

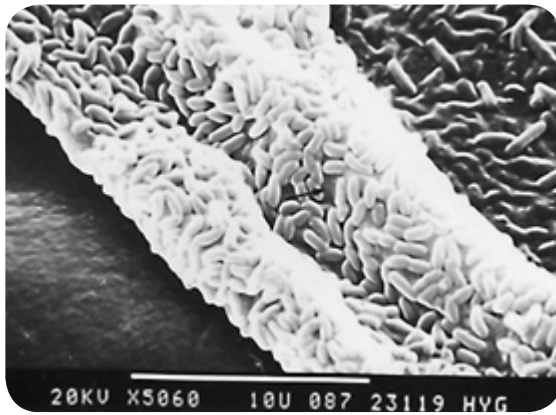
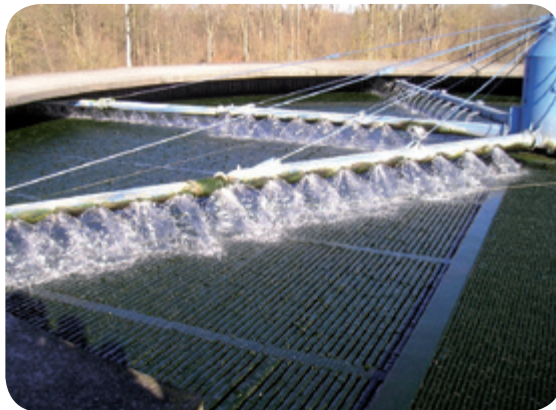


## RiSKWa-Statuspapier

Bewertungskonzepte der Mikrobiologie  
mit den Schwerpunkten neue Krankheitserreger  
und Antibiotikaresistenzen

Ergebnisse des Querschnittsthemas  
„Bewertungskonzepte der Mikrobiologie“

Martin Exner und Thomas Schwartz



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



**FONA**  
Nachhaltiges  
Wassermanagement  
BMBF

## IMPRESSUM

### Herausgeber:



DECHEMA e.V.  
Theodor-Heuss-Allee 25  
60486 Frankfurt am Main

### Ansprechpartner für die BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ RiSKWa:

Beim BMBF:  
Dr. Helmut Löwe  
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
Referat 724 – Ressourcen und Nachhaltigkeit  
53170 Bonn  
Tel.: +49 (0)228 9957-2110  
Fax: +49 (0)228 9957-82110  
E-Mail: helmut.loewe@bmbf.bund.de

Beim Projektträger:  
Dr. Verena Höcke  
Projektträgerschaft Ressourcen und Nachhaltigkeit  
Projektträger Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie  
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1  
76344 Eggenstein-Leopoldshafen  
Tel.: +49 (0)721 608-24932  
Fax: +49 (0)721 608-924932  
E-Mail: verena.hoecke@kit.edu

### Editor:

Wissenschaftliches Begleitvorhaben der BMBF-Fördermaßnahme „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ (RiSKWa)

Verantwortlich im Sinne des Presserechtes:

Dr. Thomas Track  
DECHEMA e.V.  
Tel.: +49 (0)69 7564-427  
Fax: +49 (0)69 7564-117  
E-Mail: track@dechema.de

Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
Förderkennzeichen: 02WRS1271

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren des Statuspapiers.  
Das Statuspapier ist nicht für den gewerblichen Vertrieb bestimmt.

Erschienen im Oktober 2015

<b>Autoren</b>	2
<b>Kapitel 1: Hintergrund</b>	3
1.1 Regulatorische Anforderungen an die Beschaffenheit von Trinkwasser, Rohwasser und Abwasser	3
1.2 Integration neuer Krankheitserreger in das bisherige hygienisch-mikrobiologische Überwachungskonzept	5
1.3 Charakteristika heute als relevant erkannter Trinkwasser-bedingter Erreger	6
1.4 Kenntnisse zu über Trinkwasser übertragenen Infektionen durch neue Krankheitserreger in Deutschland	8
1.5 Kenntnisse über das Vorkommen von „Emerging Pathogens“ in Gewässersystemen	9
1.6 Vorschläge zur Neukonzeptionierung der Wasserüberwachung	11
1.7 Antibiotika-resistente Bakterien und Wasser	13
<b>Kapitel 2: Nachweisverfahren und Bedeutung/Bewertung</b>	17
2.1 Krankheitserreger (Mikroorganismen, Parasiten, Viren) und deren Indikatoren	17
2.2 Antibiotikaresistenzen	19
<b>Kapitel 3: Ausgangssituationen – Ergebnisse aus RiSKWa</b>	22
3.1 Konventionelle Abwassertechniken in Kliniken und Kommunen	22
3.2 Erweiterte Abwassertechniken	23
3.3 Rohwasser inklusive Grundwasser	24
3.4 Trinkwasser	25
3.5 Umwelt (Oberflächenwasser/Badegewässer/Regenüberlauf)	27
<b>Kapitel 4: Priorisierung von Indikatoren</b>	33
4.1 Emerging Pathogens	33
4.1.1 Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung	33
4.1.2 Trinkwasserinstallation	33
4.2 Antibiotika-resistente Erreger bzw. Antibiotikaresistenzen	33
4.2.1 Abwasser	33
4.2.2 Rohwasser/Grundwasser	34
4.2.3 Trinkwasser	34
4.2.4 Umwelt (Oberflächenwasser/Badegewässer/Regenüberlauf)	34
<b>Kapitel 5: Bewertungskonzepte</b>	37
<b>Kapitel 6: Wissenslücken und Forschungsbedarf</b>	39
<b>Referenzen</b>	42

<b>Dipl.-Biol. Johannes Alexander</b>	Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Nord, Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Mikrobiologie an Grenzflächen, Karlsruhe
<b>Prof. Dr. Thomas U. Berendonk</b>	Technische Universität Dresden, Fakultät Umweltwissenschaften, Institut für Hydrobiologie, Dresden
<b>Prof. Dr. Dr. Martin Exner</b>	Universität Bonn Universitätsklinikum, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Bonn
<b>Prof. Dr. Claudia Gallert</b>	Hochschule Emden/Leer, Emden Institut für Umwelttechnik
<b>Dr. Beate Hambsch</b>	DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Mikrobiologie, Karlsruhe
<b>Dr. Stefanie Heß</b>	Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers (IBA), Karlsruhe
<b>Dr. Lars Jurzik</b>	Ruhr-Universität Bochum, Hygiene, Sozial- und Umweltmedizin, Bochum
<b>Stephan Luther M. A. (Geogr.)</b>	Universität Bonn, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Bonn
<b>Dipl.-Biol. Benedikt Schäfer</b>	Umweltbundesamt (UBA), Bad Elster
<b>Prof. Dr. Thomas Schwartz</b>	Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Campus Nord, Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG), Mikrobiologie an Grenzflächen, Karlsruhe
<b>Dipl.-Ing. Claudia Stange</b>	DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Umweltbiotechnologie & Altlasten, Karlsruhe
<b>Dipl.-Biol. Fabian Stemmler</b>	Umweltbundesamt (UBA), Bad Elster
<b>Dr. Martin Strathmann</b>	IWW Zentrum Wasser, Angewandte Mikrobiologie, Mülheim an der Ruhr
<b>Prof. Dr. Andreas Tiehm</b>	DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW), Umweltbiotechnologie & Altlasten, Karlsruhe

