

**Aus dem
Institut für Allgemeine Hygiene
und Umwelthygiene
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart**

**Elimination von
enteropathogenen Viren und Bakterien aus Abwasser
mittels Membranbelebungsverfahren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ingo Philipp Fürchtegott Baumann
aus
Freudenstadt**

2007

**Aus dem
Institut für Allgemeine Hygiene
und Umwelthygiene
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart**

**Elimination von
enteropathogenen Viren und Bakterien aus Abwasser
mittels Membranbelebungsverfahren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ingo Philipp Fürchtegott Baumann
aus
Freudenstadt**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Botzenhart

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Flehmig

**Für meine Töchter
Ronja, Lejana und Maja**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	7
1. Einleitung	9
1.1. Wasser als Krankheitsverursacher.....	9
1.2. Abwasserreinigung mittels Membranbelebungsverfahren.....	14
1.3. Nachweismethoden enteropathogener Viren im Wasser.....	16
1.3.1. Aktive Adsorption.....	16
1.3.2. Passive Adsorption.....	16
1.3.3. Anorganische Flockung	17
1.3.4. Organische Flockung.....	17
1.3.5. PCR	17
1.3.6. RT-PCR.....	18
1.3.7. Nested-PCR	18
1.3.8. Zellkultur.....	18
1.3.9. MPN-Verfahren (most probable number)	19
1.3.10. Plaque-Assay	19
1.4. Zielsetzung.....	20
2. Material.....	21
2.1. Wasserproben.....	21
2.1.1. Kläranlage Schramberg-Waldmössingen	21
2.1.2. Probennahme in der Kläranlage	24
2.2. Allgemein verwendete Lösungen.....	24
2.3. Geräte	25
2.4. Sonstige Laborausstattung	26
2.5. Lösungen und Puffer für die Aufkonzentrierung der enteropathogenen Viren mittels Glaswollefiltration:.....	28
2.5.1. Elutionspuffer	28
2.5.2. Aluminiumchloridlösung (1 M)	28
2.5.3. di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (0,15 M)	28
2.5.4. Laurylsulfat-Bouillon mit MUG (LS-MUG).....	29

2.6.	Lösungen und Medien für den Nachweis von Enterokokken mittels Membranfiltration	30
2.6.1.	Slanetz und Bartley Agar; Grundmedium	30
2.6.2.	TTC-Lösung	30
2.6.3.	Slanetz und Bartley Agar; vollständiges Medium.....	31
2.6.4.	Galle-Äsculin-Azid Agar.....	31
2.7.	Lösungen und Medien zum Nachweis von Enterokokken mittels miniaturisiertem MPN-Verfahrens	32
2.8.	Lösungen und Medien für die DNA/RNA-Isolierung mittels Silicaextraktion	32
2.8.1.	Silica-Matrix.....	33
2.8.2.	DEP-Wasser.....	33
2.8.3.	Lysispuffer (LP)	35
2.8.4.	Waschpuffer (WP)	35
2.9.	Lösungen und Medien für den Nachweis von Rotaviren mittels PCR	37
2.10.	Lösungen und Medien für den Nachweis von Adenoviren mittels PCR	38
2.11.	Lösungen und Medien zum Nachweis von Noroviren mittels PCR	39
2.12.	Medien und Lösungen für den Nachweis von Enteroviren mittels PCR	40
2.13.	Lösungen und Medien für die Gelelektrophorese	41
2.13.1.	Agarosegel (1,5%).....	42
2.13.2.	5 x TBE-Puffer (1 l Stammlösung).....	42
2.13.3.	Ladepuffer	42
2.14.	Lösungen und Medien für den quantitativen Nachweis von Viren in Zellkultur mittels Plaque-Assay	43
2.14.1.	Agar (1 %)	43
2.14.2.	Erhaltungs- bzw. Wachstumsmedium	43
2.14.3.	Overlay-Medium	43
2.15.	Software	44
3.	Methoden	45
3.1.	Untersuchungsablauf der Aufkonzentrierung der enteropathogenen Viren mittels Glaswollefiltration.....	45

3.1.1.	Vorbereitung der Säulen.....	45
3.1.2.	Vorbereitung der Wasserproben.....	46
3.1.3.	Elution der Säulen und weitere Aufbereitung der Proben.....	46
3.2.	Nachweis von gesamt- und fäkalcoliformen Bakterien.....	47
3.2.1.	Kultur in LS – MUG - Bouillon.....	48
3.2.2.	Auswertung	48
3.2.3.	Identifizierung	49
3.2.4.	Ermittlung der Konzentration fäkalcoliformer und gesamtcologiformer Bakterien.....	49
3.3.	Nachweis von Enterokokken mittels Membranfiltration	50
3.3.1.	Durchführung des Enterokokkennachweises	50
3.4.	Nachweis von intestinalen Enterokokken mittels miniaturisiertem MPN-Verfahren (MUD-Verfahren)	51
3.5.	DNA/RNA Isolierung durch Silicaextraktion	53
3.5.1.	Durchführung der DNA/RNA-Isolierung.....	53
3.6.	Nachweis von Rotaviren durch RT-PCR.....	54
3.6.1.	Reverse Transkription und 1. PCR.....	55
3.6.2.	Polymerase-Kettenreaktion (seminested PCR)	56
3.7.	Nachweis von Adenoviren mittels PCR.....	58
3.7.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
3.7.2.	nested-PCR.....	59
3.8.	Nachweis von Noroviren mittels PCR.....	60
3.8.1.	Reverse Transkription	60
3.8.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	61
3.8.3.	nested PCR.....	63
3.9.	Nachweis von Enteroviren mittels PCR.....	64
3.9.1.	Reverse Transkription und 1. PCR.....	65
3.9.2.	Polymerase-Kettenreaktion (seminested PCR)	66
3.10.	Gelelektrophorese und Dokumentation	67
3.10.1.	Durchführung der Gelelektrophorese	67
3.11.	Quantitativer Nachweis von Viren in Zellkultur mittels Plaque-Assay	68
3.11.1.	Auftauen der Zellen	68
3.11.2.	Subkultivierung der Zelllinien.....	69
3.11.3.	Einzelne Untersuchungsschritte	69
3.11.4.	Anfärben und Auszählen der Plaques	70

3.12.	Quantitativer Nachweis von Viren in Zellkultur mittels MPN-Verfahren	70
3.12.1.	Ansatz in 24-er wells	71
4.	Ergebnisse	72
4.1.	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen	72
4.2.	Ergebnisse der virologischen Untersuchungen	75
4.2.1.	Ergebnisse der qualitativen PCR.....	75
4.2.2.	Ergebnisse des quantitativen Virennachweises in der Zellkultur mittels Plaque Assay.....	77
4.3.	Eliminationsleistung des Membranbelebungsverfahrens	77
5.	Diskussion	78
5.1.	Belastung der Oberflächengewässer durch Kläranlagenabläufe..	78
5.2.	Eliminationsleistung der untersuchten Membranbelebungsanlage	78
5.3.	Virenkonzentration im Abwasser	81
6.	Zusammenfassung	83
7.	Anhang	84
	Literaturverzeichnis	86
	Danksagung.....	92
	Lebenslauf	93

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
BE	Beef Extrakt (Fleischextrakt)
Bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CPE	Cytopathogener Effekt
d	Tag
d.h.	das heißt
DEP-Wasser	Diethyl Pyrocarbonat Wasser (0,1 %ige Lösung)
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphates
E.	Enterococcus
E. coli	Escherichia coli
ECHO	Enteric cytopathic human orphan virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EW	Einwohnerwerte
FC	fäkalcoliforme Bakterien
FKS	Fötales Kälberserum
GC	gesamtcloiforme Bakterien
Gebr.Lsg.	Gebrauchslösung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
KBE	kolonienbildende Einheiten
konz.	konzentriert
l	Liter
M	molar
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Min	Minute(n)
mind.	mindestens
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPN	most probable number
MUD	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucosid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung

PFU	Plaque Forming Units
PCR	polymerase chain reaction
phys. NaCl	physiologische Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction
rTth-Polymerase	thermostabiles Enzym, besitzt reverse Transkriptase- und DNA-Polymerasefähigkeit
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i> (gentechnisch hergestellt)
TBE	tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
VE-Reinstwasser	Vollentsalztes Wasser
Vol	Volumen
x g	x Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1. Wasser als Krankheitsverursacher

Enteropathogene Viren sind häufige Verursacher schwerer gastrointestinaler und neurogener Erkrankungen, vor allem Kleinkinder und alte Menschen sind häufig betroffen. Es handelt sich um Viren, die sich im Darm vermehren und über den Stuhl ausgeschieden werden. Da jeder Mensch täglich Wasser konsumiert (direkt als Trinkwasser oder über die Nahrung), ist Wasser eine häufige Quelle der Pathogenverbreitung und besitzt ein hohes Potential für die katastrophenartige Ausbreitung von Epidemien. Aber auch Freizeitgewässer, wie Teiche, Flüsse und Seen, sowie öffentliche Bäder und ähnliches (40), stellen, vor allem bei fäkaler Verunreinigung, einen Übertragungsweg für Krankheiten dar.

Viren gelangen hier vor allem durch fäkalienhaltiges Abwasser in Oberflächengewässer und teilweise damit ins Trinkwasser (45), was zu einer schnellen und in manchen Fällen epidemieartiger Verbreitung der Viren führt. Meist handelt es sich um kleine unbehüllte Viren, die sehr resistent sind und oft lange überleben können. Sie zeigen auch eine weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber Chlorung oder Ozonierung (46).

Einige enteropathogene Viren und ihre Auswirkungen auf den Menschen sind in folgender Übersicht aufgeführt

Tabelle 1: enteropathogene Viren

Adenoviren <i>-doppelsträngige DNA-Viren</i>	Die Silbe <i>Adeno</i> leitet sich vom altlateinischen Wort für „Drüse“ ab und bezieht sich auf die Tatsache, dass diese Viren zuerst aus dem Gewebe von Tonsillen und adenoiden Drüsen des Menschen isoliert wurden (40). Zur Zeit sind 47 humanpathogene Adenovirus-Serotypen bekannt, die in 6 Subgruppen (A-F) unterschieden werden. Adenoviren kommen weltweit, ohne wesentliche jahreszeitliche
--	--

	<p>Schwankungen mit gelegentlichen kleineren Epidemien, vor (42).</p> <p>Verursachte Erkrankungen: Keratokonjunktivitis epidemica (Typen 8, 19, 37), akute respiratorische Erkrankungen, Pharyngitis, Pharyngokonjunktivalfieber, folliculäre Konjunktivits, Gastroenteritiden mit und ohne mesenterialer Lymphadenopathie, Pneumonien (Typen 1 - 4, 7) (30).</p> <p>Man schätzt , dass Adenoviren an 5 – 10 % aller Respirations-traktinfektionen beteiligt sind, des Weiteren sind sie die zweithäufigste virale Ursache für Gastroenteritiden bei Säuglingen (42).</p>
<p>Reoviren (Rotavirus, Reovirus) <i>-doppelsträngige</i> <i>RNA-Viren</i></p>	<p>Die Abkürzung „REO“ steht für Respiratory Enteric Orphan Viruses, wobei der Begriff Orphan (englisch Waise) anzeigt, dass eine Zuordnung zu einer bestimmten Krankheit nicht möglich ist. Reoviren verursachen respiratorische, als auch enteritische Symptome. Es existieren 7 Serotypen, Vorkommen v.a. in den Wintermonaten (42).</p> <p>Verursachte Erkrankungen: Rhinitis, Pharyngitis, Diarrhöen. Die Rotaviren sind die klinisch wichtigsten menschlichen Reoviren und verantwortlich für Gastroenteritiden, welche gehäuft akut in den Wintermonaten beobachtet werden und mit teilweise wässrigen Durchfällen und Erbrechen einhergehen. Die daraus resultierende Exsikose ist eine der Hauptursachen der Säuglings- und Kindersterblichkeit in den Entwicklungsländern (42). Vor allem Kinder im Alter von 6 - 24 Monaten erkranken (40). Man schätzt, dass weltweit jedes Jahr 1 - 3 Mio Kinder an Rotavirusinfektionen sterben (21). Der Übertragungsweg ist meist fäkal-oral. Bis heute existiert keine Impfprophylaxe, ein amerikanischer Impfstoff wurde zurückgezogen.</p>

<p>Picornaviren (Rhinoviren, Enteroviren, Hepatoviren)</p>	<p>Zur Familie der Picornaviren zählt man 6 Genera, wobei 3 davon von humanpathogener Bedeutung sind: die Rhinoviren (102 humane Serotypen), die Enteroviren (einschließlich Coxsackieviren (23 Serotypen des Typ A, 6 Serotypen des Typ B), ECHO-Viren (30 Serotypen) und des Poliovirus (Serotypen 1,2,3)), sowie das Hepatitis-A-Virus (42).</p> <p>Verursachte Erkrankungen:</p> <p>Polioviren: paralytische Poliomyelitis, aseptische Meningitis, Enzephalitis. Die Poliomyelitis, durch das Poliovirus verursacht, war einst eine der größten Seuchen der Menschheit, doch hat die Entwicklung eines wirkungsvollen Impfstoffs die Krankheit sehr stark zurückgedrängt. Die WHO hat ein weltweites Impfprogramm aufgelegt, das zum Ziel hat, diese Krankheit völlig auszurotten. Gegenwärtig gibt es noch Berichte von Erkrankungen durch dieses Virus in einigen Ländern Afrikas und des indischen Stammkontinents (40).</p> <p>Coxsackie A und B, ECHO-Viren: Meningitiden, Peri-/Myokarditiden, Herpangina, Enzephalitis, Hand-Mund-Fuß-Exanthem, akute hämorrhagische Konjunktivitis, Pleurodynie (Myalgia epidemica, Bornholm'sche Krankheit), Pleuritis, Peritonitis, schwere ZNS-Infektionen bei Neugeborenen, Erkrankungen des Respirationstraktes („Sommergrippe“)</p> <p>Rhinoviren: häufigster Erreger des „Schnupfens“, Otitis media, Sinusitis</p> <p>Hepatitis A-Virus: Milde Form der Hepatitis, in 0,1% der Fälle jedoch auch fulminante Verläufe mit akutem Leberversagen, bei Kanalarbeitern wird sie als Berufkrankheit anerkannt (42).</p>
<p>Caliciviren, Noroviren, Norwalkvirus,</p>	<p>Vor allem Norwalkviren, Norwalk-like- und Noroviren verursachen einen großen Teil der Gastroenteritiden (6),(47), welche immer wieder v.a. in Gemeinschaftseinrichtungen und</p>

Hepatitis-E-Virus, Sapporo-like-Virus, Norwalk-like-Virus	<p>Krankenhäusern zu hohen Erkrankungsraten führen. Die Infektiosität ist sehr hoch, nur wenige Viruspartikel führen zur Infektion, was Schwierigkeiten bei der Beherrschung von nosokomialen Ausbrüchen bereitet (47).</p> <p>Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, aerogen (durch Erbrechen) und durch kontaminierte Lebensmittel oder Wasser. Epidemie: Michigan/USA 1979 nach Baden in einem künstlichen See.</p> <p>Das Hepatitis-E-Virus verursacht über die enterische Route eine Hepatitis (40), die vor allem für Schwangere mit einer Mortalitätsrate von 20% eine besondere Gefährdung darstellt (4),(8). Hepatitis-E ist in Mexiko sowie in tropischen und subtropischen Regionen Afrikas und Asiens endemisch (40),</p>
--	--

Vor allem muss man bei den durch Wasser verursachten zahlreichen Gastroenteritiden, bei denen kein Erreger festgestellt wurde, davon ausgehen, dass diese überwiegend durch Viren verursacht wurden, die sich aus methodischen Gründen aber nicht nachweisen ließen. Eine verbesserte Virusdiagnostik im Wasser – vor allem dank zusätzlicher molekularbiologischer Methoden – hat in den letzten Jahren zu einer Intensivierung von Virusuntersuchungen geführt (35), jedoch ist eine Untersuchung auf Darmviren nach der Badegewässerrichtlinie (17) keine Routineanalyse, sondern wird nur in Verdachtsfällen durchgeführt.

