	5,2	n. b.	n. b.	n. b.
12.08.2013	n. b.	n. b.	1,6	n. b.	18,0	n. b.	n. b.	n. b.
26.08.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	3,2	n. b.	n. b.	n. b.
23.09.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	1,2	n. b.	n. b.	n. b.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
07.10.2013	n. b.	n. b.	0,4	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
21.10.2013	n. b.	n. b.	0,8	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
04.11.2013	n. b.	n. b.	7,2	n. b.	1,6	n. b.	n. b.	n. b.
18.11.2013	n. b.	n. b.	1,6	n. b.	2,8	n. b.	n. b.	n. b.
02.12.2013	n. b.	n. b.	3,6	n. b.	2,4	n. b.	n. b.	n. b.
17.03.2014	n. b.	n. b.	0,4	n. b.	1,6	n. b.	n. b.	n. b.
31.03.2014	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,4	n. b.	n. b.	n. b.
14.04.2014	n. b.	n. b.	0,4	n. b.	0,4	n. b.	n. b.	n. b.
28.04.2014	n. b.	n. b.	4,8	n. b.	2,4	n. b.	n. b.	n. b.
02.06.2014	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,4	n. b.	n. b.	n. b.

7.3.3. Rohdaten thermotolerante *Campylobacter* spp.

Tabelle 54: Rohdaten der Bestimmung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. im Fluss Ruhr. Die Konzentrationen sind in MPN/100 mL angegeben. n. b. entspricht nicht bestimmt.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
23.04.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
07.05.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21.05.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
04.06.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
18.06.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
02.07.2012	0,1	0,5	0,1	0,0	3,1	0,0	0,0	0,0
16.07.2012	0,4	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
30.07.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27.08.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10.09.2012	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
24.09.2012	0,0	0,0	8,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
08.10.2012	0,3	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
22.10.2012	0,1	0,0	0,0	0,0	0,8	0,7	0,1	0,8
05.11.2012	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
19.11.2012	0,7	0,1	1,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,5
17.12.2012	1,4	0,2	0,1	0,0	0,4	0,2	0,3	0,3
18.02.2013	2,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	2,5	0,1
18.03.2013	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,1
08.04.2013	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,3	0,5	0,1
22.04.2013	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
06.05.2013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0
15.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
29.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
12.08.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
26.08.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
23.09.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
07.10.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,1	n. b.	n. b.	n. b.
21.10.2013	n. b.	n. b.	0,7	n. b.	15,0	n. b.	n. b.	n. b.
04.11.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	1,0	n. b.	n. b.	n. b.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
18.11.2013	n. b.	n. b	0,2	n. b	0,7	n. b	n. b	n. b
02.12.2013	n. b.	n. b	15,0	n. b	0,4	n. b	n. b	n. b
17.03.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,1	n. b	n. b	n. b
31.03.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,3	n. b	n. b	n. b
14.04.2014	n. b.	n. b	0,1	n. b	0,8	n. b	n. b	n. b
28.04.2014	n. b.	n. b	0,6	n. b	0,0	n. b	n. b	n. b
02.06.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,1	n. b	n. b	n. b

7.3.4. Rohdaten *Salmonella enterica*

Tabelle 55: Rohdaten der Bestimmung von *Salmonella enterica* im Fluss Ruhr. Die Konzentrationen sind in MPN/100 mL angegeben. n. b. entspricht nicht bestimmt.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
21.05.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
04.06.2012	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
18.06.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
02.07.2012	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
16.07.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30.07.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27.08.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
10.09.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24.09.2012	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	1,4	0,1	1,4
08.10.2012	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22.10.2012	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,0	0,3
05.11.2012	0,0	0,5	0,4	0,1	0,2	1,5	0,1	0,1
19.11.2012	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
17.12.2012	1,4	1,0	0,3	0,8	0,8	2,5	1,4	3,1
18.02.2013	0,0	0,0	0,0	0,1	0,7	1,0	1,8	37,0
18.03.2013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,6
08.04.2013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,6
22.04.2013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
06.05.2013	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27.05.2013	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
17.06.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,1	n. b.	n. b.	n. b.
01.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
15.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
29.07.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
12.08.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
26.08.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
23.09.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
07.10.2013	n. b.	n. b.	0,0	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
21.10.2013	n. b.	n. b.	0,1	n. b.	0,0	n. b.	n. b.	n. b.
04.11.2013	n. b.	n. b.	0,1	n. b.	0,1	n. b.	n. b.	n. b.

Datum	Styrum-Ost	Löwental	Seaside Beach	Polderpumpwerk	Fischereiverein	Rote Mühle	Zornige Ameise	BarCelona
18.11.2013	n. b.	n. b	0,3	n. b	0,1	n. b	n. b	n. b
02.12.2013	n. b.	n. b	0,1	n. b	0,0	n. b	n. b	n. b
17.03.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,1	n. b	n. b	n. b
31.03.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,0	n. b	n. b	n. b
14.04.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,0	n. b	n. b	n. b
28.04.2014	n. b.	n. b	0,1	n. b	0,3	n. b	n. b	n. b
02.06.2014	n. b.	n. b	0,0	n. b	0,0	n. b	n. b	n. b

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen und Institutionen danken, die meinen Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Curt Flemming danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Seit der ersten Vorlesung war er die Konstante während meines Studiums und hat mir auch im Anschluss durch seinen unerschütterlichen Optimismus und seine Begeisterung für die Mikrobiologie neuen Mut gegeben, wenn ich selbst nicht an mich geglaubt habe.

Dr. Jost Wingender danke ich für die zahlreichen konstruktiven Fachgespräche, in denen ich an seinem unendlichen Wissensschatz teilhaben durfte.

Herrn PD. Dr. Georg-Joachim Tuschewitzki danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Einblicke in die praktische Umsetzung der Trinkwasserhygiene bei den Endverbrauchern.

Gabriele Czczor, Astrid Dannehl und Janine Wagner danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit innerhalb des „Sichere Ruhr“-Teams. Auch wenn die Menge an Proben nicht enden wollte oder wir in strömenden Regen zur Probenahme gefahren sind: mit Euch hat jeder Arbeitstag Spaß gemacht und man konnte sich immer auf Euch verlassen.

Nadine Krüger, Tim Wiese, Julia Heise, Felicitas Dudziak, Philipp Eickenbusch, Nadine Richter und Barbara Dericks danke ich für die wertvolle Unterstützung.

Für die vielen schönen Gespräche und angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich meinen Büromitbewohnern Alexa, Witold und Gaby.

Janine und Alexa ich bin dankbar, dass ich Euch durch diese Arbeit kennenlernen durfte und hoffe, dass ihr mit Eurer Freundschaft noch ganz lange Teil meines Lebens sein werdet.

Verena, Manuel, Patrizia, Uli und Vera danke ich für die schönen „Water Science“-Jahre in Duisburg und Essen.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern und Arthur danke ich, dass sie immer für mich da waren. Meiner süßen Tochter Ronja danke ich, dass sie mir den Mut gegeben hat diese Arbeit endlich abzuschließen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

“Untersuchung ausgewählter pathogener und fakultativ pathogener Bakterien in der Ruhr“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form bei keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Bottrop, im Januar 2022

(Marina Horstkott)

Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."