### 1.1 Regulatorische Anforderungen an die Beschaffenheit von Trinkwasser, Rohwasser und Abwasser

Die Anforderungen an die Beschaffenheit von Trinkwasser (Wasser für den menschlichen Gebrauch) sind in § 37 des Infektionsschutzgesetzes geregelt. Hierin heißt es in Absatz 1:

*„Wasser für den menschlichen Gebrauch muss so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit, insbesondere durch Krankheitserreger, **nicht zu besorgen** ist.“*

Der Begriff „**nicht zu besorgen**“ stellt nach Bales/Baumann sehr hohe Anforderungen an die Beschaffenheit des Wassers (Bales, 2001). Da Wasser ein überragendes Schutzgut ist, darf nach bisherigem deutschem Verständnis keine, auch noch so wenig naheliegende Wahrscheinlichkeit bestehen, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit verursacht wird.

Zudem wird durch die Formulierung „**insbesondere durch Krankheitserreger**“ die besondere Bedeutung von Infektionserregern, die mit Wasser assoziiert sind, herausgestellt.

Entsprechend § 37 (3) des IfSG unterliegen Wassergewinnungs- und Wasserversorgungsanlagen der Überwachung durch das Gesundheitsamt.

Auch das Abwasser ist im IfSG § 41: „Abwasser“ geregelt. So heißt es in Absatz (1):

*„(1) Die Abwasserbeseitigungspflichtigen haben darauf hinzuwirken, dass Abwasser so beseitigt wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen. Einrichtungen zur Beseitigung des in Satz 1 genannten Abwassers unterliegen der infektionshygienischen Überwachung durch die zuständige Behörde. Die Betreiber von Einrichtungen nach Satz 2 sind verpflichtet, den Beauftragten der zuständigen Behörde Grundstücke, Räume, Anlagen und Einrichtungen zugänglich zu machen und auf Verlangen Auskunft zu erteilen, soweit dies zur Überwachung erforderlich ist. Das Grundrecht der Unverletzlichkeit der Wohnung (Artikel 13 Abs. 1 Grundgesetz) wird insoweit eingeschränkt. § 16 Abs. 1 bis 3 findet Anwendung.“*

Anforderungen hinsichtlich der Untersuchungen von Abwasser auf Krankheitserreger existieren jedoch nicht, bzw. sind in den letzten Jahrzehnten nicht für notwendig erachtet oder schlichtweg „vergessen“ worden.

Die Güte der Trinkwasserqualität wird jedoch durch Untersuchungen auf eine Vielzahl chemisch-physikalischer und mikrobiologischer Parameter regelmäßig verifiziert.



Die Überprüfung der mikrobiologischen Trinkwasserqualität basiert auf der bereits vor mehr als 100 Jahren eingeführten mikrobiologischen Untersuchung des Trinkwassers auf der Bestimmung der Parameter:

- Anzahl heterotropher Bakterien (Koloniezahl) bei 22 °C und 36 °C in 1 ml als Kriterium für die Effizienz der Aufbereitung und der Intaktheit des Trinkwasserleitungsnetzes
- coliforme Bakterien, *E. coli* und Enterokokken in 100 ml als Indikatoren für die Abwesenheit von Bakterien fäkaler Herkunft und fäkaler Belastung
- *Clostridium perfringens* in 100 ml, wenn das Rohwasser von Oberflächenwasser stammt oder von Oberflächenwasser beeinflusst wird.

Die Untersuchung auf die o.a. mikrobiologischen Parameter hat sich bewährt um zu verifizieren, dass das Trinkwasser frei von bakteriellen Krankheitserregern fäkaler Herkunft ist. Diese Untersuchungen haben einen maßgeblichen Beitrag geleistet, dass Trinkwasser so sicher aufbereitet wurde, dass die großen trinkwasserbedingten Seuchenerkrankungen wie Cholera, Typhus, Paratyphus, Shigellenruhr und andere gastrointestinale Infektionen in Deutschland eradiziert werden konnten.

Nach § 5 Absatz 1 der Trinkwasser-Verordnung heißt es weiterhin:

*„Im Trinkwasser dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nr. 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, nicht in Konzentrationen enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.“*

Hiermit wurde zum ersten Mal ein **Konzentrationsbezug** für Mikroorganismen in die Trinkwasser-Verordnung eingeführt.

Die Überprüfung der hygienisch-mikrobiologischen Qualität des Trinkwassers erfolgt nach Trinkwasserverordnung ausschließlich im aufbereiteten Trinkwasser vor bzw. nach der Desinfektion im Wasserwerk bzw. im Verteilungsnetz. Somit handelt es sich derzeit im Prinzip nach Trinkwasserverordnung, sowie im Vollzug der Gesundheitsämter, um eine **„Endproduktkontrolle“** ausschließlich zur Verifizierung der einwandfreien bakteriologischen Wasserbeschaffenheit und nicht wie in der Lebensmittelhygiene um eine Stufenkontrolle nach dem HACCP-Konzept, wobei nach dem Grundprinzip: „from farm to fork“ alle relevante Stufen von Herkunft des Lebensmittel (Bauernhof), über Zwischenstufen und Verarbeitung sowie Transport, bis zum Verzehrpunkt (Gabel), alle Stufen in die mikrobiologische Risikoanalyse miteinbezogen werden. Die in der Trinkwasser-Verordnung festgelegten Grenz- und Richtwerte für Mikroorganismen beziehen sich daher nur auf die Qualität des aufbereiteten Trinkwassers, wobei jedoch in § 5 (5) auch auf die mikrobielle Rohwasserbelastung eingegangen wird, die eine Aufbereitung und eventuell eine Desinfektion erforderlich macht. Auch in den technischen Regeln, deren Einhaltung ebenfalls nach TrinkwV zu fordern ist (a. a. R. d. T.), sind Anforderungen an das Rohwasser festgelegt. Einzelne Krankheitserreger („emerging pathogens“) im Rohwasser werden dagegen nicht betrachtet.

Das **Rohwasser**, definiert nach Trinkwasserverordnung als das mit einer Wassergewinnungsanlage der Ressource entnommene und unmittelbar zu Trinkwasser aufbereitete oder ohne Aufbereitung als Trinkwasser verteilte Wasser, wird bislang regulatorisch nicht hinsichtlich der mikrobiologischen Beschaffenheit bewertet, um die Qualität und Eignung des Rohwassers zur Trinkwasseraufbereitung zu beurteilen und hierauf Maßnahmen zur Besserung der Rohwasserqualität im Einzugsgebiet bzw. bei der Aufbereitung zu begründen.

Während für Oberflächenwässer früher Anforderungen in der EU-Richtlinie festgelegt waren, sind in der nunmehr stattdessen anzuwendenden EU-Wasser-rahmenrichtlinie für Oberflächengewässer keine Anforderungen für Krankheitserreger oder Mikroorganismen festgelegt.