Über die Infektionsdosen bei enteropathogenen Viren gibt es wenig konkrete Angaben. Generell ist jedoch davon auszugehen, dass sie sehr niedrig liegen müssen, da bei enteropathogenen Viren eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Schmierinfektion typisch ist. Die bei Hepatitis A-Viren und Rotaviren angegebenen Infektionsdosen von 1 – 10 PFU dürften daher auch für die anderen enteropathogenen Viren gelten (35).

Untersuchungen von vier Abwasserreinigungsanlagen im Neckarraum erbrachten eine Reduktion an Enteroviren und anderen enteropathogenen Viren von über 97 %, dennoch musste in den Kläranlagenabläufen noch mit Viruskonzentrationen von ca. 0 – 8,25 PFU / 1 l für Enteroviren, bzw. mit Konzentrationen von ca. 0 – 250 MPN / 1 l für andere enteropathogenen Viren gerechnet werden (21).

Tabelle 2:

Viruskonzentrationen für enterale Viren in Oberflächengewässer und Abwasser, gemessen als PFU / l und MPN / l, ohne Berücksichtigung der Wiederfindungsraten (35),(21)

PFU = Plaque-Forming-Units

MPN = Most-Probable-Number

(modifiziert nach verschiedenen Autoren, Fleischer 1999)

Flüsse, Seen	Gereinigtes Abwasser	Rohabwasser	Autoren
13,3 PFU / l			Hahn et al. (1988),(28)(28)
	89 – 188 PFU / l		Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (1991),(5)
		6,2 – 2250 PFU / l	Heijkal et al. (1981),(29)
0 – 180 PFU / l			Hughes (1992)
		150 – 10.750 PFU / l	Irving & Smith (1981),(34)
0 – 325 PFU / l			Tani et al. (1992)
	0 – 8,25 PFU / l 0 – 250 MPN / l	15 – 548 PFU / l 100 – 3600 MPN/l	Fleischer et al. (2000),(24)
0 – 89 MPN / l			Fleischer (1998a),(20)

Anhand von quantitativen Untersuchungen des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg in einem Fluss konnten maximale Werte von 35 PFU in 20 l (entsprechend 2 PFU / l) ermittelt werden, höhere Werte zeigten sich beim MPN-Verfahren, mit dem vorzugsweise Adeno- und Rotaviren erfasst werden. Hier fanden sich bis zu 90 MPN / l. Daraus geht hervor, dass in Oberflächengewässern die Viren in Mengen auftreten können, die im relevanten Bereich der Infektionsdosis liegen (35).

Ältere Abwasserreinigungsanlagen zeigten im Vergleich zu den oben genannten vier moderneren Anlagen eine um wenigstens eine Zehnerpotenz höhere Viruskonzentration, sodass anhand der ermittelten Daten ersichtlich wird, dass hier Handlungsbedarf besteht, um die mikrobielle Belastung unserer Gewässer zu vermindern (35).

Das Membranbelebungsverfahren stellt hier ein viel versprechendes Verfahren zur Verhütung von Infektionen durch Reduktion von Krankheitserregern dar.

1.2. Abwasserreinigung mittels Membranbelebungsverfahren

Das Membranbelebungsverfahren ist eine recht neue Technologie zur Abwasserreinigung. Man versteht hierunter die Kombination aus einer konventionellen Belebungsanlage mit einer Membranfiltereinheit zur Abtrennung des Klärschlammes vom gereinigten Wasser.

Die Filtration ersetzt die Feststoffseparation, die in einem konventionellen Belebtschlamm-System ansonsten durch Sedimentation und eventuell einem Sandfilter erfolgt (62). Somit wird eine sehr hohe Qualität der Abwasserreinigung erzielt, nicht nur feinste Partikel werden zurückgehalten, sondern auch pathogene Mikroorganismen, Keime und Viren. Eine Nachklärung mit Schlammrückführung entfällt, wodurch sich Einsparungen beim Beckenvolumen gegenüber üblicher Belebungsanlagen ergeben, was die Anlagen sehr kompakt macht und sie auch mit geringem Raumangebot zu realisieren sind (1),(61). Auch durch den hohen Rückhalt an Mikroorganismen

kann die Biomasse im Belebtschlammbecken in wesentlich höherer Konzentration gehalten werden, als es bei konventionellen Belebungsanlagen zulässig ist (3).

Das so gereinigte Abwasser erfüllt die EU Badegewässerrichtlinien (17) problemlos (37), somit ist solch eine Technologie vor allem an jenen Orten wichtig, an denen gereinigtes Abwasser z.B. direkt in ein Oberflächengewässer geleitet wird, das dem Menschen, z.B. zum Baden oder Tieren, beispielsweise in Form von Teichen zur Verfügung steht. Auch wenn der Ablauf in Gewässer abgeleitet wird, die durch verkarstetes Gelände verlaufen, ist zum Schutz des Grundwassers eine erhöhte Reinigungsleistung erforderlich.

In Deutschland sind bis heute nur wenige Membrananlagen in Betrieb, die jüngst am 18.06.2006 eingeweihte Anlage liegt in Bondorf-Hailfingen. Hier war die zusätzliche Reinigungsstufe notwendig, da das geklärte Abwasser in den besonders geschützten Kochartgraben geleitet wird (51). Die installierte Anlage hat 9000 EW und ist damit um einiges größer als die in dieser Arbeit beprobte Anlage in Schramberg-Waldmössingen. Der Nachbar-Abwasserzweckverband Raum Ergenzingen hat im August diesen Jahres beschlossen, die vorhandene Kläranlage in Ergenzingen auch mit der Membrantechnologie aufzurüsten. Die Kläranlage entwässert hier in den Seltenbach und fließt durch das Rommelstal nach Obernau und dort in den Neckar. Das eingeleitete Wasser muss daher zum Schutz der Heilquellen und Fischbrut eine hohe Qualität aufweisen. Die Alternativen wie Retentionsfilterbecken hätten zuviel Platz in Anspruch genommen und Sandfilter mit anschließender UV-Bestrahlung zur Entkeimung wären pro Jahr um 13.000 Euro teurer gewesen, sodass das Membranbelebungsverfahren an diesem Standort auch aus ökonomischer Sicht von Vorteil ist (52).

Eine bessere Elimination von z.B. Medikamentenrückständen, konnte nur für einige wenige pharmazeutische Stoffe nachgewiesen werden, da die Membranmodule keine gelösten Stoffen zurückhalten können (36), (14),(7).

Membranfilter finden des Weiteren eine zunehmend größere Verbreitung im Bereich der Trinkwasseraufbereitung, auch hier steigt die Anzahl der installierten Anlagen stetig (27). Auch in der Aufbereitung von Industrieabwasser und Prozesswasser findet das Membranverfahren und Membranbelebungsverfahren immer größere Verbreitung (15),(16).

1.3. Nachweismethoden enteropathogener Viren im Wasser

Aufgrund der relativ geringen Viruskonzentration in Oberflächengewässer, Abwasser und Trinkwasser müssen für den Nachweis der darin enthaltenen enteropathogenen Viren zuerst größere Mengen (mind. 1 – 10 l) an Wasser aufkonzentriert werden. Weiterhin sind die Viren im Wasser, aufgrund ihres Adsorptionsverhaltens an Partikel gebunden und dadurch schlecht detektierbar, was wiederum eine Aufkonzentrierung vor den eigentlichen Nachweismethoden unabdingbar macht.

Hierzu gibt es verschiedene Möglichkeiten (21):

1.3.1. Aktive Adsorption

Das Wasser passiert Filter, deren Oberflächen positiv geladen sind, die im Wasser enthaltenen Viren adsorbieren an den Filter und werden anschließend bei alkalischem pH wieder eluiert (26).

1.3.2. Passive Adsorption

Das zu untersuchende Wasser passiert Materialien, an denen die enthaltenen Viren hängen bleiben. Das Herauslösen der Viren erfolgt mechanisch oder mittels Elution.

1.3.3. Anorganische Flockung

Dem Wasser werden Salze zugesetzt, z.B. AlCl_3 oder FeCl_3 und bilden bei Einstellung eines bestimmten pH-Wertes Komplexe, an denen die Viren haften (58), (53). Diese Art Fällung wird auch bei der konventionellen Abwasserreinigung zur Elimination von Phosphaten eingesetzt (33).

1.3.4. Organische Flockung

Vor der Filtration können die Viren zusätzlich durch organische Flockung weiter aufkonzentriert werden (48).

Oft ist eine Kombination der einzelnen Verfahren zur Aufkonzentration nötig, um eine hohe Wiederfindungsrate zu gewährleisten (21).

1.3.5. PCR

Die PCR hat sich seit ihrer Einführung im Jahre 1985 zu einem elementaren Hilfsmittel für die Forschung und die medizinische Diagnostik entwickelt. In dieser in vitro-Technik werden hierbei, die für den Erreger spezifischen Genomabschnitte, welche von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt und der Erreger somit indirekt über sein Erbgut nachgewiesen (41). Mit diesem Verfahren ist es auch möglich Erreger nachzuweisen, die bisher schlecht oder noch nicht anzüchtbar sind (22). Die PCR ist ein schnelles, sensitives und spezifisches Verfahren und wird in großem Stil in vielen Laboren durchgeführt. Problematisch ist die PCR jedoch bei der Untersuchung von Abwasserproben, weil diese Inhaltstoffe enthalten können, die die PCR inhibieren. Diese Stoffe versucht man bei der DNA/RNA-Isolierung zu entfernen.

Theoretisch reicht ein Genomäquivalent zur Durchführung der PCR. Praktisch liegt die Nachweisgrenze bei 5 bis 100 Erregern. Diese Empfindlichkeit kann mit Anzuchtverfahren nicht erreicht werden. Außerdem unterscheidet die PCR nicht zwischen kompletten, vermehrungsfähigen Viren und deren DNA oder RNA, die frei in der Probe vorliegen kann (22).

1.3.6. RT-PCR

Hierbei wird vor der eigentlichen PCR-Reaktion die genomische RNA des Erregers mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* und eines *Primers*, der in Richtung des 3' Endes (downstream) synthetisiert, in cDNA umgeschrieben.

Für die PCR benötigt man als Starthilfe Oligonucleotidprimer. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden dieser definierten Zielsequenz der DNA-Matrize sind. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Anwesenheit von dNTPs die Primer. Entlang der durch Hitze denaturierten DNA-Matrize werden dadurch neue DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Die DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Um die Synthese zu wiederholen, muss man die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufschmelzen und nach Abkühlung der Mischung die Primer wieder binden lassen. Bei ihrem Temperaturoptimum von 60 – 70° C verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Nach 30 PCR-Zyklen hat sich die gesuchte DNA auf das ca. 10^5 fache vermehrt (41).

1.3.7. Nested-PCR

Bei der nested PCR wird der ersten PCR eine zweite PCR nachgeschaltet. Bei dieser zweiten PCR liegen die Primer innerhalb der ersten Zielsequenz. Durch die nested PCR wird zum einen die Sensitivität gesteigert, zum anderen ist die nested PCR eine Methode der Spezifitätserhöhung. Der Nachweis der vervielfältigten DNA-Moleküle mit definierter Länge erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung in der Gelelektrophorese.

1.3.8. Zellkultur

Ein quantitativer Nachweis von aktiven (pathogenen) Viren ist durch die Zellkultur möglich, welches jedoch ein aufwendiges Verfahren darstellt. Die Anzucht auf Zellkulturen ist jedoch notwendig, da Viren im Gegensatz zu Bakterien ohne Wirt nicht vermehrungsfähig sind. Man verwendet verschiedene Wirtszelltypen, da es keinen universellen Zelltyp für die verschiedensten Viren

gibt. Bei einer Infektion der Zellen durch die enthaltenen Viren kommt es zu morphologischen Veränderungen, die man als cytopathogenen Effekt bezeichnet, welchen man dann zur Quantifizierung heranziehen kann (35).

Je nach Aufgabenstellung ist die geeignete Zellkultur zu finden, die je nach Virustyp unterschiedliche Sensitivität zeigen. Für den Nachweis von Enteroviren sind die Zelllinien BGM (Buffalo Green Monkey) (10) und MA-104 (Foetal Rhesus Kidney Cells) besonders geeignet. Die Zellen werden kryokonserviert in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert, um Verluste durch Kontamination, genetische Veränderungen in dauerhaften Zelllinien, sowie Alterung und Transformation von Zelllinien vorzubeugen. Als Schutzsubstanz dient Dimethylsulfoxid (DMSO). Sie verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen, sowie partielle Dehydratation des Cytoplasmas, indem sie das Zellwasser ersetzt und bindet.

1.3.9. MPN-Verfahren (most probable number)

Das MPN-Verfahren ist ein semiquantitatives Verfahren, zur Berechnung der Konzentration eines vermehrungsfähigen Virus in einer Zellkultur. Hier wird anhand von parallelen Verdünnungsreihen (in dieser Arbeit fünf) die minimale Virusmenge bestimmt, die noch einen cytopathogenen Effekt verursacht. Der Endpunkt wird anhand eines statistischen Verfahrens als MPN und nicht als Titer angegeben. Außerdem wird nicht die Zahl der Viren, sondern die Zahl der infektiösen Einheiten bestimmt, die je nach Art 10 bis 1000 Viren umfassen können (35).

1.3.10. Plaque-Assay

Dies ist ein weiteres Verfahren für den quantitativen Nachweis von Viren in adhären (haften an der Oberfläche einer Zellkulturflasche) Zelllinien. Die Zellen werden mit Filtereluat beimpft und die Konzentration der verimpften Viren wird anhand der gebildeten Plaques ermittelt.

1.4. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Wasserproben einer kommunalen Membranbelebungsanlage hinsichtlich der Eliminationsleistung bezüglich Bakterien und Viren. Es wurden jeweils je 10 Wasserproben aus dem Zu- und Ablauf der Kläranlage entnommen.

Obwohl Viren einen wesentlich kleineren Durchmesser als die verwendete Porengröße des Membranfilters haben, ist dennoch von einer Reduktion auszugehen aufgrund adsorptiver Wechselwirkungen zwischen Viren und den elektrostatischen Ladungsüberschüssen der Filteroberfläche, was in einer Studie in Japan bestätigt wurde, bei der bei einer Porengröße des Membranfilters von 0,1 µm eine Reduktion an Polio- und Noroviren von mehr als 4-log-Stufen erreicht wurde (49).

Die Auswahl der Bakterien beinhaltete fäkal- und gesamtcoliforme Bakterien, sowie Enterokokken.

Zum Nachweis von enteropathogenen Viren erfolgte für die Entero-, Rota-, Adeno- und Noroviren eine Untersuchung mittels PCR und für den Nachweis von Enteroviren wurde des Weiteren noch ein Plaquetest auf BGM-Zellen aus den Wasserkonzentraten durchgeführt. Ein quantitativer Virennachweis für Adenoviren wurde auf A 549 – Zellen (humane epidermale Karzinomzellen eines 58 jährigen kaukasischen Mannes) angeschlossen.

2. Material

2.1. Wasserproben

2.1.1. Kläranlage Schramberg-Waldmössingen

Die beprobte Anlage liegt in Schramberg-Waldmössingen und ist die erste Kläranlage in Baden-Württemberg mit Membrantechnologie. Die Anlage wurde 2003 erbaut, am 05.05.2004 in Probebetrieb genommen und am 08.06.2004 offiziell eingeweiht. Die folgenden Angaben sind der Broschüre der Stadtwerke Schramberg entnommen (54).

Das Besondere am Standort Waldmössingen ist, dass das geklärte Abwasser direkt in den dort befindlichen Heimbach gelangt, der vor allem im Sommer nur sehr wenig Wasser führt. Dadurch ist sein Ökosystem durch vermehrte Einleitung von Kläranlagenabwasser gefährdet. Eine konstante Wasserführung, wie es für eine „herkömmliche“ Kläranlage zur Bedienung des Vorfluters nötig ist, ist hier nicht gewährleistet. Des Weiteren fließt das Wasser aus der Kläranlage in einen Teich neben einem Tiergehege. Am Standort Waldmössingen waren die Kosten für eine Membrananlage niedriger als der Anschluss an ein umliegendes Klärwerk, außerdem kam eine konventionelle Anlage aus oben genannten Gründen nicht in Frage, so dass man sich aus ökonomischen und ökologischen Gründen für den Bau einer Membranbelebungsanlage entschloss. Vor allem der Heimbach hat hierdurch enorm an Gewässerqualität und -quantität gewonnen.

Auch der hohe Automatisierungsgrad der Anlage ist hier von Vorteil, da er die Möglichkeit der Fernüberwachung und -wartung bietet, was wiederum in der Kostenrechnung berücksichtigt werden muss, sogar eine teilweise Steuerung ist so möglich.

Technische Daten:

Kapazität: 2600 EW

Abwassermenge bei Trockenwetter: 15 l / s

Abwassermenge bei Regenwetter bis zu: 25 l / s

In der Anlage sind 10 Hohlfasermembranpakete verbaut und in das Belebtschlammbecken getaucht. Jedes dieser Module ist 1,7 x 0,6 x 2 m groß, die Porengröße der Hohlfasern des Membranfilters beträgt 0,04 µm.

Die Gesamtoberfläche entspricht mit rund 4400 qm etwa einem halben Fußballplatz. An die Module sind 2 Permeatpumpen angeschlossen, die das Abwasser durch die Membranen aus dem Belebungsbecken saugen. Des Weiteren werden sie zur Reinigung und Spülung der Membranen benutzt, hierzu wird Wasser durch die Membranen ins Belebungsbecken gedrückt.

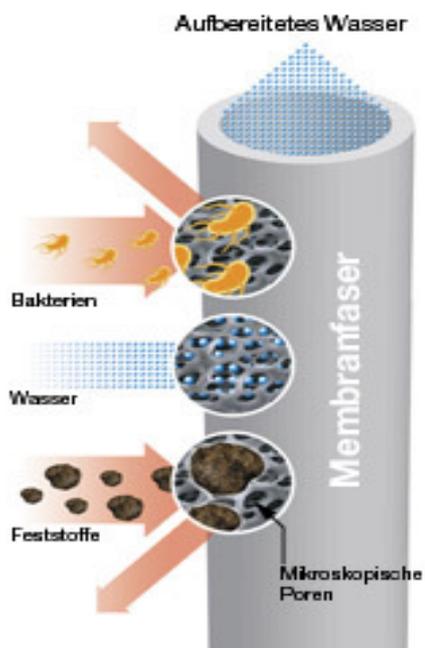
Unterhalb der Membranen wird Luft eingeblasen, der so genannte Cross Flow, um die Membranen in Bewegung zu halten und so den Schlamm abzuscheiden. Die aufsteigenden Blasen haben einen Reinigungseffekt, da sie unzählige kleine Wirbel erzeugen, wodurch ein Querstrom innerhalb der Faserbündel induziert wird. Dadurch wird der Energieverbrauch durch den Lufteintrag vermindert (3).

Die mechanische Vorreinigung erfolgt mittels einer Kompaktanlage Rechen/Sandfang und zwei nachgeschalteten Trommelsieben. Des Weiteren besteht die Anlage noch aus einem Denitrifikationsbecken, welches sich vor dem Nitrifikationsbecken, also dem Belebtschlammbecken befindet.

Abbildung 1: Membranmodul der Kläranlage Schramberg-Waldmössingen
Foto: Stadtwerke Schramberg (60)



Abbildung 2: Aufbau einer Hohlfaser des Membranmoduls
Abb.: Firma Zenon (62)



2.1.2. Probennahme in der Kläranlage

Da für Kläranlagen dieser Größenordnung in Baden-Württemberg keine automatischen Probenahmegeräte gefordert sind, erfolgte die in Form von Stichproben (38) im Zulauf der Anlage als Rohabwasser und im Ablauf am Zufluss zum Heimbach.

Die Proben wurden im Zulauf in einem 5 l Kanister (zuvor autoklaviert), im Ablauf in einem 10 l Kanister (ebenfalls zuvor autoklaviert) gesammelt und bis zur Abholung bei 4 °C gekühlt und jeweils abends in Kühlboxen mit Kühlaggregaten transportiert und am folgenden Morgen in Stuttgart weiterverarbeitet. Es wurden pro Tag jeweils zwei Zulauf- und zwei Ablaufproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die genauen Zuordnungen können Tabelle 24 im Anhang entnommen werden.

2.2. Allgemein verwendete Lösungen

HCl (konz.)	32 %	Merck
HCl	1 M	Merck
NaOH	10 M	Merck
NaOH	1 M	Merck
Phys. NaCl	0,9 %	Merck
VE-Reinstwasser		

2.3. Geräte

Analysenwaage	PL 300	Mettler GmbH
Autoklav	SLP 800	Memmert GmbH
Autoklav		KSG
		Sterilisatoren GmbH
Brutschrank		Heraeus Instruments
CO ₂ -Brutschrank		Heraeus Instruments
Dampftopf		Gössner GmbH
Druckbehälter		Sartorius
Eismaschine	AF-1D	Scotsman
Elektronikrührer		IKA Labortechnik
Gefrierschrank, -70 °C	HFU 486 Top	Heraeus Kendro
Geldokumentationssystem		LTF Labortechnik
Gelelektrophoresekammer	GNA 100	Pharmacia Biotech
Hybridisierungsöfen	400 HY-E	Bachhofer
		Laboratoriumsgeräte
Inverses Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Kühlschrank 4 °C		Liebherr
Kühlzentrifuge	Rotixa / RP	Hettich
Magnetrührer (beheizbar)	MIDI MR 1 digital	IKA Labortechnik
pH-Meter	pH/Cond Level 3	Inolab GmbH
Pipettierhilfe	„Pipetboy“	Tecnomara
Sterilbank	LaminAir®	Holten
Thermo Cycler GeneAmp	PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermo Cycler GeneAmp	PCR System 2700	Applied Biosystems
Thermo Cycler GeneAmp	PCR System 9700	Applied Biosystems
Vortex	Genie 2™	Bender-Hobein
Wasserbad	GFL 1083	GFL
Zentrifuge	XR 25	Heraeus

2.4. Sonstige Laborausstattung

- Absaugflaschen
- Aluminiumfolie
- Bunsenbrenner
- Druckbehälter Sartorius / Millipore
- Druckgasflasche (200 bar)
- Druckschläuche mit Schnellkupplungen
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Einwegröhrchen (Falcon); (15 ml, 50 ml)
- Eppendorf Pipetten (200-1000 µl, 100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl)
- Filtereinheit (Sartorius Minisart 0,8 µm)
- Filtereinheiten (Millipore, Millex-GV 0,22 µm, Millex-GS 0,45 µm)
- gestopfte Glaspipetten (10 ml, 5 ml, 2 ml)
- Glaswaren (Reagenzgläser, Bechergläser, Eppendorfgefäße versch. Größen,...), steril
- Glaswolle (Orgel / Rantigny, France)
- Kühlboxen für Transport mit Kühlaggregaten
- Kulturflaschen
- Mehrkanal (8er) -Pipetten für 200 µl
- Membranfilter steril, 0,45 µm
- Mikrotiterplatten
- Perspexsäulen mit einem Durchmesser von ca. 40 mm mit verschraubbaren Endkappen und Schlaucholiven
- Petrischalen, steril
- Pinzetten, steril
- Pipettenspitzen steril, (teilweise gestopft, Safeseal); (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Plastikschläuche
- Probengefäße, Einmalartikel nukleasefrei (Eppendorf)
- Quarzglasflaschen 5 l und 10 l
- Rührfische

- SafeLock-Gefäße, Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml)
- Schliffstopfen
- Spritzen (Einweg), (5 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml)
- Ständer für Reagenzröhrchen
- Stative mit Stativklammern
- Thermopapier (LTF)
- Transportgefäße Plastik 1000 ml, 750 ml (Beckman)
- Transportgefäße, Plastikkanister 5 l und 10 l mit Deckel
- UV-Lampe 366 nm
- well-Platten (6, 24, 96)
- Zentrifugenbecher

2.5. Lösungen und Puffer für die Aufkonzentrierung der enteropathogenen Viren mittels Glaswollefiltration:

2.5.1. Elutionspuffer

Magermilchpulver (skimmed milk)	1 g	Oxoid
Glycin	3,75 g	Serva

- in 1000 ml VE-Wasser vollständig lösen
- im Dampftopf 5 - 10 Min kochen
- abkühlen lassen (Raumtemperatur)
- pH $9,5 \pm 0,1$ einstellen

2.5.2. Aluminiumchloridlösung (1 M)

AlCl_3	33,4g	Merck
-----------------	-------	-------

- in 250 ml VE-Wasser lösen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren

2.5.3. di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (0,15 M)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{x} \cdot 12 \text{ H}_2\text{O})$	26,7 g	Merck
---	--------	-------

- in 1 l VE-Wasser lösen
- pH $7,4 \pm 0,1$ einstellen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren

2.5.4. Laurylsulfat-Bouillon mit MUG (LS-MUG)

Tryptose	20 g
Lactose	5 g
Natriumchlorid	5 g
Natriumlaruylsulfat	0,1 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,75 g
Kaliumhydrogenphosphat	2,75 g
L-Tryptophan	1 g

- in 1 l VE-Wasser unter Erhitzen lösen
- pH $6,8 \pm 0,1$ einstellen
- danach Zugabe von:

4-Methylumbelliferyl- β -

D-glucuronid (MUG) 0,1 g

- in Teilmengen von 10 ml in Reagenzgläser mit DURHAM-Röhrchen abgefüllt
- 15 Min bei 121 °C autoklaviert
- die Gärröhrchen dürfen nun keine Luftblasen mehr enthalten

2.6. Lösungen und Medien für den Nachweis von Enterokokken mittels Membranfiltration

2.6.1. Slanetz und Bartley Agar; Grundmedium

Tryptose	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glukose	2,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	4,0 g
Natriumazid (NaN ₃)	0,4 g
Agar	8 g bis 18 g
Wasser	1 000 ml

- in kochendem Wasser lösen
- nach vollständigem Lösen, Hitze noch weitere 5 Min zuführen
- auf 50 °C bis 60 °C abkühlen

2.6.2. TTC-Lösung

2,3,5- Triphenyltetrazoliumchlorid	1 g
Wasser	100 ml

- Indikator in Wasser unter Rühren lösen
- durch Membranfiltration (0,2 µm) steril filtrieren
- Lösung gegen Lichteinwirkung schützen, bei rosa Verfärbung verwerfen.

2.6.3. Slanetz und Bartley Agar; vollständiges Medium

Grundmedium	1 000 ml
TTC-Lösung	10 ml

- TTC-Lösung dem auf 50 °C bis 60 °C abgekühlten Grundmedium zufügen
- pH-Wert mit Natriumcarbonatlösung (100 g / l), Natriumhydroxidlösung (40 g / l) oder Salzsäurelösung (36,5 g / l) auf $7,2 \pm 0,1$ bei 25 °C einstellen
- je 20 ml in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser gießen und auf einer waagerechten Oberfläche abkühlen lassen

2.6.4. Galle-Äsculin-Azid Agar

Trypton	17,0 g
Pepton	3,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Ochsengalle, dehydriert	10,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Äsculin	1,0 g
Ammoniumeisen(III)citrat	0,5 g
Natriumazid (NaN ₃)	0,15 g
Agar	8 g
Wasser	1 000 ml

- durch Kochen lösen
- pH-Wert auf $7,1 \pm 0,1$ bei 25 °C einstellen (Wert nach dem Sterilisieren)
- 15 Min bei $121 \pm 3\text{ °C}$ sterilisieren
- auf 50 °C bis 60 °C abkühlen lassen
- in Petrischalen mit einer Dicke von 3 - 5 mm gießen und auf einer waagerechten Oberfläche abkühlen lassen

2.7. Lösungen und Medien zum Nachweis von Enterokokken mittels miniaturisiertem MPN-Verfahrens

Testkit Firma BIO-RAD MUD / SF, Verfahren Nr. 53783; 53786

2.8. Lösungen und Medien für die DNA/RNA-Isolierung mittels Silicaextraktion

0,2 M EDTA (Na-Salz)	Merck
Aceton	Merck
Diethyl Pyrocarbonat (DEP)	Fluka
Ethanol (absolut)	Merck
Guanidinthiocyanat	Fluka
HCl 25 %	Merck
10 N NaOH	Merck
nucleasefreies Wasser	Promega
Proteinase K	Roche
rRNasin (RNase-Inhibitor)	Promega
SiO ₂ -Partikel (0,5-10 µm Ø)	Sigma
TrisHCl	Merck
Triton X-100	Sigma

2.8.1. Silica-Matrix

- 60 g SiO₂-Partikel (0,5-10 µm Ø) in einem Glaszylinder in einem Endvolumen von 500 ml DEP-Wasser (siehe unten) suspendieren und mischen
- Sedimentation für 24 h, absaugen von 430 ml des Überstands, erneut mit DEP-Wasser auf 500 ml auffüllen, resuspendieren
- Sedimentation für 5 h, absaugen von 440 ml des Überstands
- Zugabe von 600 µl HCl 25 % (pH auf 2 einstellen)

Die fertige Silica-Matrix wird in 2 ml SafeLock-Gefäße zu je 1 ml abgefüllt und autoklaviert (15 Min bei 121 °C und 1 bar).

Die portionierte Silica-Matrix wird im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

2.8.2. DEP-Wasser

Herstellung einer 10%igen DEP-Stammlösung mit Ethanol (absolut)

100 ml DEP + 900 ml Ethanol

Diese Stammlösung wird in einer braunen Glasflasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Herstellung der Gebrauchslösung (0,1%)

990 ml H₂O_{bidest.} (steril) + 10 ml 10%ige DEP-Stammlösung.

Die Schraubdeckel werden 2 h bei 37 °C in das DEP-Gebrauchswasser eingelegt und anschließend autoklaviert (30 Min bei 120 °C).

Herstellung der Gebrauchslösung (0,1%)

990 ml H₂O_{bidest.} (steril) + 10 ml 10%ige DEP-Stammlösung.

Das Gebrauchswasser wird für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert (30 Min bei 120 °C).

Das DEP-Gebrauchswasser wird in Glasgefäßen bei 4 °C gelagert.

0,1 M TrisHCl (pH 6,4)

TrisHCl	12,1 g
DEP-Gebrauchswasser	800 ml

- lösen
- pH auf 6,4 mit HCl 25 % einstellen, pH-Kontrolle mit pH-Papier
- anschließend mit DEP-Gebrauchswasser auf 1000 ml auffüllen und den pH nochmals überprüfen

Die fertige Lösung wird in "gebackenen" (bei 200 °C für 4 h „gebackene“) Glasflaschen bei 4 °C aufbewahrt.

Die Deckel werden, wie oben beschrieben, mit DEP-Wasser behandelt und autoklaviert.

2.8.3. Lysispuffer (LP)

Guanidinthiocyanat	120 g
0,2 M EDTA (pH 8,0)	22 ml
Triton X-100	2,6 g
0,1 M TrisHCl (pH 6,4)	100 ml

- im Wasserbad bei 56 °C lösen und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahren

Der Puffer wird in "gebackenen" Glasgefäßen angesetzt und in nukleasefreie 50 ml-Falkongefäße, die mit Aluminiumfolie umwickelt sind, umgefüllt und kann so 3 Wochen gelagert werden.

2.8.4. Waschpuffer (WP)

Guanidinthiocyanat	120 g
0,1 M TrisHCl (pH 6,4)	100 ml

- im Wasserbad bei 56 °C lösen und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahren

Der Puffer wird in "gebackenen" Glasgefäßen angesetzt und in nukleasefreie 50 ml Falkongefäße, die mit Aluminiumfolie umwickelt sind, umgefüllt und kann so auch 3 Wochen gelagert werden.

10 N NaOH

400 g NaOH Plätzchen werden in 1 l H₂O_{bidest.} gelöst.

Die Lösung muss im Eisbad angesetzt werden (exotherme Reaktion).

70%ige Ethanolösung

35 ml Ethanol absolut werden mit 15 ml DEP-Gebrauchswasser gemischt und in nucleasefreien 50 ml Falkongefäßen bei Raumtemperatur gelagert.