In § 5 TrinkwV (5) heißt es zu den mikrobiologischen Belastungen des Rohwassers:

*„Soweit der Unternehmer und der sonstige Inhaber einer Wasserversorgungs- oder Wassergewinnungsanlage oder ein von ihm Beauftragter hinsichtlich **mikrobiologischer Belastungen des Rohwassers** Tatsachen feststellen, die zum Auftreten einer übertragbaren Krankheit im Sinne des § 2, Nr. 3 des Infektionsschutzgesetzes führen können, oder annehmen, dass solche Tatsachen vorliegen, muss eine Aufbereitung erforderlichenfalls unter Einschluss einer Desinfektion, nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik und der Beachtung von § 6 Absatz 3 erfolgen.“*

Nach § 9 der Trinkwasserverordnung ist das Gesundheitsamt zudem verpflichtet bei Nicht-Erfüllung der Anforderungen nach § 5 der TrinkwV unverzüglich eine **Analyse der Gesundheitsgefährdung** durchzuführen.

*„Wird dem Gesundheitsamt bekannt, dass in einem Wasserversorgungsgebiet die in den §§ 5 bis 7 in Verbindung mit den Anlagen 1 bis 3 festgelegten Grenzwerte nicht eingehalten oder die Anforderungen nicht erfüllt sind, hat es **unverzüglich** zu entscheiden, ob dadurch die **Gesundheit der betroffenen Verbraucher gefährdet** ist und ob die betroffene Wasserversorgungsanlage oder Teile davon bis auf Weiteres weiterbetrieben werden können.“*

Bei der Gefährdungsanalyse müssen Risiken durch alle relevanten über Wasser übertragenen Krankheitserreger mit in die Analyse einbezogen werden.

## 1.2 Integration neuer Krankheitserreger in das bisherige hygienisch-mikrobiologische Überwachungskonzept

In den letzten drei Jahrzehnten sind eine Fülle neuer Erkenntnisse u. a. im Zusammenhang mit trinkwasserbedingten Ausbrüchen zu neuen, zum Teil bislang nicht bekannten wasserbedingten Erregern gewonnen worden. Durch neue Methoden der Epidemiologie und mikrobiologischen Analytik konnten eine Reihe weitergehender Erkenntnisse zu Ökologie, Virulenz, zu Infektionsquellen und zur Infektiosität z. T. nicht bekannter, wasserassoziierter Krankheitserreger gewonnen werden (Atherton et al., 1995; Brieseman, 1987; Carrique-Mas et al., 2003; Craun, 1979; D'Antonio et al., 1985; Hayes et al., 1989; Jones and Roworth, 1996; Kaplan et al., 1982; Kistemann, 1997; Kukkula et al., 1997; Kukkula et al., 1999; Lopez et al., 1980; Mac Kenzie et al., 1994; Mentzing, 1981; Neringer et al., 1987; Nurgalieva et al., 2002; O'Connor, 2002; Olsen et al., 2002; Richardson et al., 1991; Tillett HE, 1998).

Unter **„neu erkannten Krankheitserregern“** oder als Synonym „emerging pathogens“ werden solche Krankheitserreger verstanden, die neu in einer Population auftreten oder die rasch hinsichtlich ihrer Inzidenz zunehmen oder sich in definierten, geographisch umschriebenen Gebieten als Krankheitserreger manifestieren. Als **„emerging infectious diseases“** werden solche Infektionskrankheiten definiert, die hinsichtlich ihrer Inzidenz entweder innerhalb der letzten Jahrzehnte zugenommen haben oder von denen anzunehmen ist, dass sie in der nächsten Zukunft an Bedeutung gewinnen werden.

„Emerging pathogens“ werden in drei Kategorien eingeteilt,

- Humanpathogene Erreger, die vollkommen neu sind (Beispiel HIV),
- Humanpathogene Erreger, die zwar als Mikroorganismen beschrieben wurden, aber erst kürzlich als Krankheitserreger identifiziert wurden (*Helicobacter pylori*, *Cryptosporidium*) oder
- Humanpathogene Erreger, die aufgrund von Umweltveränderungen und verbesserten Vermehrungsmöglichkeiten an Bedeutung gewonnen haben (z.B. Legionellen, Antibiotika-resistente Erreger).

Zu den Erregern, die durch Trinkwasser übertragen werden können und die zu trinkwasserbedingten Erkrankungen sowohl als sporadische Infektionserreger als auch als Erreger von Ausbrüchen geführt haben, zählen die in Tabelle 1 aufgeführten Krankheitserreger entsprechend einer Aufstellung der WHO (WHO, 2011).

Eine detaillierte Beschreibung der Erreger findet sich in den WHO-Guidelines for Drinking water Quality (WHO, 2011), CDC (CDC, 2013) auf der Homepage des Robert Koch-Institutes sowie bei Hruday et al. (2007), Craun et al. (2010) (Hruday and Hruday, 2007), Craun (Craun et al., 2010) und Exner et al. (2011) (Exner, 2011).

Antibiotika-resistente Erreger sind in den WHO Guidelines for Drinking Water Quality (4. edition) noch nicht angesprochen.

### 1.3 Charakteristika heute als relevant erkannter Trinkwasser-bedingter Erreger

Die Charakteristika der neu erkannten wasserassoziierten Krankheitserreger sind:

- eine sehr niedrige Infektionsdosis (EHEC, *Campylobacter*, Noroviren, Rotaviren, Enteroviren, Cryptosporidien, *Giardia*)
- eine zum Teil sehr hohe Chlorresistenz (*Cryptosporidium*, *Giardia* sowie zum Teil Noroviren)
- zum Teil Reservoir in wild lebenden Tieren
- zum Teil diffuser Eintrag in Gewässer nicht nur durch Abwasser, sondern auch übrige Abschwemmungen.

Zu beachten ist, dass im Rahmen von großen trinkwasserbedingten Ausbrüchen die o.a. klassischen bakteriellen Indikatoren im Trinkwasser (nach Desinfektion) z.T. nicht positiv waren bzw. keinen Hinweis auf eine Kontamination indiziert haben (Mac Kenzie et al., 1994; Maunula et al., 2005).

Ursachen für eine unzureichende Indikation der bisher verwendeten bakteriologischen Indikatoren sind:

- Untersuchungen der bakteriologischen Indikatoren in einem begrenzten Untersuchungsvolumen von 100 ml Trinkwasser, welches nicht ausreichend ist, um Infektionserreger mit sehr niedriger Infektionsdosis sicher indizieren zu können (siehe unten)
- begrenzte Persistenz der bakteriologischen Indikatoren in Gewässern, die nicht Wasser-assoziierten neuen Krankheitserregern mit längerer Persistenz entspricht
- deutlich geringere Resistenz gegenüber Chlor bzw. Chlordioxid.