2.9. Lösungen und Medien für den Nachweis von Rotaviren mittels PCR

rTth Polymerase	Applied Biosystems
Go-Taq Polymerase	Promega
incl. 5x-Puffer, MgCl ₂ (25 mM)	
nucleasefreies Wasser	Promega
dNTPs (Ultrapure dNTP-Set)	Amersham Pharmacia Biotech
RNasin	Promega

Rotavirus-Primer: (Sequenz aus (38))

Die Primer werden von der Firma Roth synthetisiert:

R1: (sense): 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3'

R2: (antisense): 5'-GATCCTGTTGGCCATCC-3'

R3: (sense): 5'-GTATGGTATTGAATATAACCAC-3'

Die Primer R1 und R2 amplifizieren ein 392 Basenpaare großes DNA-Fragment. Die Primer der seminested PCR R3 und R2 amplifizieren ein 342 Basenpaare großes DNA-Fragment.

Primer: Die Primer wurden lyophilisiert von der Firma Roth geliefert. Eine Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser eine Gebrauchslösung 25 pmol / µl hergestellt.

dNTPs: Vom Hersteller wurden die einzelnen dNTPs als Stammlösungen (100 mM) geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Gebrauchslösung (1,25 mM je dNTP) hergestellt.

2.10. Lösungen und Medien für den Nachweis von Adenoviren mittels PCR

Taq Polymerase	Promega
incl. 10x-Puffer, MgCl ₂ (25 mM)	
Nucleasefreies Wasser	Promega
dNTPs (Ultrapure dNTP-Set)	Amersham Pharmacia Biotech

Adenoviren-Primer: (Sequenz aus (2))

Hex AA 1885 (sense): 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'

Hex AA 1913 (antisense): 5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'

NeHex 1893 (sense): 5'-GCCACCGAGACGTACTIONTCAGCCTG-3'

NeHex 1905 (antisense): 5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'

Die Primer Hex AA 1885 und Hex AA 1913 amplifizieren ein 300 Basenpaare großes DNA-Fragment. Die Primer der nested-PCR NeHex 1893 und NeHex 1905 amplifizieren ein 142 Basenpaare großes DNA-Fragment.

Primer: Die Primer wurden lyophilisiert geliefert. Eine Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser eine Gebrauchslösung 10 pmol/μl hergestellt.

dNTPs: Vom Hersteller wurden die einzelnen dNTPs als Stammlösungen (100 mM) geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Gebrauchslösung (1,25 mM je dNTP) hergestellt.

2.11. Lösungen und Medien zum Nachweis von Noroviren mittels PCR

1. stand c-DNA Synthese Kit für PCR (AMV)	Roche
AMV (einzeln)	Roche
Go-Taq Polymerase	Promega
incl. 5x-Puffer, MgCl ₂ (25mM)	
Nucleasefreies Wasser	Promega
dNTPs (Ultrapure dNTP-Set)	Amersham Pharmacia Biotech
RNasin	Promega

Norovirus-Primer: (Sequenz aus (43))

Die Primer werden von der Firma Roth synthetisiert:

NV 1a (sense): 5'-ATGAATATGAATGAAGATGG-3'

NV 1b (sense): 5'-ATGAACACAATAGARGATGG-3'

NV 7 (antisense): 5'-ATTGGTCCTTCTGTTTTGTC-3'

NV 4 (antisense): 5'-GTTGACACAATCTCATCATC-3'

NV 4b (antisense): 5'-ACAATYTCATCATCICCAT-3'

NV 6 (sense): 5'-TACCACTATGATGCAGATTA-3'

NV 6b (sense): 5'-TATCACTATGATGCTGACTA-3'

Die Primer NV 1a, NV 1b und NV 7 amplifizieren ein 482 Basenpaare großes DNA-Fragment. Die Primer der nested PCR NV 4, NV 4b und NV 6, NV 6b amplifizieren ein 338 Basenpaare großes DNA-Fragment.

Primer: Die Primer wurden lyophilisiert von der Firma Roth geliefert. Eine Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser hergestellt. Aus

dieser Stammlösung wurde durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser eine Gebrauchslösung (30 pmol / μ l Umschreibung mit AMV, 5 pmol / μ l PCR-Ansatz) hergestellt.

dNTPs: Vom Hersteller wurden die einzelnen dNTPs als Stammlösungen (100 mM) geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Gebrauchslösung (1,25 mM je dNTP) hergestellt.

2.12. Medien und Lösungen für den Nachweis von Enteroviren mittels PCR

rTth Polymerase	Applied Biosystems
Go-Taq Polymerase	Promega
incl. 5x-Puffer, MgCl ₂ (25 mM)	
Nukleasefreies Wasser	Promega
dNTPs (Ultrapure dNTP-Set)	Amersham Pharmacia Biotech
RNasin	Promega

Enterovirus-Primer: (Sequenz aus (32))

Die Primer werden von der Firma Roth synthetisiert:

P1: (sense): 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCGG-3'

P3: (antisense): 5'-CACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTC-3'

P2: (antisense): 5'-GTTGGGATTAGCCGCATTCAGG3'

Die Primer P1 und P3 amplifizieren ein 396 Basenpaare großes DNA-Fragment. Die Primer der seminested PCR P1 und P2 amplifizieren ein 313 Basenpaare großes DNA-Fragment.

Primer: Die Primer werden lyophilisiert von der Firma Roth geliefert. Eine Stammlösung wird durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser hergestellt. Aus dieser Stammlösung wird durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser eine Gebrauchslösung 10 pmol / µl hergestellt.

dNTPs: Vom Hersteller werden die einzelnen dNTPs als Stammlösungen (100mM) geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wird eine Gebrauchslösung (1,25 mM je dNTP) hergestellt.

2.13. Lösungen und Medien für die Gelelektrophorese

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Borsäure	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Merck
Ethidiumbromid (1%ige Lösung)	Merck
Ficoll (MW 400000)	Pharmacia
Bromphenolblau	Sigma
100 Base-Pair Ladder	Pharmacia
Agarose NA	Peqlab
H ₂ O _{bidest.}	
Nukleasefreies Wasser	Promega

Ethidiumbromidlösung (0,1%)

Die Ethidiumbromidlösung (1 %) wird 1:10 mit H₂O_{bidest.} verdünnt

2.13.1. Agarosegel (1,5%)

0,75 g Agarose wurden mit 50 ml 1 x TBE-Puffer gemischt und unter Rühren aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung (0,1 %) zugegeben (entspricht 0,2 µg Ethidiumbromid in 1 ml Gel) und das Gel anschließend in den vorbereiteten Gelträger mit entsprechenden Kämmen für die Geltaschen gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Kämmen herausgenommen und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

2.13.2. 5 x TBE-Puffer (1 l Stammlösung)

Tris	53,9 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml

- in H₂O_{bidest.} lösen und mit H₂O_{bidest.} auf 1 l auffüllen

1 x TBE (Laufpuffer für Elektrophorese und für die Gelherstellung)

5 TBE-Puffer 1:5 mit H₂O_{bidest.} verdünnen

2.13.3. Ladepuffer

Für 20 ml Ladepuffer wurden 4 g Ficoll und 0,05 g Bromphenolblau in ca. 12 ml H₂O_{bidest.} unter Rühren gelöst und mit H₂O_{bidest.} auf 20 ml aufgefüllt.

100 Base-Pair Ladder

Die käufliche Stammlösung wurde 1:8 mit nucleasefreiem Wasser verdünnt

2.14. Lösungen und Medien für den quantitativen Nachweis von Viren in Zellkultur mittels Plaque-Assay

PBS

- phosphate buffered saline, pH 7,4

2.14.1. Agar (1 %)

- 1 g Difco-Bacto-Agar in 100 ml aqua dest., autoklavieren
- Vor dem Versuch den Agar aufkochen und auf 45 °C abkühlen lassen.

Färbelösung

- 0,4 % Kristallviolett in 4 % Formalin lösen

Neutralisationslösung

- Natriumhypochlorit 12 %

2.14.2. Erhaltungs- bzw. Wachstumsmedium

1-fach konzentriertes Medium MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle`s Salzen, L-Glutamin, Natriumbicarbonat und 8% FKS (Fötales Kälberserum)

2.14.3. Overlay-Medium

Die Angaben beziehen sich auf 100 ml Medium (ohne zugegebenen Agar)

2-fach konzentriertes Medium MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle`s Salzen, L-Glutamin, Natriumbicarbonat

FKS	4 ml
Hepes (23,86 g / 100 ml a.d., pH 7,4, sterilfiltriert)	2 ml
Magnesiumchlorid (10 %)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (105 Einheiten / 0,1 g pro 1 ml)	0,2 ml
NEAA (für BGM-Zellen)	2 ml

2.15. Software

Betriebssystem:

- Windows XP Home Edition

Textverarbeitung:

- Microsoft® Word 2002

Tabellenkalkulation:

- Microsoft® Excel 2002

3. Methoden

3.1. Untersuchungsablauf der Aufkonzentrierung der enteropathogenen Viren mittels Glaswollefiltration

Die Filtration des Abwassers wurde nach einem Adsorptions-Elutionsverfahrens mittels Glaswolle durchgeführt (22),(21).

Die mittlere Wiederfindungsrate von Enteroviren (Polio I-III, SABIN), liegt bei ca. 50 - 60%, die Nachweisgrenze bei ca. 10^2 Viruspartikeln pro 10 l.

Als Probevolumen wurde in Anlehnung an die EU-Badegewässerrichtlinie (17) 5 l im Zulauf und 10 l im Ablauf gewählt.

Problem dieser Methode ist, dass bei stark verschmutztem Wasser der Filter verstopfen kann und somit eine Filtration nicht mehr möglich ist. In diesen Fällen muss das Probevolumen verringert und entsprechend verdünnt werden.

3.1.1. Vorbereitung der Säulen

Zuerst wurden Perspex-Säulen mit ca. 10 g Glaswolle gestopft. Am unteren Teil der Säulen wurden nun die Schraubkappen mit je einem Ablaufschlauch befestigt und das Ganze in einem Stativ verschraubt. An den Ablaufschläuchen befanden sich regulierbare Klemmen, mit der der Durchlauf gesteuert werden konnte.

Nun mussten die Säulen konditioniert werden. Hierzu gab man zuerst 40 ml 1 N HCl auf die Säule und anschließend erfolgte ein Spüldurchlauf mit 100 ml VE-Reinstwasser.

Es folgte ein weiterer Waschvorgang mit 40 ml 1 N NaOH und erneut ein Spüldurchlauf mit 100 ml VE-Reinstwasser. Die Säulen durften nun nicht mehr trocken fallen.

3.1.2. Vorbereitung der Wasserproben

Die jeweiligen Zu- und Ablaufproben wurden in große Glasflaschen gegeben, auf einen Magnetrührer gestellt und jeweils 1 ml / 2 l Wasserprobe 1 M AlCl_3 – Lösung zugegeben. Eine Trübung zeigte nun das ausgefallene Al(OH) an.

Weiterhin musste nun der pH durch Zugabe von HCl konz. auf 3,3 - 3,5 \pm 0,1 eingestellt werden, wodurch die Trübung wieder verschwand. Die Viren waren so an Aluminiumhydroxid gebunden.

Die so vorbereiteten Proben kippte man nun in Drucktöpfe um und die vorbereiteten Säulen wurden mit Hilfe von Druckschläuchen und Schnellkupplungen mit dem Drucktopf verbunden.

Der Druck wurde mittels einer Druckgasflasche aufgebaut und auf 1 - 2 bar eingestellt. Die Durchflussfiltrationsgeschwindigkeit sollte ca. 10 - 50 l / h betragen, was etwa einem bleistifttickem Strahl in den Säulen entsprach.

3.1.3. Elution der Säulen und weitere Aufbereitung der Proben

Im Anschluss an die Filtration wurde nun mit dem zuvor hergestellten Elutionspuffer eluiert und das Eluat in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen. Der Elutionspuffer sollte die Säulen langsam passieren, damit die an die Oberfläche der Glaswolle gebundenen Viren auch gelöst werden konnten. Mit Hilfe von Druckluft wurde auch noch der letzte in der Säule verbliebene Rest an Puffer ausgepresst. Die Eluate wurden anschließend unter Rühren auf einen pH von 4,5 \pm 0,1 eingestellt und danach für mind. 1 h bei 4 °C kühl gestellt. Das hierbei ausgefallene Casein band wiederum die Viren und erlaubte eine erneute Volumenreduktion. Diese wurde durch Zentrifugation für 30 Min bei 4000 – 4500 x g und Abkippen des klaren Überstandes erreicht.

Zu den erhaltenen Pellets gab man 10 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - Puffer und wurden über Nacht bei 4 °C resuspendiert.

Am nächsten Tag filtrierte man die resuspendierten Pellets dann unter der Sterilbank erst mit 0,8 µm und anschließend mit 0,45 µm Sartorius Minisart Filtereinheiten steril. Danach wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

Abbildung 3: Aufbau zur Glaswollefiltration

Foto: mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Fleischer, LGA Stuttgart



3.2. Nachweis von gesamt- und fäkalcoliformen Bakterien

Der Nachweis von gesamt- und fäkalcoliformen Bakterien wurde mittels eines fluoreszenzoptischen Testverfahrens über die Spaltung von 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid bestimmt (50). Es wurde MUG-Laurylsulfat-Bouillon verwendet.

- **Untere Messbereichsgrenze:** 30 MPN / 100 ml
- **Obere Messbereichsgrenze:** 11.000 MPN / 100 ml

Die gewonnenen Ergebnisse wurden als Kennziffer erfasst und mit Hilfe der Auswerte-Tabelle (MPN-Tabelle, siehe im Anhang) umgerechnet.

Pro Probe wurden drei Röhrrchen pro Verdünnungsstufe beimpft.

Eingesetzte Verdünnungen: konzentrierte Probe, 10^{-1} , 10^{-2}

Die Anzahl der positiven Röhrrchen aus den einzelnen Verdünnungsstufen wurden zur Kennziffer zusammengezählt. Als Positivkontrolle wurde der E.coli-Stamm DSM 1103 eingesetzt.

3.2.1. Kultur in LS – MUG - Bouillon

Jeweils 1 ml unverdünnte Probe wurde nun in drei Röhrrchen mit je 10 ml LS-MUG-Bouillon pipettiert. Genauso wurde mit den Verdünnungen (mit physiologischer Kochsalzlösung) verfahren.

Die Röhrrchen wurden dann bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ bebrütet.

3.2.2. Auswertung

Nach dieser Zeit wurden sie auf Gasbildung geprüft, welche durch das DURHAM-Röhrrchen erkannt wurde. Die Gasbildung wird als Zeichen des Laktoseabbaus angesehen. Den gaspositiven Röhrrchen wurden nun jeweils 0,5 ml 1 N NaOH-Lösung zugegeben und dann auf Fluoreszenz unter einer UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 366 nm geprüft. Eine hellblaue Fluoreszenz im gesamten Röhrrchen sprach für β -Glucuronidase-Aktivität durch fakultativ anaerobe Bakterien.

3.2.3. Identifizierung

fäkalcoliformen Bakterien (FC)

- Gasbildung durch Laktosespaltung
- β -D-Glucuronidase-Nachweis durch Spaltung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG)
- Auftreten von Fluoreszenz

gesamtcoliformen Bakterien (GC)

- nur Gasbildung durch Laktosespaltung

3.2.4. Ermittlung der Konzentration fäkalcoliformer und gesamtcoliformer Bakterien

Aus den positiven Röhren wurde die Kennziffer gebildet und anschließend aus der MPN-Tabelle im Anhang (Tabelle 23) die zur Kennziffer gehörige höchstwahrscheinliche Zahl (MPN) entnommen.

Angabe der Ergebnisse

- Fäkalcoliforme Bakterien: n / 100 ml (MPN)
- Gesamtcoliforme Bakterien: n / 100 ml (MPN)

3.3. Nachweis von Enterokokken mittels Membranfiltration

Intestinale Enterokokken sind Bakterien, die 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu Formazan reduzieren und Äsculin bei 44 °C auf bestimmten Medien hydrolysieren können. Mit dem oben genannten Verfahren können *Enterococcus faecialis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae* und gelegentlich weitere *Enterococcus*-Arten nachgewiesen und gezählt werden.