Die hohe Bedeutung von Krankheitserregern im Gegensatz zu chemisch-physikalischen Schadstoffen liegt darin, dass chemisch-physikalische Schadstoffe in der Regel erst bei chronischer Einwirkung über lange Zeit zur Manifestation von Erkrankungen führen, während bei Krankheitserregern kurzfristige Konzentrationserhöhungen im Trinkwasser von wenigen Stunden ausreichen, um zum Teil ausgedehnte Ausbrüche

Tabelle 1: Auswahl wasserübertragbarer Krankheitserreger fäkalen Ursprungs (WHO-Leitlinien für Trinkwasserqualität (verändert nach (WHO, 2011)))

Krankheitserreger	Gesundheitliche Bedeutung <sup>a</sup>	Persistenz im Wasser <sup>b</sup>	Resistenz gegenüber Chlor <sup>c</sup>	Relative Infektiösität <sup>d</sup>	Wichtige tierische Quellen
<b>Bakterien</b>					
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Hoch	Moderat	Gering	Moderat	Ja
<i>Escherichia coli</i> –Pathogene <sup>e</sup>	Hoch	Moderat	Gering	Gering	Ja
<i>E. coli</i> – Entero-haemorrhagisch	Hoch	Moderat	Gering	Hoch	Ja
Enteritis-Salmonellen	Hoch	Können sich vermehren	Gering	Gering	Ja
<i>Shigella</i> spp.	Hoch	Kurz	Gering	Hoch	Nein
<b>Viren</b>					
Adenoviren	Moderat	Lang	Moderat	Hoch	Nein
Enteroviren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Nein
Astroviren	Gering	Lang	Moderat	Hoch	Nein
Hepatitis A Viren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Nein
Hepatitis E Viren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Möglich
Noroviren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Möglich
Sapoviren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Möglich
Rotaviren	Hoch	Lang	Moderat	Hoch	Nein
<b>Parasiten</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Hoch	Können sich vermehren	Gering	Hoch	Nein
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hoch	Lang	Hoch	Hoch	Ja
<i>Giardia intestinalis</i>	Hoch	Moderat	Hoch	Hoch	Ja

a Gesundheitliche Bedeutung in Bezug zur Inzidenz und Schwere der Erkrankung einschließlich der Assoziation mit Ausbrüchen.

b Persistenz für infektiöse Stadien in Wasser bei 20 °C: **Kurz** = bis 1 Woche; **Moderat** = 1 Woche bis 1 Monat; **Lang** = länger als 1 Monat.

c Wenn infektiöse Stadien im Wasser frei suspendiert vorliegen, das Wasser mit üblichen Konzentrationen und Kontaktzeiten desinfiziert wird und ein pH-Wert zwischen 7 und 8 vorliegt bedeutet **Gering** = 99 % Inaktivierung bei 20 °C generell in weniger als 1 Minute; **Moderat** = 1-30 Minuten; **Hoch** = über 30 Minuten. Es ist zu beachten, dass Mikroorganismen in Biofilmen vor der Chlorung „geschützt“ sind.

d Nach Bewertung von Experimenten mit Versuchspersonen, aus epidemiologisch-evidenten Studien und aus Studien mit Tieren bedeutet **Hoch** = die infektiöse Dosis beträgt 1-102 Mikroorganismen oder Partikel; **Moderat** = 102-104 Mikroorganismen oder Partikel; **Gering** = > 104 Mikroorganismen oder Partikel.

e Einbezogen sind enteropathogene, enterotoxigene, enteroinvasive, diffus-adhärenzte und enteroaggregative Stämme.

auszulösen. Insbesondere Starkregenereignisse sind mit dem Auftreten wasserassoziierter Infektionen aufgrund der o. a. Bedingungen epidemiologisch häufig assoziiert.

Untersuchungen von Kistemann et al. zeigen, dass im Zusammenhang mit Starkregenfällen kurzfristige, zum Teil nur wenige Stunden umfassende Konzentrationspeaks von Wasser-assoziierten Krankheitserregern in Gewässern, welche als Rohwasser für die Trinkwassergewinnung genutzt werden, feststellbar sind. Werden derartige Peaks nicht durch die mikrobiologische Untersuchung erfasst, werden keine Auffälligkeiten festgestellt (Kistemann et al., 2002).

#### 1.4 Kenntnisse zu über Trinkwasser übertragene Infektionen durch neue Krankheitserreger in Deutschland

In Deutschland gibt es nur wenige Berichte über wasserbedingte Infektionen (Exner and Gornik, 2004; Kistemann, 2003; Merbecks, 2004).

Dies ist zum einen der guten Infrastruktur der Trinkwasserversorgung in Deutschland und einem guten technischen Regelwerk zuzuschreiben.

Andererseits kann auch eine Rolle spielen, dass in Deutschland im Gegensatz zu anderen Ländern im strengen Sinn keine systematische Erfassung wasserübertragener Infektionen durchgeführt wird. Zudem ist die Abklärung wasserbedingter Infektionen zum Teil aufgrund fehlender Mittel in den Gesundheitsämtern unter Nutzung moderner epidemiologischer und mikrobiologischer Untersuchungsverfahren häufig nicht gewährleistet. Weiterhin werden von niedergelassenen Ärzten bei Auftreten von Infektionen durch meldepflichtige Erreger, die durch Trinkwasser übertragen werden können, keine abklärenden mikrobiologischen Untersuchungen veranlasst, sondern direkt therapiert. Entsprechende Gegebenheiten sind bei Legionellen gut beschrieben, weswegen von den tatsächlich auf-

tretenden 20.000-30.000 schweren Legionellenpneumonien nur ca. 2 % tatsächlich beim RKI registriert werden, obwohl eine Meldepflicht besteht (Exner et al., 2011).

Dies muss bei allen Aussagen berücksichtigt werden, die sich mit Prävalenz und Inzidenz Trinkwasser-assoziierte Infektionen befassen, da die o.a. Gegebenheiten zu einer erheblichen Unterschätzung des Ausmaßes wasserbedingter Erkrankungen führen können (Kramer, 2001).

Die Analyse entsprechender wasserassoziierter Ausbrüche in anderen hoch entwickelten Ländern mit besserer struktureller, epidemiologischer und mikrobiologischer Abklärung wasserbedingter Erkrankungen zeigt, dass insbesondere im Zusammenhang mit Starkregenfällen bzw. besonderen klimatischen Bedingungen entsprechende wasserassozierte Ausbrüche aufgrund von unzureichender Aufbereitung oder Leckagen im Wasserversorgungssystem vorkommen.

Die bisher einzigen, in Deutschland eindeutig auf das Trinkwasser zurückzuführenden Norovirusinfektionen, ereigneten sich 2003 in Sachsen. Grund war auch hier die Nichteinhaltung der a.a.R.d.T. bei Baumaßnahmen (RKI, 2004). Weitere europaweite Beispiele für trinkwasserbedingte Ausbrüche mit Rota-, Noro- und Enteroviren sind in der Arbeit von Selinka et al. und Hamza et al. aufgeführt (Hamza et al., 2011b; Selinka et al., 2011).