Bei Untersuchungen von Wasser können Enterokokken als Indikatoren für eine fäkale Verschmutzung betrachtet werden.

- Probenmenge: 100 ml im Zu- und Ablauf.
- Einheit: KBE
- Messbereich: untere Bestimmungsgrenze : 1 KBE pro 100 ml.

Zu Anfang der Untersuchungen wurden die ersten beiden Zu- und Ablaufproben auf 10^{-1} und 10^{-2} verdünnt, jedoch waren die Ausgangskonzentrationen an Enterokokken um ein Vielfaches höher, sodass die weiteren Proben bis auf 10^{-6} verdünnt wurden.

3.3.1. Durchführung des Enterokokkennachweises

Zuerst wurde die Wasserprobe durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, wodurch die Bakterien zurückgehalten wurden. Anschließend brachte man den Filter auf das feste Selektivmedium (Slanetz und Bartley Agar) auf, das Natriumazid (unterdrückt das Wachstum von gramnegativen Bakterien) und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, eine farblose Substanz, die durch intestinale Enterokokken zu rotem Formazan reduziert wird, enthielt. Die Platten wurden nun bei 36 ± 2 °C für 44 ± 4 h bebrütet.

Positive charakteristische Kolonien waren erhaben und hatten eine rötliche, bräunliche oder rosa Färbung, entweder nur im Zentrum der Kolonie oder durchgehend.

Fand man nun charakteristische Kolonien, so wurde der gesamte Filter mit allen Kolonien mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf Galle-Äsculin-Azid-Agar (auf 44 °C 1 h vorgewärmt) aufgebracht. Der Filter wurde hierbei nicht umgedreht. Intestinale Enterokokken hydrolysieren das Äsculin innerhalb von 2h bei 44 ± 0,5 °C. Danach mussten die Platten sofort abgelesen werden.

Das Endprodukt, 6,7-Dihydroxy-cumarin, verbindet sich mit Eisen(III)-Ionen zu einer gelbbraunen bis schwarzen Verbindung, die ins Medium diffundiert und dieses verfärbt. Die so verfärbten Kolonien wurden als positiv gezählt.

3.4. Nachweis von intestinalen Enterokokken mittels miniaturisiertem MPN-Verfahren (MUD-Verfahren)

Der Nachweis von intestinalen Enterokokken wurde ab Wasserprobe Nr. 5 (siehe Tabelle 24 im Anhang) mittels eines miniaturisiertem MPN-Verfahrens (MUD-Verfahren) auf Mikrotiterplatten durchgeführt, da die gefundenen Konzentrationen an Enterokokken der vorigen Proben sehr hoch waren und sich das miniaturisierte MPN-Verfahren hierfür als geeigneteres Verfahren anbot. Das Verfahren ist nach DIN EN ISO 7899-1 standardisiert (11).

Enterokokken, auch Fäkalstreptokokken genannt, sind Mikroorganismen, die aerob bei 44 °C wachsen und 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucosid (MUD) in Anwesenheit von Thalliumacetat, Nalidixinsäure und 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (TTG) in dem angegebenen Flüssigmedium hydrolysieren.

- Einheit: MPN / 100 ml
- Messbereich: 15 - 3,5 x 10⁴ MPN / 100 ml

Die verdünnten Proben wurden in eine Reihe Mikrotiterplatten-Vertiefungen eingepflegt, welche getrocknetes Kulturmedium enthielten. Unter UV-Licht bei 366 nm konnte im positiven Fall dann nach einer Inkubationszeit von 36 – 72 h bei $44 \pm 0,5$ °C eine blaue Fluoreszenz erkannt werden, welche aus einer Hydrolyse des MUD resultierte.

Als Positivkontrolle wurde der *E. faecalis*-Stamm DSM 2040 eingesetzt.

In einem Reagenzglasständer wurde für die gewählten Verdünnungen die erforderliche Anzahl von Röhrchen mit 9 ml des sterilen SMD (Verdünnungslösung) vorbereitet. Anschließend wurden mit einer sterilen Pipette die Verdünnungsreihen angefertigt.

Verwendete Verdünnungen: 1:10 und 1:20.

Die Verdünnungen goss man dann jeweils in eine sterile Petrischale und mittels der Mehrkanalpipette wurden nun 200 µl pro Vertiefung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei wurden mit der ersten Verdünnung 64 Vertiefungen, mit der zweiten Verdünnung 32 Vertiefungen gefüllt.

Nach dem Befüllen der Mikrotiterplatte verschloss man diese mit der mitgelieferten Folie und inkubierte bei $44 \pm 0,5$ °C für mindestens 36 h bis max. 72 h.

Vertiefungen, die unter UV-Licht ($\lambda = 366$ nm) blau fluoreszierten, galten als positiv.

3.5. DNA/RNA Isolierung durch Silicaextraktion

Für den Nachweis von viraler DNA bzw. RNA wird bei der PCR das Enzym Taq-Polymerase verwendet, welches neue DNA-Stränge synthetisiert. Für diesen Vorgang ist es erforderlich die Umweltproben aufzukonzentrieren und zu reinigen. Mit Hilfe der Silicaextraktion kann DNA/RNA aus den Proben in einem stark chaotropen Puffer freigesetzt und dann fest an die Silicium-Partikel gebunden werden. Durch Waschstschritte werden Verunreinigungen entfernt.

Nach anschließender Elution mit einem „Niedrigsalz“-Puffer bzw. nukleasefreiem Wasser kann dann eine PCR-Reaktion durchgeführt werden (21).

In die Silicaextraktion wurde das mittels Glaswollfiltration aufkonzentrierte Wasser eingesetzt.

3.5.1. Durchführung der DNA/RNA-Isolierung

In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß (SafeLock) wurden 40 µl Silica-Matrix und 900 µl Lysispuffer (LP) sorgfältig vermischt.

Danach erfolgte die Zugabe der Probe

Eingesetzte Menge: 500 µl

- Vortexen
- 10 Min bei Raumtemperatur inkubieren (Gefäße liegend lagern = Oberflächenvergrößerung), währenddessen mehrmals mischen
- in der Kühlzentrifuge bei 4 °C für 15 sec 16.000 x g zentrifugieren (Silica-Partikel mit den gebundenen Nukleinsäuren befanden sich nun im Pellet).

Anschließend zog man den Überstand ab. Es folgten mehrere Waschstschritte: zweimal mit 1 ml Waschpuffer (WP) und zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol.

- Pellet gut resuspendieren und vortexen
- bei 4 °C für 15 sec mit 16.000 x g zentrifugieren
- Waschschrift mit 1 ml Aceton.
- bei 4 °C für 3 Min mit 16.000 x g zentrifugieren

Dann zog man das Aceton ab und die Eppendorfgefäße wurden mit offenem Deckel im Brutschrank bei 56 °C für 15 Min getrocknet. Dem Trocknungsschritt folgte die Elution der RNA/DNA vom Silikamaterial mit nukleasefreiem Wasser.

- erneut vortexen und für 15 Min bei 56 °C inkubieren und wiederum mehrmals mischen
- bei 4 °C für 3 Min mit 16.000 x g zentrifugieren

Der Überstand wurde danach erneut abgezogen und das silikafreie Eluat in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Bevor das Eluat in die entsprechende PCR-Reaktion eingesetzt werden konnte, erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C für 3 Min mit 16.000 x g.

3.6. Nachweis von Rotaviren durch RT-PCR

Die Primersequenz für den Nachweis von Rotaviren mittels PCR wurde nach Le Guyader et al. (38) gewählt. Bei jedem PCR-Lauf wurden Positiv- und Negativ- kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen wurde eine Verdünnungsstufe (ca. 10^3 Viren) des ATCC-Stammes VR 2018 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet.

Probenvorbereitung

Die Isolierung erfolgte zuvor mittels Silicaextraktion.

Zuerst mussten die Doppelstränge der RNA vor dem Einsatz in die Reaktion getrennt werden. Hierzu wurden die Proben 5 Min gekocht und sofort auf Eis gestellt, kurz gemischt, zentrifugiert (4 °C) und wieder auf Eis gestellt

3.6.1. Reverse Transkription und 1. PCR

Folgende Bestandteile wurden in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 3: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer
10 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
2 µl	Primer R1 (25 pmol / µl Gebr.Lsg.)
1,2 µl	Primer R2 (25 pmol / µl Gebr.Lsg.)
15,8 µl	nukleasefreies H₂O
1 µl	RNasin
2 µl	r<i>Tth</i>-Polymerase
3 µl	Isolierte RNA

Als Letztes wurde zu jedem Reaktionsansatz 5 µl Mn(OAc)₂ (Kit) einzeln zugegeben.

Der fertige Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt, der folgendes Temperaturprogramm durchführte:

Tabelle 4: Temperaturprogramm

∞ Der Cycler hielt zum Ende eine Temperatur von 4 °C bis die Amplifikate entnommen wurden

	1 Zyklus	
30 Min	60 °C	Transkription
2 Min	94 °C	Denaturierung
	30 Zyklen	
30 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	60 °C	Annealing und Polymerisation
	1 Zyklus	
4 Min	60 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

3.6.2. Polymerase-Kettenreaktion (seminested PCR)

Der 1. PCR wurde eine 2. sogenannte seminested PCR angeschlossen, die ausschließlich das Produkt der 1. PCR mit einem eingerückten „seminested Primer-Paar“ amplifizierte.

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 5: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer (colorless)
2,5 µl	MgCl₂
5 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
1,2 µl	Primer R3 (25 pmol / µl Gebr. Lsg.)
1,2 µl	Primer R2 (25 pmol / µl Gebr. Lsg.)
28,8 µl	nukleasefreies H₂O
0,3 µl	Go-Taq-Polymerase
1 µl	DNA der 1. PCR

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert

(30 sec bei 10.000 x g).

Der fertige Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt, der folgendes Temperaturprogramm durchführte:

Tabelle 6: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
2 Min	92 °C	Denaturierung
	30 Zyklen	
30 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	45 °C	Annealing
30 sec	72 °C	Polymerisation
	1 Zyklus	
4 Min	72 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

Detektion:

Die Auftrennung der Amplifikate aus der 2. PCR erfolgte in der Agarosegelelektrophorese.

3.7. Nachweis von Adenoviren mittels PCR

Die Primersequenz für den Nachweis von Adenoviren mittels PCR wurde nach Allard et al. (2) gewählt.

Die Validierung erfolgte wie im Nachweis der Rotaviren (siehe oben). Bei jedem PCR-Lauf wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Postivkontrolle wurde eine Verdünnungsstufe (ca.10³ Viren) des Adenoviren-Typs 41 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde wieder nukleasefreies Wasser verwendet. Es wurden wieder die zuvor mittels Silicaextraktion isolierten Proben eingesetzt.

3.7.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 7: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
5 µl	10 x Puffer
5 µl	MgCl₂
10 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
5 µl	Primer Hex AA 1885 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)
5 µl	Primer Hex AA 1913 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)
14,5 µl	nukleasefreies H₂O
0,5 µl	Taq-Polymerase
5 µl	Isolierte DANN

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert

(30 sec bei 10.000 x g).

Tabelle 8: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
3 Min	94 °C	Denaturierung
	30 Zyklen	
30 sec	92 °C	Denaturierung
30 sec	55 °C	Annealing
30 sec	72 °C	Polymerisation
	1 Zyklus	
7 Min	72 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

3.7.2. nested-PCR

Der 1. PCR wird eine 2. sogenannte nested PCR angeschlossen, die ausschließlich das Produkt der 1. PCR mit einem eingerückten „nested Primer-Paar“ amplifiziert.

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 9: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
5 µl	10 x Puffer
5 µl	MgCl₂
10 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
5 µl	Primer NeHex 1893 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)
5 µl	Primer NeHex 1905 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)

18,5 µl	nukleasefreies H₂O
0,5 µl	Taq-Polymerase
1 µl	Probe (DNA der 1. PCR)

Die Reagenzien wurden wiederum vorsichtig gemischt und zentrifugiert (30 sec bei 10.000 x g).

Der fertige Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt, der erneut oben genanntes Temperaturprogramm durchführte.

- Detektion:

Die Auftrennung der Amplifikate aus der 2. PCR erfolgte in der Agarosegelelektrophorese.

3.8. Nachweis von Noroviren mittels PCR

Die Primersequenz für den Nachweis von Noroviren mittels PCR wurde nach Oh et al. (43) gewählt.

Bei jedem PCR-Lauf wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen wurden bekannte positive RNA-Aufreinigungen von Noroviren eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Es wurden wieder die zuvor mittels Silicaextraktion isolierten Proben eingesetzt.

3.8.1. Reverse Transkription

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 10: PCR-Mix

Menge (insg. 20 µl)	Reagenz
2 µl	10 x Puffer (Kit)
4 µl	MgCl ₂ (Kit)
2 µl	dNTP Mix (Kit) (10 mM Gebr.Lsg)
1 µl	Primer NV 7 (30 pmol / µl Gebr.Lsg.)
4,2 µl	nukleasefreies H ₂ O (Kit)
1 µl	RNasin (Kit)
0,8µl	AMV (reverse Transkriptase) (Kit)
5 µl	Isolierte RNA

Der fertige Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt, der folgendes Temperaturprogramm durchführte:

Tabelle 11: Temperaturprogramm

	1 ZYKLUS	
10 Min	25 °C	Transkription
60 Min	42 °C	Transkription
5 Min	98 °C	Denaturierung und Ende (4 °C ∞)

3.8.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die c-DNA wurde in den 1. PCR-Ansatz (50 µl) eingesetzt.

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 12: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer (colorless)
2,5 µl	MgCl ₂
5 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 1a (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 1b (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 7 (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
12,2 µl	nukleasefreies H ₂ O
0,3 µl	Go-Taq-Polymerase
2 µl	c-DNA

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert (30 sec bei 10.000 x g).

Tabelle 13: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
1 Min	94 °C	Denaturierung
	35 Zyklen	
30 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	42 °C	Annealing
45 sec	72 °C	Polymerisation
	1 Zyklus	
3 Min	72 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

3.8.3. nested PCR

Der 1. PCR wurde eine 2. sogenannte nested PCR angeschlossen, die ausschließlich das Produkt der 1. PCR mit einem eingerückten „nested Primer-Paar“ amplifiziert.

Dafür werden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 14: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer (colorless)
2,5 µl	MgCl ₂
5 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 4 (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 4b (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 6 (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
6 µl	Primer NV 6b (5 pmol / µl Gebr. Lsg.)
7,2 µl	nukleasefreies H ₂ O
0,3 µl	Go-Taq-Polymerase
1 µl	Probe (DNA der 1. PCR)

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert (30 sec bei 10.000 x g).

Tabelle 15: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
1 Min	94 °C	Denaturierung
	35 Zyklen	
30 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	42 °C	Annealing
45 sec	72 °C	Polymerisation
	1 Zyklus	
3 Min	72 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

- Detektion: Agarosegelelektrophorese

3.9. Nachweis von Enteroviren mittels PCR

Die Primersequenz zum Nachweis von Enteroviren wurde nach Hyypiä et al. (32) gewählt.

Bei jedem PCR-Lauf wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen wurden eine Verdünnungsstufe (ca.10³ Viren des Polio Impfstammes Poliopool I-III, Sabin-like) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Es wurden wieder die zuvor mittels Silicaextraktion isolierten Proben eingesetzt.

3.9.1. Reverse Transkription und 1. PCR

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 16: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer
10 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
4 µl	Primer P1 (10 pmol / µl Gebr.Lsg.)
4 µl	Primer P3 (10 pmol / µl Gebr.Lsg.)
9 µl	nukleasefreies H ₂ O
1 µl	RNasin
2 µl	<i>rTth</i> -Polymerase
5 µl	Isolierte RNA

Als Letztes wurden zu jedem Reaktionsansatz 5 µl Mn(OAc)₂ einzeln zugegeben

Tabelle 17: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
30 Min	65 °C	Transkription
3 Min	94 °C	Denaturierung
	40 Zyklen	
15 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	60 °C	Annealing und Polymerisation
	1 Zyklus	
7 Min	60 °C	Polymerisation / Ende (4 °C ∞)

3.9.2. Polymerase-Kettenreaktion (seminested PCR)

Dafür wurden folgende Bestandteile in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 18: PCR-Mix

Menge (insg. 50 µl)	Reagenz
10 µl	5 x Puffer (colorless)
2,5 µl	MgCl ₂
5 µl	dNTP Mix (1,25 mM je dNTP Gebr. Lsg.)
2,4 µl	Primer P1 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)
2,4 µl	Primer P2 (10 pmol / µl Gebr. Lsg.)
26,4 µl	nukleasefreies H ₂ O
0,3 µl	Go-Taq-Polymerase
1 µl	DNA der 1. PCR

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und zentrifugiert (30 sec bei 10.000 x g).

Tabelle 19: Temperaturprogramm

	1 Zyklus	
4 Min	94 °C	Denaturierung
	25 Zyklen	
30 sec	94 °C	Denaturierung
30 sec	50 °C	Annealing
30 sec	72 °C	Polymerisation
	1 Zyklus	
7 Min	72 °C	Polymerisation und Ende (4 °C ∞)

- Detektion

Agarosegelelektrophorese

3.10. Gelelektrophorese und Dokumentation

Durch die Agarosegelelektrophorese werden DNA-Stücke nach ihrer Größe aufgetrennt. Kurze DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld schneller und dadurch weiter als lange. Durch das Mitführen eines DNA-Längenstandards kann die Größe der Fragmente zugeordnet werden. Sie ist eine Methode zur Detektion von PCR-Produkten. Durch die Einlagerung des Farbstoffes Ethidiumbromid in die DNA kann diese im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Dieses Bild kann dann mit Hilfe einer Kamera auf einen Rechner übertragen werden und elektronisch dokumentiert werden.

3.10.1. Durchführung der Gelelektrophorese

Direkt nach der PCR wurden 8 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Ladepuffer in die Geltasche eingesetzt.

Die Konzentration der Agarose sollte zwischen 1 % und 3 % und die angelegte Spannung zwischen 50 V und 100 V liegen um eine saubere Auftrennung zu gewährleisten. Bei jedem Lauf setzte man eine Positivkontrolle mit ein.

Das Agarosegel wurde nach obiger Anleitung angefertigt und in die Gelkammer gesetzt. Die Kammer wurde mit 1 x TBE-Puffer befüllt. Je 2 µl Ladepuffer wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorgelegt. Dazu gab man dann 8 µl Probe bzw. 100 Basenpaar-Längenstandard. Nun pipettierte man die Proben und den Ladepuffer in die entsprechenden Taschen des Gels und schloss die Stromversorgung an. Nach ca. 40 Min wurde das Gel entnommen und das Ergebnis dokumentiert.

3.11. Quantitativer Nachweis von Viren in Zellkultur mittels Plaque-Assay

Der quantitative Nachweis von Viren in Zellkultur wurde mittels eines Plaque-Assay-Verfahrens (Plaque-Forming-Units, PFU) durchgeführt (22).

Es wurden die per Glaswollefiltration aufkonzentrierten Proben eingesetzt.

3.11.1. Auftauen der Zellen

Das Auftauen der in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagerten Zellen muss aufgrund der zytotoxischen Wirkung des DMSO sehr zügig durchgeführt werden. Die gewünschte Ampulle wurde dem Stickstoffbehälter entnommen, mit etwas Wachstumsmedium aufgefüllt und anschließend mit einer sterilen Glaspipette mehrmals aufgezogen, bis die Zellen aufgetaut waren. Danach wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit 75 cm^2 überführt und mit ca. 20 ml Wachstumsmedium aufgefüllt, wodurch das DMSO verdünnt wurde.

Die Zellen wurden nun in der Gewebekulturschale (NUNC) in Wachstumsmedium ausgesät. Vor dem Beimpfen müssten die Zellen zu einem dichten Monolayer gewachsen sein, was ca. 2 - 4 Tage dauerte.

Die Verdünnungen bzw. Konzentrate wurden in Erhaltungsmedium hergestellt und bei 37 °C warm gestellt. Die Zelllinien wurden mikroskopisch kontrolliert. Sämtliche benötigten Medium und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt und der Agar für das Overlay-Medium aufgelöst.

3.11.2. Subkultivierung der Zelllinien

Durch das sogenannte Passagieren der Zellen, das heißt die Zellen werden unter Einwirkung von Trypsin von den Kulturflaschen gelöst und durch Aufnahme in frisches Wachstumsmedium vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt, werden die Zelllinien im virologischen Labor erhalten. Dieses Umsetzen wird bei Erreichen der maximalen Zelldichte nötig.

Zuerst wurde das alte Medium per Vakuumpumpe abgesaugt. Durch einmaliges Waschen mit Trypsin wurden danach Serumreste entfernt, zum Passagieren wurde eine Lösung aus Trypsin / EDTA, die aus 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA bestand, verwendet. Der Ablöseprozess sollte unter dem Mikroskop überprüft werden. Danach wurde die Trypsinlösung abgesaugt und durch die Zugabe von 10 % FKS die Wirkung des Trypsin sofort inaktiviert. Durch Resuspendieren der Zellen wurde eine Vereinzellung erreicht. Abschließend füllte man neues Medium auf. Nun konnten die Zellen auf Zellkulturflaschen oder Well-Platten ausgesät werden.

3.11.3. Einzelne Untersuchungsschritte

Die Zellen wurden mit dem Probematerial beimpft. Hierzu wurde das Medium aus den Schalen abgezogen und eventuelle Reste des Mediums mit PBS abgespült. Anschließend wurde 0,5 - 1 ml Probe aufgetragen. In den ersten 30 Min der Inkubationszeit sollten die Schalen oft geschwenkt werden, um eine bessere Verteilung zu erreichen. Die Inkubationszeit betrug insgesamt ca. 1 - 1,5 h, wobei alle 15 Min geschwenkt wurde.

Nun wurde die Probe abgezogen und das vorbereitete Agar / Overlay-Medium Gemisch aufgegeben. Auf die abgezogenen Schalen gab man dann je ca. 20 ml Agar / Medium Gemisch, wobei eine Blasenbildung vermieden werden sollte.

Bei Zimmertemperatur kühlten die Schalen ca. 15 - 20 Min ab und wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

Das Entstehen der Plaques sollte täglich beobachtet werden, die letzten Plaques erscheinen nach spätestens 5 Tagen (z.B. Polio- und CoxB-Plaques nach 36 - 48 Stunden; Echo-Plaques erscheinen frühestens nach 72 h).

3.11.4. Anfärben und Auszählen der Plaques

Das Agar Medium Gemisch wurde vorsichtig abgekippt und Agarreste kurz mit aqua dest abgespült. Anschließend gab man pro Schale ca. 1 ml Kristallviolettlösung dazu und nach 5 Min bei Zimmertemperatur waren die Schalen im Bereich intakter Kulturzellen gefärbt und fixiert.

Jetzt konnte die Lösung abgezogen werden und überschüssige Färbelösung mit aqua dest abgespült werden. Nun konnten die Plaques ausgezählt werden.

3.12. Quantitativer Nachweis von Viren in Zellkultur mittels MPN-Verfahren

Die Vorbereitung der Zellkultur erfolgte wie oben in 3.11 beschrieben.

3.12.1. Ansatz in 24-er wells

Die Probe wurde in 1:4-Schritten verdünnt. Ausgehend von der unverdünnten Probe wurden mindestens drei aufeinanderfolgende Verdünnungsschritte mit 5 Parallelansätze auf Zellen in den 24-well Zellkulturplatten 1 h inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Proben wieder abgezogen und das Erhaltungsmedium aufgegeben. Nun bebrütete man die Zellen bei 37° C mit 5 % CO₂.

Anschließend wurden die CPEs in den wells registriert. Nach der Inkubationsperiode (1 - 3 Wochen) wurden die Werte in folgende Formel nach Chang et al. eingesetzt (9):

Mpn / ml =

$$\frac{\text{Summe der positiven wells}}{\sqrt{\text{Gesamtvolumen(ml) der ausgewerteten wells} \times \text{Volumen(ml) der negativen wells}}}$$

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

Tabelle 20: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen

GC: Gesamtcoliforme Enterobacteriaceae

FC: Fäkalcoliforme Enterobacteriaceae

Probe	GC MPN / 100 ml	FC MPN / 100 ml	Enterokokken KBE / 100 ml Membranfiltration	Enterokokken MPN / 100 ml MPN-Verfahren
Zulauf 1	> 11000	> 11000	> 100	
Ablauf 1	< 30	< 30	0	
Zulauf 2	> 11000	> 11000	> 100	
Ablauf 2	< 30	< 30	0	
Zulauf 3	> 11000	> 11000	5,2x10 ⁶	
Ablauf 3	< 30	< 30	0	
Zulauf 4	> 11000	> 11000	8,6x10 ⁵	
Ablauf 4	< 30	< 30	0	
Zulauf 5	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 5	< 30	< 30		< 15
Zulauf 6	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 6	< 30	< 30		< 15
Zulauf 7	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 7	< 30	< 30		< 15
Zulauf 8	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 8	< 30	< 30		< 15
Zulauf 9	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 9	230	230		< 15
Zulauf 10	> 11000	> 11000		34659
Ablauf 10	< 30	< 30		< 15

Aus Tab. 20 und Abb. 4 und 5 wird ersichtlich, dass in allen untersuchten Proben in den Zulaufen FC und GC in einer Anzahl vorhanden waren, die die Nachweisgrenzen des Verfahrens überschritten. In den entsprechenden Abläufen wurden in 90 % der Proben die untere Nachweisgrenze von 30 / 100 ml unterschritten, in nur einem Fall fanden sich 230 MPN / 100 ml GC und FC.

In keiner der Ablaufproben konnten Enterokokken nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze liegt hier für das MPN-Verfahren bei 15 MPN / 100 ml.

In den Abb. 4 und 5 wurden Werte, die unter die Nachweisgrenze fielen als nicht nachweisbar dargestellt.

Da die eingesetzten Proben Nr. 1 und 2 im Zulauf nicht genügend verdünnt wurden, konnte hier nur eine Konzentration von >100 KBE / 100 ml für die Enterokokken ermittelt werden. In den nächsten beiden Proben wurde weiter bis auf 10^{-6} verdünnt. Ab Probe Nr. 5 wurde das Nachweisverfahren gewechselt, es wurde nun ein miniaturisiertes MPN-Verfahren angewandt.

Abbildung 4: Mikrobiologische Ergebnisse der Untersuchungen im Zulauf

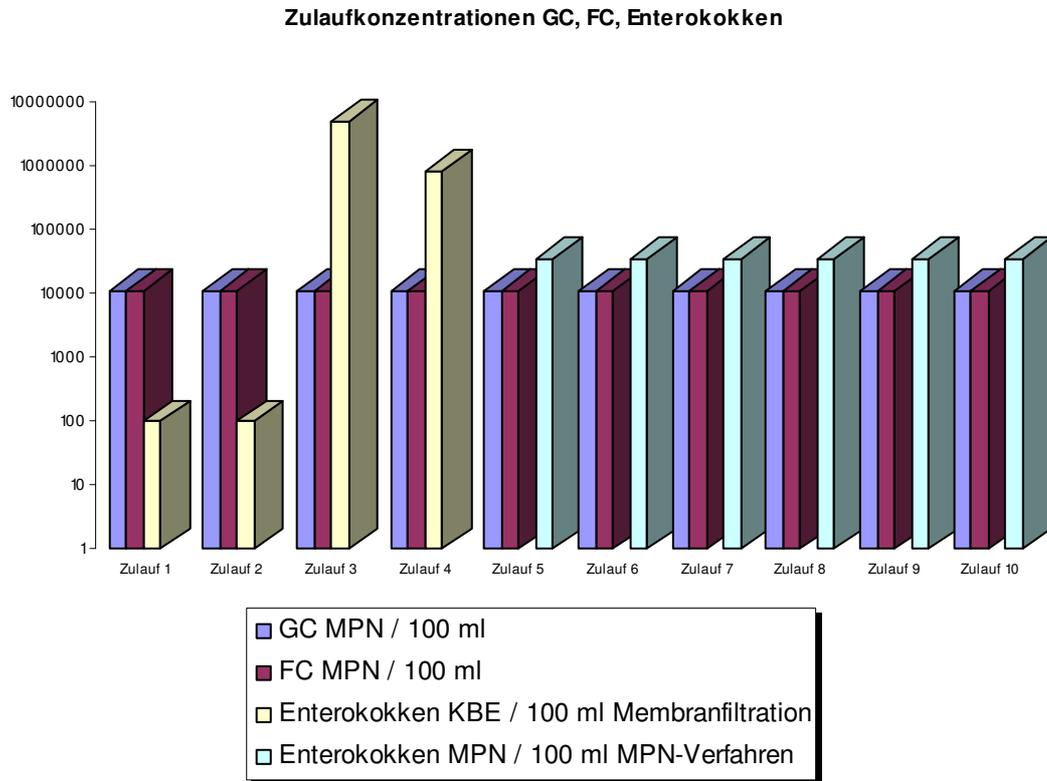
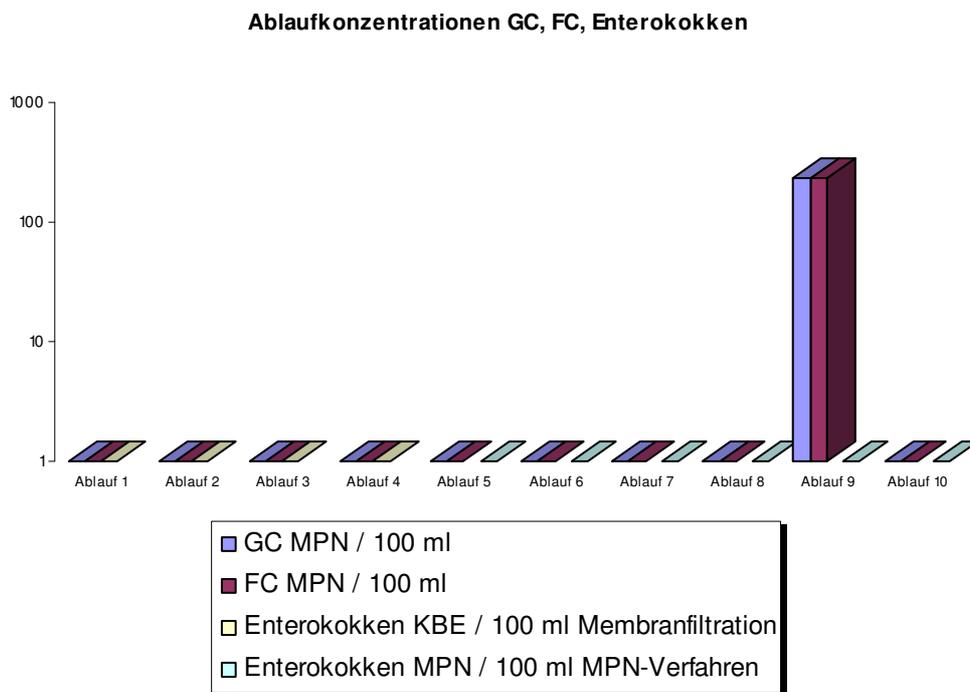


Abbildung 5: Mikrobiologische Ergebnisse der Untersuchungen im Ablauf



4.2. Ergebnisse der virologischen Untersuchungen

4.2.1. Ergebnisse der qualitativen PCR

Tabelle 21: Ergebnisse der qualitativen PCR

Zulauf = Zulaufproben

Ablauf = Ablaufproben

rot = viruspositiv

Entnahme- datum	Proben- datum	Entero- viren	Noroviren	Rotaviren	Adeno- viren
22.09.2005	Zulauf 1				
	Ablauf 1				
	Zulauf 2				
	Ablauf 2				
27.09.2005	Zulauf 3				
	Ablauf 3				
	Zulauf 4				
	Ablauf 4				
07.10.2005	Zulauf 5				
	Ablauf 5				
	Zulauf 6				
	Ablauf 6				
13.10.2005	Zulauf 7				
	Ablauf 7				
	Zulauf 8				
	Ablauf 8				
24.10.2005	Zulauf 9				
	Ablauf 9				
	Zulauf 10				
	Ablauf 10				

Wie aus Tab. 21 ersichtlich ließen sich in allen Zulaufproben mittels PCR Viren nachweisen.