Der größte trinkwasserbedingte Ausbruch durch Cryptosporidien ereignete sich 1993 in Milwaukee trotz Schnellsandfiltration und ohne Hinweis durch die bakteriologischen Indikatoren bei positivem Cryptosporidiennachweis in Rohwasser und Trinkwasser. Der Ausbruch umfasste mehr als 400.000 Personen mit 4.000 Hospitalisierungen und bis zu 100 Todesfällen, insbesondere bei immunabwehrgeschwächten Personen (Hoxie et al., 1997; Mac Kenzie et al., 1994; MacKenzie et al., 1995).

Erst im April 2014 wurde der größte, trinkwasserbedingte Cryptosporidien-Ausbruch in Schweden mit 27.000 Erkrankungen trotz Schnellsandfiltration beschrieben.

Der größte Trinkwasser assoziierte EHEC-Ausbruch ereignete sich im Jahr 2000 in dem kanadischen Ort Walkerton mit mehr als 2.000 Erkrankungen und mehreren Todesfällen im Zusammenhang mit Starkregenfällen und Einschwemmungen von EHEC-Bakterien in einen unzureichend geschützten Brunnen bei fehlender bzw. nicht funktionierender Desinfektion (Ali, 2004; Auld et al., 2004; Holme, 2003; Hruday et al., 2003; Krewski et al., 2002; Matsell and White, 2009; Moist et al., 2009).

In Deutschland wird nach Regelwerk gefordert, dass bei mikrobiell belastetem Rohwasser der Desinfektion eine partikelentfernende Stufe vorgeschaltet wird, um eine wirksame Desinfektion zu ermöglichen (DIN 2000, DVGW W 290). Es kann auch in Deutschland, insbesondere bei kleineren und mittleren Wasserversorgungen, ein Vollzugsproblem bei der Umsetzung technischer Regeln, wie im Kontext mit einem endemischen Giardiasis-Ausbruch in Deutschland im Jahre 2000, nicht ausgeschlossen werden.

Aktuelle Untersuchungen zeigen zudem, dass nach Einführung einer Filtration bei einer schottischen Wasserversorgung die Seroprävalenz von Antikörpern gegen Cryptosporidien bei Verbrauchern im Versorgungsgebiet deutlich zurückging, was auf den Effekt einer guten Trinkwasserfiltration zurückgeführt wurde (Ramsay, 2014).

Die Erfahrung der letzten Jahrzehnte hat zudem gezeigt, dass jederzeit mit weiteren **emerging pathogens** zu rechnen ist, die ggf. auch über Trinkwasser übertragen werden können.

Neben den erregerspezifischen Aspekten ist zu beachten, dass durch die demographischen Veränderungen unserer Gesellschaft mit einer Zunahme des

Anteils multimorbider, älterer Menschen, auch eine Zunahme der Gefährdung der Bevölkerung durch wasserassozierte Krankheitserreger zu rechnen ist, die z. B. bei Gastrointestinal-Erkrankungen zu einer raschen Dehydrierung führen und somit zu schweren Krankheitsverläufen bzw. Todesfällen führen können.

#### 1.5 Kenntnisse über das Vorkommen von „Emerging Pathogens“ in Gewässersystemen

In den letzten Jahren sind eine Reihe von weiterführenden Untersuchungen zum Vorkommen und zum Verhalten von Viren, Parasiten und Bakterien als wasserassozierte Krankheitserreger durchgeführt worden.

Untersuchungen an Talsperrenzuläufen ergaben erhebliche Zunahmen der mikrobiellen und parasitologischen Belastung mit Cryptosporidien und Giardien im Zusammenhang mit Starkregenfällen, wobei zum Teil erhebliche Unterschiede je nach Einzugsgebiet der Talsperre in Abhängigkeit vom Schutz des Einzugsgebietes gezeigt werden konnten (Kistemann et al., 2002).

Weitergehende Erkenntnisse zu viralen Krankheitserregern wurden in Forschungsprojekten des BMBF, der DFG, des DVGW als auch des Umweltbundesamtes gewonnen, die ebenfalls das Vorkommen von somatischen Coliphagen vergleichend in Fluss- und Talsperrenwässern und das Rückhaltevermögen von Aufbereitungsverfahren wie Flockungsfiltration und Membranfiltration überprüften.

Die Wirksamkeit der Elimination von Viren durch Filtrationsverfahren der Trinkwasseraufbereitung zum Vorkommen von Abwasser belasteten Fließgewässern zeigten zum Teil erheblichen Belastungen von somatischen Coliphagen, die vorübergehend Konzentrationen von mehr als 100.000 Coliphagen/Liter mit charakteristischen Unterschieden von Grasland und



Waldflächen aufwies. Bei der statistischen Überprüfung konnte man bei *E. coli* und coliformen Bakterien sowie heterotrophen Bakterien nur eine Korrelation mit somatischen Coliphagen für Flusswasser ableiten, nicht jedoch für Oberflächenwässer oder oberflächenbeeinflussten Abläufen (Chorus, 2013).

Die Untersuchungen des Umweltbundesamtes zeigten, dass sehr große Unterschiede zwischen den Konzentrationen an Bakteriophagen und Adenoviren in den Rohwässern von Flüssen und Talsperren bestehen. Im Gegensatz zu Konzentrationen an somatischen Coliphagen im Flusswasser mit einer durchschnittlichen Konzentration von etwa 103 PFU/100 ml waren nur in ganz wenigen Wasserproben aus Talsperren geringe Mengen an somatischen Bakteriophagen nachweisbar. Noroviren wurden in den vorliegenden Versuchsreihen in 21 % der Flusswasserproben, aber in keiner der Talsperrenproben nachgewiesen.

Es wird jedoch in dieser Studie darauf hingewiesen, dass während des Untersuchungszeitraumes nur eine sehr geringe Anzahl von Starkregenfällen auftrat und die Datenlage sehr gering ist.

Entsprechende Untersuchung von Coliphagen in Talsperrenwasserzuläufen ergaben jedoch, dass bei Starkregenfällen vorübergehend die Konzentration von Coliphagen (Exner persönliche Mitteilung) deutlich ansteigen kann, wofür auch die entsprechenden Flusswasseruntersuchungen von Franke et al. (Franke et al., 2009) hinweisen.

Zudem zeigten die Untersuchungen des UBA eine deutlich höhere Persistenz von Viren gegenüber den gängigen bakteriellen Indikatoren.

Die Vergleiche der Abnahme der Konzentration von Bakterien, Bakteriophagen und humanpathogenen Viren im offenen und in den Licht-geschützten Gerinnen zeigten, dass Umweltfaktoren wie Temperatur, Sonneneinstrahlung einen viel größeren Einfluss auf

das Überleben von Viren in offenen Oberflächengewässern haben als auf Indikatorbakterien. Im Gegensatz zu den Indikatorbakterien zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung in der Tenazität humaner Adenoviren mit somatischen Coliphagen. In der Zusammenfassung des UBA-Berichtes heißt es, in diesem Forschungsprojekt in Ergänzung zum etablierten System mit Indikatorbakterien wären daher, sowohl für Untersuchungen an Badegewässern als auch für die Überwachung von Rohwässern, für die Trinkwasseraufbereitung zusätzliche Indikatoren für virale Verunreinigungen sehr hilfreich.