In den Ablaufproben fanden sich in 4 Proben keine der getesteten Viren. Vier der Ablaufproben enthielten noch Adenoviren, in einer ließen sich Enteroviren nachweisen und eine Ablaufprobe enthielt sowohl Adeno- als auch Enteroviren. In keiner der Zulaufproben fanden sich Enteroviren, Adenoviren waren hingegen in 9 von 10 Proben nachzuweisen. Die in den Zuläufen nachgewiesenen Noro- und Rotaviren konnten in keiner Ablaufprobe mehr gefunden werden. Somit waren also 40 % der gezogenen Proben frei von Viren. In 40 % der Proben fanden sich noch Adenoviren, in 10 % Adeno- und Enteroviren und in weiteren 10 % der Proben nur Enteroviren.

4.2.2. Ergebnisse des quantitativen Virennachweises in der Zellkultur mittels Plaque Assay

Ein Anzuchtversuch von Enteroviren auf BGM-Zellen in der Zellkultur zur Quantifizierung mittels eines Plaque Assays erbrachte keine positiven Ergebnisse. Es konnten keine vermehrungsfähigen Viren nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein Impfpoliiovirus eingesetzt.

Auch im Anzuchtversuch von Adenoviren auf A 549-Zellen konnten keine vermehrungsfähigen Viren nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten hier isolierte Adenoviren aus Bindehautabstrichen.

4.3. Eliminationsleistung des Membranbelebungsverfahrens

Mit den genannten Nachweisverfahren konnte eine Eliminationsleistung für gesamt- und fäkalcoliforme Bakterien von über 4,1 log-Stufen nachgewiesen werden.

In den Untersuchungen auf Enterokokken konnten mit den genannten Methoden in keiner Ablaufprobe Enterokokken nachgewiesen werden, die Eliminationsleistung bezüglich Enterokokken betrug somit über 6,5 log-Stufen.

Die qualitativen PCR-Untersuchungen bezüglich enteropathogener Viren erbrachten in den Ablaufproben 40 % virusnegative Proben. Sämtliche in den Zuläufen nachgewiesenen Rota- (in 40 % der Zulaufproben positiv) und Noroviren (in 30 % der Zulaufproben positiv) waren in den Ablaufproben nicht mehr nachzuweisen.

5. Diskussion

5.1. Belastung der Oberflächengewässer durch Kläranlagenabläufe

Trotz der guten Eliminationsleistungen und dem hohen technischen Standard der Abwasserbehandlungsanlagen in Deutschland summieren sich doch auch bei uns die in die Vorfluter eingeleiteten Keime, sodass aus jedem Vorfluter, der zur Trinkwasserherstellung genutzt wird, Viren und Fäkalkeime isoliert werden konnten (21). Somit besteht in diesem Bereich vor allem aus Umweltgründen Handlungsbedarf, um die Ressource Wasser auch für kommende Generationen zu erhalten und zu schützen.

Auch für viele andere Länder der Erde stellt die Abwasserbehandlung ein immer größer werdendes Problem dar, darum ist es wichtig und notwendig Technologien zu entwickeln, die auch mit wenig finanziellem Aufwand und trotzdem guter Effektivität zu realisieren sind.

5.2. Eliminationsleistung der untersuchten Membranbelebungsanlage

Bei den Untersuchungen zu gesamt- und fäkalcoliformen Bakterien erfüllten alle gezogenen Ablaufproben die Kriterien der Badegewässerrichtlinie (17).

Tabelle 22: Vorgaben der Badegewässerrichtlinie (17)

Parameter	Richtwert	Grenzwert
fäkalcoliforme Bakterien (FC)	100 / 100 ml	2000 / 100 ml
gesamtcoliforme Bakterien (GC)	500 / 100 ml	10.000 / 100 ml

Die Qualitätsanforderungen der Badegewässer-Richtlinie gelten als erfüllt, wenn die Grenzwerte in 95 % der Proben, die Leitwerte in 80 % der Proben unterschritten werden.

Nur in einer Probe wurde der Richtwert für GC und FC mit 230 / 100 ml überschritten, der Grenzwert aber bei Weitem nicht erreicht, in allen anderen Ablaufproben konnten mit der genannten Nachweismethode keine GC und FC nachgewiesen werden.

Somit konnte eine Reduktion bezüglich gesamt- und fäkalcoliformer Bakterien von über 4,1 log-Stufen nachgewiesen werden.

In den Untersuchungen auf Enterokokken konnten mit den genannten Methoden in keiner Ablaufprobe Enterokokken nachgewiesen werden.

Die Eliminationsleistung bezüglich Enterokokken betrug somit über 6,5 log-Stufen.

Der Nachweis von Enterokokken in 100 ml einer Trinkwasserprobe stellt laut Trinkwasserverordnung (56) eine Grenzwertüberschreitung dar, was in den untersuchten Kläranlagenabläufen nicht der Fall war.

Etliche Studien haben gute bis sehr gute Eliminationsleistungen der Membranbelebungsanlagen gezeigt (25),(18),(57),(12).

So zeigten z.B. Untersuchungen des Erft-Verbandes anhand von Wasserproben der Kläranlage Rödingen eine Reduktion von 4 – 6 log-Stufen für GC und FC.

In derselben Studie zeigte sich des Weiteren auch, dass das Alter der Membranen, solange die Integrität gewährleistet ist, keinen negativen Einfluss auf die Rückhaltung von pathogenen Mikroorganismen zu haben scheint. Die untersuchten Membranen waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 2,5 Jahre in Betrieb (18). Ueda und Horan fanden eine Reduktion von FC und Enterokokken von bis zu 7 log-Stufen (57) und Ottosons Untersuchungen erbrachten eine Enterokokken-Reduktion um 4,5 log-Stufen (44).

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte der Membranbelebungsanlage zeigten somit eine hervorragende Reduktionsleistung bezüglich GC, FC und Enterokokken und somit eine mit der derzeitigen Studienlage vergleichbar gute Leistung.

Die Betriebserfahrungen des ersten Jahres der beprobten Anlage in Waldmössingen erbrachten in weiteren Untersuchungen größtenteils hervorragende Ablaufwerte, jedoch ergaben sich auch diverse Probleme, wie z.B. ein zu geringer Durchsatz durch die Anlage, ein zu hoher Nitratablaufwert, sowie ein hoher Personalaufwand, der v.a. durch die Reinigung der Membranen hervorgerufen wurde (38).

Trotz der guten Eliminationsleistungen des Membranbelebungsverfahrens sind dem Verfahren Grenzen gesetzt und eine flächige Verbreitung derzeit nicht in Sicht. Neben den insgesamt höheren Kosten müssten dann parallel zur Verbesserung der Ablaufqualität der Kläranlagen Maßnahmen zur Behandlung von Mischwasserentlastungen oder zur Reduzierung der Entlastungshäufigkeiten erfolgen, was zu noch höheren Kosten führt (37). Jedoch gibt es geeignete Anwendungsmöglichkeiten in der Aufbereitung von kommunalem Abwasser, vor allem in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten mit erhöhten Anforderungen an die Ablaufqualität, bei räumlich begrenzten Standorten oder einer Aufbereitung zu Brauchwasser. Insgesamt wird der Membranfiltration bei der Abwasserreinigung, ähnlich wie im Trinkwasserbereich, ein hohes Entwicklungspotential für die Zukunft bescheinigt (7).

Auch die Europäische Kommission hat sich zum Ziel gesetzt, die Entwicklung dieser Technologie in Europa stärker voranzutreiben und unterstützt in diesem Rahmen vier Projekte, welche parallel von Oktober 2005 bis Dezember 2009 laufen. Seit den Anfängen der MBR – Forschung stellt dies die weltweit größte koordinierte Forschungsinitiative dar, an der etwa 50 europäische und internationale Firmen und Institutionen beteiligt sind. Von den Projekten wird

erwartet, dass sie technische Meilensteine setzen, Prozessverbesserungen ermöglichen und das Verfahren damit wettbewerbsfähiger machen, um eine breitere Anwendbarkeit zu erreichen (59).

Jedoch sind die Membrankosten in den letzten 10 Jahren schon um den Faktor fünf gesunken, was das Verfahren zu einer wettbewerbsfähigen Alternative zu einer konventionellen Abwasserbehandlung macht (13).

Zukünftig wird sich der Schwerpunkt der erforderlichen Investitionen in der Abwasserreinigung in Deutschland wohl eher weg von Kläranlagenneubauten und hin zu Sanierungs- und Ertüchtigungsmaßnahmen in Kombination mit Erweiterungsvorhaben verschieben (14), wie es in der Anlage in Bondorf-Hailfingen schon geschehen und in der Abwasserreinigungsanlage in Ergenzingen in Planung ist (51),(52).

5.3. Virenkonzentration im Abwasser

Die mittels PCR nachgewiesenen Viren waren vor allem aus der Gruppe der Adenoviren. Sie konnten sowohl in den Zu- als auch in den Abläufen nachgewiesen werden. Enteroviren hingegen fanden sich in keinem der Zuläufe. Dies lässt vermuten, dass Enteroviren wohl eher nicht geeignet sind, Eliminationsleitungen von Membranfilteranlagen im Kläranlagenbereich aufzuzeigen. Vielmehr scheinen Adenoviren geeigneter, da sie in fast allen Abwasserproben zu finden waren.

Untersuchungen am Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg erbrachten, dass es beim Auftreten von Enteroviren im Abwasser zu jahreszeitlichen Schwankungen kommt, jedoch Adenoviren sehr viel häufiger und konstanter nachzuweisen waren. Untersuchungen von Oberflächenwasser über einen Zeitraum von zwei Jahren ergab in über 40 % adenoviruspositive Proben und in nur 3 % enteroviruspositive Proben (35).

Jedoch kann nach den durchgeführten PCR-Untersuchungen keine quantitative Aussage gemacht werden, bzw. die tatsächliche Eliminationsleistung der Membranbelebungsanlage bezüglich Viren konnte hiermit nicht bestimmt werden.

Die PCR unterscheidet nicht zwischen kompletten, vermehrungsfähigen Viren und deren DNA oder RNA, die frei in der Probe vorliegen kann (22), somit kann es natürlich sein, dass die viruspositiven Zuläufe große Mengen an Viren und die viruspositiven Ablaufproben nur noch geringe Mengen oder eventuell gar keine vermehrungsfähigen Viren mehr, sondern nur noch DNA/RNA-Fragmente enthielten. Insgesamt waren jedoch in 40 % der Proben keine der untersuchten Viren mehr nachweisbar.

Der Nachweis der Entero- und Adenoviren mittels Plaque-Assay zur Quantifizierung konnte in allen Zu- und Abläufen keine vermehrungsfähigen Viren mehr nachweisen. Eventuell gerieten die Viren hier unter die Nachweisgrenze, bzw. können im Abwasser befindliche Stoffe die Zellkultur inhibieren oder das Wachstum stören oder gar verhindern. Die Sensitivität der PCR ist hier sehr viel höher als die der Zellkultur.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden je 10 Wasserproben aus dem Zu- und Ablauf einer Membranbelebungsanlage untersucht. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Wochen entnommen und auf GC, FC und Enterokokken, sowie auf Entero-, Rota-, Noro- und Adenoviren untersucht.

Die Eliminationsleistung bezüglich der GC, FC und Enterokokken erbrachte eine fast vollständige Reduktion weit unter die von der Badegewässerrichtlinie geforderte Werte, um über 4,1 log-Stufen für die GC und FC und 6,5 log-Stufen für die Enterokokken.

Die Untersuchungen der Proben auf Viren mittels PCR erbrachten in 40 % virusnegative Ablaufproben, jedoch konnte hier keine quantitative Aussage zur Reduktionsleistung gemacht werden.

Da man bei den Viren trotz einer geringeren Größe im Vergleich zur Porengröße des Membranfilterns von 0,04 μm , aufgrund von adsorptiven Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche, Adsorption an das verwendete Flockungsmittel und der Entstehung eines Biofilms auf den Membranen, von einer Reduktion ausgehen muss, wurden Zellkulturen mittels eines Plaque-Assays für Entero- und Adenoviren angesetzt. Bei den Assays konnten jedoch keine vermehrungsfähigen Viren nachgewiesen werden, sodass die Ergebnisse aus den PCR-Untersuchungen nicht weiter quantifiziert werden konnten.

Da die Anzahl der gezogenen Proben gering war, kann keine statistisch abgesicherte Aussage über die maximal erreichbare Eliminationsleistung des Membranbelebungsverfahrens gemacht werden, jedoch decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien und Daten zur Eliminationsleistung des Verfahrens, sodass hier ein weiterer Beitrag zum Nachweis der Effektivität geleistet werden konnte.

7. Anhang

Tabelle 23: MPN-Tabelle

Tabelle zur Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahlen (MPN: Most Probable Number) in 100 ml-Proben bei Verwendung von jeweils drei Ansatzröhrchen je Verdünnungsstufe, beginnend mit einer 1 ml Probe.

Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen			Ergebnis MPN in 100 ml	Anzahl positiver Röhrchen in den Verdünnungen			Ergebnis MPN in 100 ml
1 ml	0,1 ml	0,01 ml		1 ml	0,1 ml	0,01 ml	
0	0	0	<30	2	0	0	91
0	0	1	30	2	0	1	140
0	0	2*	60	2	0	2*	200
0	0	3*	90	2	0	3*	260
0	1	0	30	2	1	0	150
0	1	1*	61	2	1	1	200
0	1	2*	92	2	1	2*	270
0	1	3*	120	2	1	3*	340
0	2	0*	62	2	2	0	210
0	2	1*	93	2	2	1	280
0	2	2*	120	2	2	2*	350
0	2	3*	160	2	2	3*	420
0	3	0*	94	2	3	0*	290
0	3	1*	130	2	3	1*	360
0	3	2*	160	2	3	2*	440
0	3	3*	190	2	3	3*	530
1	0	0	36	3	0	0	230
1	0	1	72	3	0	1	390
1	0	2*	110	3	0	2	640
1	0	3*	150	3	0	3*	950
1	1	0	73	3	1	0	430
1	1	1	110	3	1	1	750
1	1	2*	150	3	1	2	1200
1	1	3*	190	3	1	3*	1600
1	2	0	110	3	2	0	930
1	2	1*	150	3	2	1	1500
1	2	2*	200	3	2	2	2100
1	2	3*	240	3	2	3*	2900
1	3	0*	160	3	3	0	2400
1	3	1*	200	3	3	1	4600
1	3	2*	240	3	3	2	11000
1	3	3*	290	3	3	3	> 11000

Vertrauensgrenzen für wahrscheinliche Röhrenkombinationen sind in der Literatur angegeben und berücksichtigen ausschließlich die zufällige Streuung der Ergebnisse. Unwahrscheinliche Röhrenkombinationen ($p < 10^3$) sind in der Tabelle mit einem Sternchen* versehen. Aufgrund von natürlichen Variationsquellen (Zellverbände, gegenseitige Keimbeflüßungen) kommen sie gelegentlich vor.