Untersuchungen zum Rückhaltevermögen durch Flockungsfiltration bzw. Ultrafiltration zeigten erhebliche Unterschiede im Rückhaltevermögen in Abhängigkeit von der Virusgröße und den Wassercharakteristika. Bei den Untersuchungen mit der Ultrafiltrationsmethode wurden bei den kleinen Phagen nur 1-3 log-Stufen Reduktion erzielt, wohingegen bei murinen Noroviren die Reduktionsrate bei 3-4 log-Stufen lag.

Das Umweltbundesamt hat ein Entscheidungsunterstützungssystem (EUS) entwickelt, das den Betreibern von Uferfiltrationsanlagen die Bewertung der Eliminationsleistung ihres Systems im Hinblick auf das Vorkommen von Viren im Uferfiltrat erleichtern kann ([www.viren-im-wasser.de](http://www.viren-im-wasser.de)). Zudem wurde der weitere Forschungsbedarf präzisiert.

Unter Berücksichtigung des Besorgnisgrundsatzes, der in § 37 (1) des IfSG formuliert ist, müssen daher alle Anstrengungen unternommen werden, um die Sicherheit bei der Verifizierung der hygienisch-mikrobiologischen Trinkwasserqualität weiter zu optimieren.

Diese neuen Erkenntnisse sind neben der zum Referentenentwurf zur Trinkwasserverordnung gegebenen Begründung Anlass, das hygienisch-mikrobiologische Überwachungskonzept zur Sicherung der Trinkwasserqualität auch im Rahmen der Fördermaßnahme RiSKWa wissenschaftlich zu überprüfen.

## 1.6 Vorschläge zur Neukonzeptionierung der Wasserüberwachung

In der Begründung zum Referentenentwurf zur ersten Verordnung zur Änderung der Trinkwasser-Verordnung (Bearbeitungsstand 07.07.2010) heißt es:

*„Ergibt die **Besichtigung eine Feststellung der Besorgnis von Kontaminationen des Rohwassers in der Schutzzone oder der Wasserfassungsanlage, können entsprechende Untersuchungen zur Bestimmung der Rohwasserqualität durchaus angezeigt sein. Dies betrifft insbesondere Oberflächenwasser und Oberflächenwasserbeeinflusste Grundwässer, die u. a. durch Abwassereinfluss fäkal belastet sein können. Für solche Fälle muss beachtet werden, dass zur Gefährdungsanalyse die Untersuchung des Rohwassers auf Indikatorparameter E. coli und Enterokokken nicht ausreicht, da manche Krankheitserreger z. B. Parasitendauerform und persistente Viren in der Umwelt länger überdauern als diese Indikatoren und auch die Aufbereitungs- und Desinfektionsverfahren überstehen können. Allerdings ist gerade für diese Erreger der***

*Nachweis im Trinkwasser kaum sinnvoll, denn die dafür zurzeit zur Verfügung stehenden mikrobiologischen Analysemethoden erreichen die erforderliche Bestimmungsgrenze (im Trinkwasser) nicht. Eine Risikoabschätzung erfordert daher die Untersuchung auf die o. g. Krankheitserreger in Kombination mit der Eliminierungseffektivität der Aufbereitung. Letztere wurden z. B. in den WHO-Guidelines – „Guidelines for drinking water quality“ – 2004 publiziert. Ein solches Vorgehen entspricht auch den Empfehlungen der WHO zur Risikoabschätzung bei der Trinkwassergewinnung und -aufbereitung („water safety plan“). Die Mitteilung relevanter Ergebnisse dient also auch hier dem Gesundheitsamt zur Risikoanalyse, die u. U. auch die Anordnung einer effektiveren Aufbereitung, angepasst an die Rohwasserqualität nach sich zieht.“*

Hierbei wird ausdrücklich auf die Guidelines for drinking water quality der Weltgesundheitsorganisation hingewiesen.

Die neuen Vorschläge zur Neukonzeptionierung sind in den Guidelines for drinking water quality der WHO enthalten, wobei die WHO in diesen Guidelines unter Bezug auf das

■ **Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA)** und

■ **DALY-Konzept**

eine theoretische Risikoeinschätzung für unterschiedliche Krankheitserreger gibt.

Bei dem **Quantitative Microbial Risk Assessment (QMRA)** handelt es sich um eine Methode, um Risiken durch spezifische Gefährdungen aufgrund unterschiedlicher Expositionswege zu ermitteln. Die quantitative mikrobiologische Risikobeurteilung ist die Anwendung von Prinzipien der Risikobeurteilung hin zu der Abschätzung von Konsequenzen für die geplante oder aktuelle Exposition gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Mikroorganismen (Medema, 2006; Medema et al., 2003). Eine Einführung in das Quantitative Microbial Risk Assessment findet sich beim Center for Advancing Microbial Risk Assessment, worauf ausdrücklich verwiesen wird ([www.camra.msu.edu](http://www.camra.msu.edu)).

Die **Grundprinzipien des DALY-Konzeptes** sind bei Schmoll et al. ausführlich dargestellt, worauf ebenfalls ausdrücklich verwiesen wird (Schmoll, 2012).

Nach § 5 Absatz 1 der Trinkwasser-Verordnung heißt es, wie bereits erwähnt:

„Im Trinkwasser dürfen Krankheitserreger im Sinne des § 2 Nr. 1 des Infektionsschutzgesetzes, die durch Wasser übertragen werden können, **nicht in Konzentrationen** enthalten sein, die eine Schädigung der menschlichen Gesundheit besorgen lassen.“

Hierzu ist jedoch ein maximal vertretbares Bezugsrisiko zu formulieren, um abzuklären, welche Erregerkonzentration im Trinkwasser tatsächlich zulässig ist, unterhalb derer im Sinne von § 5 der Trinkwasser-Verordnung keine unverträgliche Gesundheitsschädigung zu besorgen ist. Ein derartiges maximal vertretbares Bezugsrisiko ist in Deutschland bislang nicht festgelegt, da dies als staatliche Aufgabe angesehen wird.

Das Umweltbundesamt hat nach Anhörung der Trinkwasserkommission hierzu eine Empfehlung mit dem Titel „Vorgehen zur quantitativen Risikobewertung mikrobiologischer Befunde im Rohwasser sowie Konsequenzen für den Schutz des Einzugsgebietes und die Wasseraufbereitung“ 2014 herausgegeben, auf welche ausdrücklich verwiesen wird.

Dies bedeutet, dass mit dem jetzt noch praktizierten hygienisch-mikrobiologischen Überwachungsmodell nur dann eine relative Sicherheit gegeben werden kann, wenn zugleich auch eine weitergehende Überwachung des Rohwassers mit Bestandteil des Überwachungskonzeptes ist.

Neben den durch Abwasser und Rohwasser in die Wasseraufbereitung eingetragenen relevanten Erregern spielen zusätzlich natürlicherweise im Trinkwas-

ser vorkommenden Erreger eine Rolle, die sich primär im Trinkwasser der Hausinstallationen vermehren können. Hierzu zählen Legionellen und *Pseudomonas aeruginosa*.

Während zu *Pseudomonas aeruginosa* in der Trinkwasser-Verordnung keine näheren Ausführungen gemacht werden, werden zu Legionellen in der Trinkwasser-Verordnung detaillierte regulatorische Angaben, insbesondere auch zu quantitativ mikrobiologischen Anforderungen, gegeben. Für Legionellen werden in der Trinkwasser-Verordnung jedoch nur kulturelle Verfahren für den sog. „technischen Maßnahmenwert“ genannt. Nach Trinkwasser-Verordnung müssen Legionellen bis zu zehn Tage bebrütet werden. Diese langen Kulturzeiten sind jedoch bei der raschen Bewertung des Vorkommens von Legionellen in Trinkwasserinstallationssystemen hinderlich. Aus diesem Grund ergibt sich die Notwendigkeit zu hinterfragen, inwieweit weitere Untersuchungsverfahren zu einer rascheren Analytik und zu zeitnahen Ergebnissen führen können.

Aus diesem Grunde werden diese Aspekte auch in den nachfolgenden dargestellten Projekten der Fördermaßnahme RiSKWa behandelt.

*P. aeruginosa* stellt neben Legionellen in medizinischen Einrichtungen und für prädisponierte Personen ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar. Zahlreiche nosokomialen Infektionen im Zusammenhang mit der Kontamination des Trinkwasserinstallationsnetzes in medizinischen Einrichtungen sind mittlerweile sehr gut dokumentiert. Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* über eine erhebliche natürliche Antibiotikaresistenz. Aus diesem Grunde ist es notwendig, sich mit diesen Fragen, wie nachfolgend dargestellt, wissenschaftlich auseinander zu setzen.

## 1.7 Antibiotika-resistente Bakterien und Wasser

Bislang ist – wie bereits erwähnt – in den Regulierungen das Problem Antibiotika-resistenter Erreger nicht berücksichtigt worden, obwohl diese Thematik als eine der relevanten „emerging pathogen challenges“ anzusehen ist, da hierzu bislang ausreichende systematische wissenschaftliche Untersuchungen weitestgehend fehlen. In der Tierhaltung wurden in Deutschland nach Angaben des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) im Jahr 2012 ca. 1619 Tonnen Antibiotika eingesetzt. Somit werden 85 % der Antibiotika, die in Deutschland eingesetzt werden, in der Tierhaltung verbraucht (Meyer et al., 2013). Damit nimmt Deutschland immer noch eine Spitzenposition im europäischen Durchschnitt ein. In der Humanmedizin nehmen Antibiotika seit vielen Jahren eine Spitzenposition unter den verordnungsstärksten Wirkstoffgruppen ein. Im Jahr 2011 wurden 38 Mio. Verordnungen mit 358 Mio. Tagesdosen und einem Umsatz 684 Mio. € bei ambulant verabreichten Antibiotikaklassen gezählt. Penicillin-Derivate, Tetracycline und Makrolide wurden dabei am häufigsten verordnet (GERMAP 2012). Sowohl in der Tierhaltung als auch in der Humanmedizin gilt, dass dort wo Antibiotika eingesetzt werden, auch die Verbreitung von Resistenzen zunehmen.

Die phänotypische Antibiotikaresistenz-Definition basiert weitgehend auf klinischen Standards und festgelegten Schwellenwerten („breakpoints“; e.g. EUCAST oder Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)). Der Gebrauch solcher klinischen Schwellenwerte legt fest, ob ein Bakterium für ein Antibiotikum sensitiv oder resistent ist, also ein Therapieerfolg oder -versagen zu erwarten ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eine Nutzung dieser klinischen Schwellenwerte definiert für die Behandlung von Patienten für Umweltbakterien mit klinischer Relevanz eine adäquate Vorgehensweise ist. Alternative Vorgehensweisen könnten für die Interpretation von Antibiotikaresisten-

zen bei Umweltbakterien aussagekräftiger sein. Der „epidemiological cut-off (ECOFF)“ Wert basiert dabei auf dem Empfindlichkeitsprofil einer Wildtyp-Population (Kahlmeter G., 2014).

Generell zeichnen sich Mikroorganismen durch eine außerordentlich hohe Anpassungsfähigkeit an vielfältigste Lebensbedingungen in der aquatischen Umwelt aus. Diese Anpassungsfähigkeit beruht auf einer großen genetischen und metabolischen Flexibilität und Vielfalt. Diese genetischen Informationen zur Antibiotikaresistenz bleiben nicht nur begrenzt in einer Bakterienspezies, sondern können über mobile genetische Elemente (z.B. Plasmide, Transposons, Integrons) zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies ausgetauscht werden (horizontaler Gentransfer).

Neben Viren, Pilzen und Parasiten sind rund 200 Bakterienarten als obligat-pathogene Krankheitserreger, fakultativ-pathogene oder opportunistisch-pathogene Bakterien (bedingt krankmachende Bakterien, z.B. bei geschwächtem Immunsystem) des Menschen bekannt. Diese Krankheitserreger oder opportunistisch-pathogene Bakterien können über Abwasserwege oder landwirtschaftliche Abschwemmungen zu einer Kontamination von Wasserressourcen und indirekt oder direkt zu einer Beeinflussung der menschlichen Gesundheit führen. Im Gegensatz zu chemischen Belastungen, für die bereits Risikoabschätzungen für die verschiedenen Umweltkompartimente durchgeführt werden können, ist bei bakteriellen Kontaminationen aufgrund der unterschiedlichen biologischen Aktivitäten und Verhaltensweisen der Mikroorganismen einerseits und des Immunsystems des Menschen andererseits eine vergleichbare Risikoabschätzung nur schwer möglich.

Pharmazeutika werden über Ausscheidungen von Mensch und Tier und durch unsachgemäße Entsorgung in die aquatische Umwelt eingetragen. Humanpharmazeutika wie Antibiotika gelangen über Abwasser privater Haushalte und Krankenhäuser zunächst



in die kommunalen Kläranlagen. Antibiotika sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, denn momentan ist noch nicht abschätzbar, ob und in welchem Ausmaß ihr Vorkommen in Abwässern zu einer Ausbreitung von Resistenz-Determinanten in potentiell humanpathogenen Mikroorganismen beiträgt. Obwohl die Antibiotika-Konzentrationen, die im Abwasser gefunden wurden, größtenteils deutlich niedriger waren, als die im medizinischen Bereich geltenden „Breakpoint“-Konzentrationen zur klinischen Kategorisierung in „resistent“ oder „empfindlich“, beeinflussen sie in erster Linie sensitive Bakterien und selektieren möglicherweise somit resistente Mikroorganismen in der aquatischen Umwelt. Versuche mit sub-letalen Konzentrationen von Antibiotika haben in früheren Arbeiten gezeigt, dass diese u.a. Biofilmwachstum induzieren, bakterielle Stressantworten wie den Übergang in den sog. Viable But Not Culturable Status (VBNC) auslösen und Mutationen induzieren, die zu einer Erhöhung der minimalen Hemmstoffkonzentration führen können. Außerdem können sogar Antibiotika-Me-

tabolite in picomolaren Konzentrationen, wie sie fast ubiquitär in der aquatischen Umwelt detektiert werden, bereits nach wenigen Minuten Exposition eine Resistenz gegen andere Antibiotikaklassen induzieren (Heß & Gallert, 2014).