Tabelle 24: Bezeichnung der Proben

Bezeichnung	Entnahmezeitpunkt
Zulauf 1	22.09.2005, 11 Uhr
Ablauf 1	22.09.2005, 11 Uhr
Zulauf 2	22.09.2005, 12 Uhr
Ablauf 2	22.09.2005, 12 Uhr
Zulauf 3	27.09.2005, 7 Uhr
Ablauf 3	27.09.2005, 7 Uhr
Zulauf 4	27.09.2005, 12 Uhr
Ablauf 4	27.09.2005, 12 Uhr
Zulauf 5	05.10.2005, 7 Uhr
Ablauf 5	05.10.2005, 7 Uhr
Zulauf 6	05.10.2005, 12 Uhr
Ablauf 6	05.10.2005, 12 Uhr
Zulauf 7	13.10.2005, 7 Uhr
Ablauf 7	13.10.2005, 7 Uhr
Zulauf 8	13.10.2005, 12 Uhr
Ablauf 8	13.10.2005, 12 Uhr
Zulauf 9	18.10.2005, 7 Uhr
Ablauf 9	18.10.2005, 7 Uhr
Zulauf 10	18.10.2005, 12 Uhr
Ablauf 10	18.10.2005, 12 Uhr

Literaturverzeichnis

- (1) **Abwassertechnische Vereinigung (ATV)** (1998): Desinfektion von biologisch gereinigtem Abwasser. Regelwerk Abwasser – Abfall Merkblatt M 205
- (2) **Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G.** (1992): Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step PCR, *J. Med. Virol.*, 37, 149-157
- (3) **ATV-DVWK-Arbeitsgruppe IG-5.5** (2002): Aufbereitung von Industrieabwasser und Prozesswasser mit Membranverfahren und Membranbelebungsverfahren, Teil 2: Aerobe Membranbelebungsverfahren. Arbeitsbericht der ATV-DVWK-Arbeitsgruppe IG-5.5 „Membrantechnik“ im ATV-DVWK-Fachausschuss IG 5 „Industrieabwasserreinigung“. KA (49), 11, 1563-1571
- (4) **Balayan, M. S.** (1993): Hepatitis E virus infection in Europe: Regional situation regarding laboratory diagnosis and epidemiology. *Clin. Diag. Virol.* 1: 1-8
- (5) **Bayerisches Landsamt für Wasserwirtschaft** (1991): Untersuchungen zur Keimreduktion im gereinigten Abwasser durch UV-Bestrahlung. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft 3 / 91
- (6) **Blacklow, N. R.** (1984): Norwalkvirus: A major cause of epidemic gastroenteritis. *Am. J. Public Health*; 72: 1321-1323
- (7) **Bleisteiner, S., Kexel, S., Wedi, D.** (2006): Membranbelebungsanlage Monheim, Erfahrungen über Betrieb, Leistungsfähigkeit und Auswirkung auf das Gewässer. *GWF Wasser Abwasser*, 147 (7-8), 501-508
- (8) **Brown, E. A., Ticehurst J., Lemon, S. M.** (1994): Immunopathology of hepatitis A and hepatitis E infections. In: Thomas, H.C., Waters, J. (eds.): *Immunology of Liver Diseases*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers B.V., 11-37
- (9) **Chang, S. L., Berg, G., Busch, K. A., Stevenson, R. E., Clarke, N. A., Kabler, P. W.** (1958): Application of the „Most Probable Number“ method for estimating concentrations of animal viruses by the tissue culture technique, *Virol.* 6, 27
- (10) **Dahling, D. R., Wright, B. A.** (1986): Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 790-812

- (11) **DIN EN ISO 7899**, (1999) Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von fäkalen Enterokokken in Oberflächenwasser und Abwasser – Teil 1: Miniaturisiertes Verfahren durch Animpfen in Flüssigmedium (MPN-Verfahren)
- (12) **Dizer**, H., Althoff, W., Bartocha, W., Dorau, W., Grohmann, A., Lopez-Pila, J.M., Seidel, K. (1994): Reduzierung von Bakterien und Viren in Kläranlagsabläufen durch Mikrofiltration in einer Modellanlage. Zbl.Hyg. 196, 23-37
- (13) **Döpfens**, E. (2004): Getauchte Membranen zur Abwasserreinigung und Wasseraufbereitung. Filtrieren und Separieren, 18 (4), 171-175
- (14) **DWA**, (2005): 2. Arbeitsbericht des DWA-Fachausschusses KA-7, Membranbelebungsverfahren, veröffentlicht auf der Homepage der DWA, www.dwa.de, Bereich online plus, Arbeitsberichte
- (15) **DWA**, (2005): 3. Arbeitsbericht des DWA-Fachausschusses IG 5.5, Aufbereitung von Industrieabwasser und Prozesswasser mit Membranverfahren und Membranbelebungsverfahren, Teil 3: Membranverfahren, veröffentlicht auf der Homepage der DWA, www.dwa.de, Bereich online plus, Arbeitsberichte
- (16) **DWA**, (2005): 4. Arbeitsbericht des DWA-Fachausschusses IG 5.5, Aufbereitung von Industrieabwasser und Prozesswasser mit Membranverfahren und Membranbelebungsverfahren, Teil 4: aerobe Membranbelebungsverfahren, veröffentlicht auf der Homepage der DWA, www.dwa.de, Bereich online plus, Arbeitsberichte
- (17) **EG-Richtlinie** (1976): Richtlinie des Rates vom 16. Juni 1975 über die Qualität der Badegewässer (76/160/EWG). Amtsblatt der EG Nr. L 194/34
- (18) **Erft-Verband**, Bereich Abwassertechnik, Drensla, K., Brepols, C., Janot, A.; Abschlußbericht für das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (MUNLV) des Landes Nordrhein-Westfalen (2004): Optimierung einer Belebungsanlage mit Membranfiltration
- (19) **Feuerpfeil**, I., Schulze, E. (1996): Fäkalstreptokokken. In: Methoden der Biologischen Wasseruntersuchung, Band 1: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen. E. Schulze (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag Jena
- (20) **Fleischer**, J. (1998a): Untersuchungen zur Belastung von Oberflächen- und Rohwässern mit enteropathogenen Viren und anderen Krankheitserregern. Jahresbericht des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg. 84-87

- (21) **Fleischer, J.** (1998b): Elimination von enteropathogenen Viren und Fäkalindikatoren bei der erweiterten biologischen Abwasserreinigung: Vergleich zwischen 4 Anlagen des Neckarraumes. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhart-Karls-Universität Tübingen
- (22) **Fleischer, J., Botzenhart, K.** (1996): Enterale Viren. In: Methoden der Biologischen Wasseruntersuchung, Band 1: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen. E. Schulze (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag Jena
- (23) **Fleischer, J., Kimmig, P.** (1998): Zwischenbericht des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg zum DVGW-Projekt "Nachweis enteropathogener Viren im Rohwasser und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung"
- (24) **Fleischer, J., Wagner-Wiening, C., Kimmig, P.** (2000): Virological and bacteriological investigations surveying drinking water resources in Germany. IWA-2000 Paris, Health-Related Water Microbiology, Book Nr. 7, HRMP-B13, 125-126
- (25) **Friedler, E., Kovalio, R., Ben-Zvi, A.** (2006): Comparative study of the microbial quality of greywater treated by the three on-site treatment systems. Environ Technol, 27 (6), 653-663
- (26) **Gerba, C. P.,** (1984): Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Advances in Applied Microbiology, 30, 133-168
- (27) **Gimbel, R., Hagemeyer, G.** (2001): Membranfilter sichern zunehmend die Trinkwasserqualität. Forum Forschung 2001,104-109
- (28) **Hahn, T., Tougianidou, D., Herbold, K., Flehming, B., Botzenhart, K.** (1988): Vorkommen von Enterobakterien, Coliphagen und enteralen Viren in einem Kiesaquifer des Neckarraumes. Z. dt. geol. Ges. 139, 559-565
- (29) **Heijkal, T. W., Keswick, B., LaBelle, R. L., Gerba, C. P., Sanchez, Y., Dreesman, G., Hafkin, B., Melnick, J. L.** (1982): Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. Journal AWWA, June 318-321
- (30) **Herold, G.** (Hrsg.) und Mitarbeiter (2004): Innere Medizin, Köln
- (31) **Hughes, M. S., Coyle, P. V., Connolly, J. H.** (1992): Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. Epidemiol. Infect. 108, 529-536
- (32) **Hyypiä, T., Auvinen, P., Maronen, M.** (1989): Polymerase chain reaction for human picornaviruses, J. gen. Virol. 70, 3261-3268.
- (33) **ISSW** (1993), Wechselwirkungen der biologischen und chemischen Phosphorelimination. Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Universität Karlsruhe, Tagungsband Nr. 68.

- (34) **Irving**, L. G., Smith, F. A. (1981): One-year survey of enteroviruses, adenoviruses and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 51-59
- (35) **Kimmig**, P., Fleischer, J. (2002), Abschlußbericht zum DVGW-Projekt 11/97 „Untersuchungen zur Belastung von Rohwässern mit enteropathogenen Viren und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung“, Landes-Gesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart
- (36) **Kimura**, K., Hara, H., Watanabe, Y. (2004): Membranes in Drinking an Industrial Water Produktion. *Desalination*, 178 (1-3): 135-140
- (37) **Krampe**, J. (2005): Einsatz von Membranen bei der biologischen Abwasserreinigung
- (38) **Krampe**, J., Laufer, R. (2005): Betriebserfahrungen mit der kommunalen Membranbelebungsanlage der Stadtwerke Schramberg in Waldmössingen, *Abwasser und Abfall*, 11, 14-18
- (39) **Le Guyader**, F., Neill, F. H., Estes, M. K., Monroe, S. S., Ando, T., Atmar, R. L. (1996): Detection of hepatitis-A-virus, rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish by reverse transcription-seminested PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3665-3667
- (40) **Madigan**, M. T., Martinko, J. M. (2006): *Brock Mikrobiologie*, 11, Pearson Studium, München
- (41) **Nichol**, D. S. T. (1995): *Gentechnische Methoden*, aus der Reihe Labor im Fokus, Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford
- (42) **Oethinger**, M. (Hrsg.), Hengel, H., Wand-Württenberger, A. (2000): *Mikrobiologie und Immunologie*, Urban&Fischer, München, Jena
- (43) **Oh**, D.-Y., Gaedicke, G., Schreier, E. (2003), Viral agents of acute gastroenteritis in german children: prevalence and molecular diversity. *J. Med. Virol.* 71, 82-93
- (44) **Ottoson**, J., Hansen, A., Björlenius, B., Norder, H., Stenström, T. A. (2006): Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and mebrane process in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449-1457
- (45) **Payment**, P (1981): Isolation of viruses from drinking water at the Pont-Viau water treatment plant *Can. J. Microbiol.* 27, 417-420
- (46) **Payment**, P., Tremblay, M., Trudel, M. (1985): Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 981-983

- (47) **Robert-Koch-Institut** (2001), Bericht zu einem Gastroenteritis-Ausbruch durch Norwalk-like-Viren in einem Krankenhaus, *Epid. Bull.* 33
- (48) **Safferman**, R. S., Rohr, M.-E., Goyke, T. (1988): Assessment of recovery efficiency of beef extract reagents for concentrating viruses from municipal wastewater sludge soils by the organic flocculation procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 309-316
- (49) **Sano**, D., Ueki, Y., Watanabe, T., Omura, T. (2005): Removal of indigenous noroviruses by membrane filtration. 13. International Symposium on health related Water Microbiology, Swansea (U.K.), 05.09.2005, Poster 62
- (50) **Schindler**, P. (1996): Coli-Coliforme. In: *Methoden der Biologischen Wasseruntersuchung 1: Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchungen*. E.Schulze (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag Jena
- (51) **Schwäbisches Tagblatt** (2006): Nur dreimal in ganz Deutschland, Ausgabe vom 17.06.2006, Tübingen, S. 37
- (52) **Schwäbisches Tagblatt** (2006): Investition zum Wohl der Fischbrut, Ausgabe vom 07.09.2006, Tübingen, S. 25
- (53) **Shields**, P. A., Farrah, S. R. (1986): concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 211-213
- (54) **Stadtwerke Schramberg**, (2004) Informationsbroschüre: Die Kläranlage Schramberg-Waldmössingen. Stadtwerke Schramberg GmbH & Co.KG
- (55) **Tani**, N., Shimamoto, K., Ichimura, K., Nishii, Y., Tomita, S., Oda, Y. (1992): Enteric Virus Levels in River Water. *Water Research*, 26 (1), 45-48
- (56) **Trinkwasserverordnung** (TrinkwV) (2001): Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. *BGBl. I* 2001, S. 959
- (57) **Ueda**, T., Horan, N. J. (2000): Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Res* 34 (7), 2151-2159
- (58) **Walter**, R., Rüdiger, S. (1981): Ein Zweistufenverfahren zur virusanreicherung aus Lösungen mit geringem Virustiter (z.B. Trinkwasser). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 25, 71-81
- (59) **www.mbr-network.eu**, MBR-Netzwerk: ein Cluster von EU-Projekten rund um das Thema MBR-Technologie, <http://www.mbr-network.eu/mbr-projects/proj-desc-abstarct-de.php>

- (60) **www.stadtwerke-schramberg.de**,
<http://www.stadtwerke-schramberg.de/ceasy/modules/cms/index.html?cPagelId=399>
- (61) **www.zenon.com**,
<http://www.zenon.com/lang/Deutsch/membrbantechnologie-Einfuehrung.shtml>
- (62) **Zenon**, Homepage der Firma Zenon,
<http://www.zenon.com/lang/Deutsch/produkte/mbr/MBR-Verfahren.shtml>

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei **allen** bedanken, die mich tatkräftig bei der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, auch bei all denen, die hier nicht namentlich aufgeführt sind. Ohne eure Mithilfe hätte ich das nicht geschafft! Vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. Botzenhart für die Überlassung des Themas und seine unbegrenzte Unterstützung und Geduld mit mir. Besonders hilfreich war seine ständige Bereitschaft und sein offenes Ohr für die Fragen und Probleme, die sich immer wieder aufwarfen. Vielen Dank auch für die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jens Fleischer vom LGA Stuttgart danke ich sehr für seine umfassende Betreuung, Bereitstellung von Literatur und die zahlreichen konstruktiven Vorschläge zur Korrektur dieser Arbeit,... und vor allem für seine mir geopfert Zeit Ohne ihn hätte ich das alles nicht geschafft! Schön, dass Du mich immer animiert hast weiter zu machen. Danke Jens!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Monika Hirrlinger für ihren eigens für mich und meine Frau eingerichteten „Labor-Crashkurs“ bedanken, ohne sie hätte ich schon vor Beginn der Untersuchungen mangels Laborkenntnissen aufgeben müssen.

Besonderer Dank gebührt auch den Labormitarbeitern des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg Silke Oueslati, Ingrid Maunz, Gabriele Korbl, Barbara Biebl und ganz besonders Ingrid Braitsch, die mich wirklich sehr bei meinen Arbeiten unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Laufer, Klärwerksmeister der Kläranlage Waldmössigen, der mir bei der Probenentnahme in der Kläranlage geholfen hat.

Danke auch an Sandra Fürst für die große Hilfe bei der Formatierung und den diversen PC-Problemen und an Regina Linder für die Unterstützung beim Kampf mit der neuen deutschen Rechtschreibung.

Vielen Dank an meine Schwiegereltern für die liebevolle Betreuung unserer Kinder, vor allem „wenn’s mal wieder eng“ wurde.

Zuletzt darf ich meine Eltern nicht vergessen, danke vor allem für die finanzielle Unterstützung!

... und natürlich vielen Dank an meine Frau Katrin Hupfau und meine drei Töchter Ronja, Lejana und Maja, die oft viel Geduld mit mir aufbringen mussten! Ich hab’ Euch lieb!

Lebenslauf

Name	Ingo Philipp Fürchtegott Baumann	
Geburtsdatum	01.03.1977	
Ort	Freudenstadt	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Familienstand	verheiratet	
Kinder	Ronja Hupfauf (1998) Lejana Hupfauf (2002) Maja Hupfauf (2005)	
Eltern	Dr. med. Beata Gabriele Baumann, geb. Holzäpfel Dr. med. Lutz Götz Fürchtegott Baumann	
Schulbildung	1983 – 1987	Grundschule Pfalzgrafenweiler
	1987 – 1993	Realschule Pfalzgrafenweiler
	1993 – 1994	Christophorus Gymnasium Altensteig
	1994 – 1997	Wirtschaftsgymnasium der Eduard- Spranger-Schule Freudenstadt
	06/ 1997	Allgemeine Hochschulreife
Universitätsausbildung	WS 97/98	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Ulm
	SS 1999	Weiterführung des Medizin- studiums an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
	03 / 2001	Ärztliche Vorprüfung
	04 / 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	09 / 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2004-2005	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen 1. Tertial Chirurgie 2. Tertial Innere Medizin 3. Tertial Diagn. Radiologie
	09.11.2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dissertation	2004-2006 Promotion an der Universität Tübingen Abteilung für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene „Elimination von enteropathogenen Viren und Bakterien mittels Membranbelebungsverfahren“	