Die Spurensuche nach Haupteintragsquellen resistenter Bakterien führt von Kliniken ausgehend weiter in die Kläranlage. Kliniken mit Intensivstationen und die angeschlossenen kommunalen Kläranlagen werden als eine wichtige Eintragsquellen von resistenten und multi-resistenten Bakterien und als „hot spots“ für den Transfer von Resistenzgenen unter aquatischen Bakterien diskutiert.

Aktuell konnte das Abwassersystem einer Klinik in Südhessen als ursächliches Infektionsreservoir für hoch promiskuitive Plasmide, über die eine KPC 2-Carbapenemase auf unterschiedliche Enterobacteriaceae übertragen wurde, identifiziert werden, wovon mehr als 130 Patienten betroffen waren. Durch Abwasser absichernde Maßnahmen konnte der Ausbruch unter Kontrolle gebracht werden. Insbesondere dieser in Deutschland beschriebene Ausbruch zeigt, welche erhebliche Bedeutung dem Abwassersystem als Reservoir für Antibiotikaresistenzen zukommen kann (Carstens et al., 2014).

Neben den kommunalen Kläranlagen ist die Landwirtschaft eine weitere wichtige Eintragsquelle für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt (Cantas et al., 2013). Hier ist die Ausbringung von Gülle zu benennen, die mit Antibiotika und Antibiotika-resistenten Mikroorganismen belastet sein kann. In der Aquakultur werden ebenfalls hohe

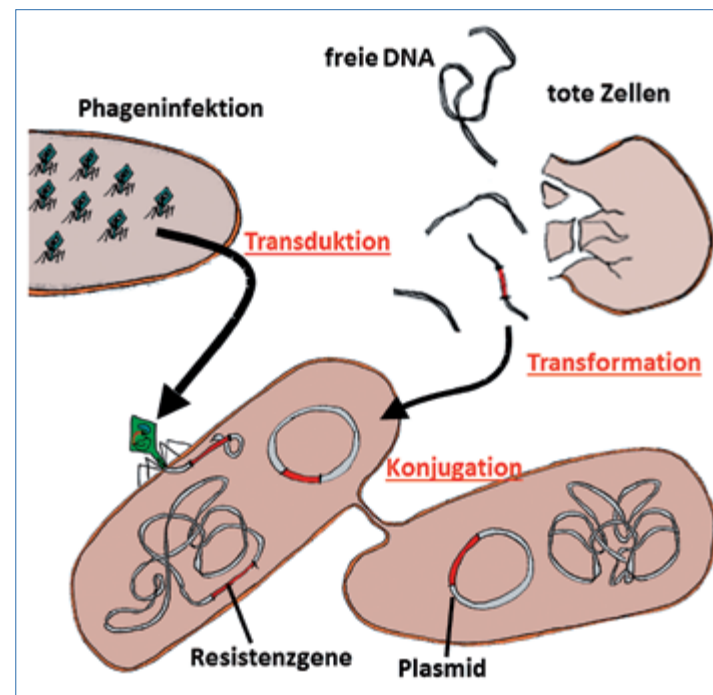


Abbildung 1: Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Antibiotika-Konzentrationen eingesetzt, die direkt in die Umwelt gelangen und dort zur Resistenzentwicklung beitragen. Über die Tiermast und die Lebensmittel können Antibiotika-resistente direkt zum Menschen gelangen und aufgenommen werden („from farm to fork“) und stellt sicherlich eine der Hauptübertragungswege auf den Menschen dar.

Für den Menschen von unmittelbarer Bedeutung ist die Einnahme von Antibiotika im Therapiefall, wenn diese Wirkstoffe nicht nach Vorschrift eingenommen werden und dadurch die Entwicklung von Resistenzen begünstigt werden. Letztlich gelangen Antibiotika und resistente Keime dann über die Exkremente in das kommunale Abwassersystem. Für einige hygienisch relevante Keime ist im Belebtschlammbecken der biologischen Klärstufe Endstation. Keinesfalls jedoch für alle und nicht für Resistenz-Gene. Jede Belebtschlamm-Flocke gleicht einem Mikrokosmos mit Abermillionen verschiedenster Bakterien. Hier steigen die Resistenz-Gene von einer Bakterienzelle auf andere Bakterienzellen um. Sie liegen häufig auf mobilen genetischen Elementen, sogenannten Plasmiden, Transposons, Integrons, die unter Bakterien weitergegeben bzw. ausgetauscht werden. Nicht nur innerhalb einer Familie, sondern auch an „fremde“ Bakterien-Spezies. So kommt das Resistenz-Gen in Keime, die selbst gar keinen Kontakt zu einem Antibiotikum hatten.

Ein solcher horizontaler Gentransfer kann über drei Mechanismen in Bakterien in der aquatischen Umwelt ablaufen (Abbildung 1).

1) Bakterien können genetische Informationen durch Aufnahme von Fremd-DNA z.B. aus freigesetzter DNA aus toten Bakterien aufnehmen und in ihr Erbgut integrieren. Ein Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird. Ist die freie DNA an Partikeln oder in Biofilmen gebunden, so ist sie zudem wesentlich stabiler und vor einem Abbau geschützt.

2) Der zweite Mechanismus wird als Konjugation bezeichnet, bei dem ein Zell-Zell-Kontakt Voraussetzung ist. Hier werden genetische mobile Elemente über Zellstrukturen direkt zwischen den Bakterien weitergegeben. Auch hier ist die hohe Zelldichte und -diversität eine Voraussetzung, wie sie in Abwassersystemen oder Biofilmen vorzufinden ist.

3) Die Transduktion ist der dritte Mechanismus, über den ein horizontaler Gentransfer möglich ist. Dabei spielen Phagen eine wesentliche Rolle. Teile des Erbguts einer Phagen befallenen Bakterienzelle werden in das Erbgut des Phagen integriert und nachträglich bei einer erneuten Infektion einer Bakterienzelle dort in das Erbgut integriert. Letztlich funktioniert der Phage als Transportvehikel von Fremd-DNA.

Hohe Zelldichten und Zelldiversitäten und weitere bekannte Abwasser- und Umwelt-spezifische Parameter wie z.B. relevante Magnesium/Calcium-Konzentrationen, Veränderungen in der Nährstoffversorgung, Phosphat-Konzentrationen begünstigen einen solchen Gentransfer. Das aufbereitete Abwasser kann somit zahlreiche Bakterien enthalten, die jetzt Resistenzgene tragen. Sie gelangen in die aquatische Umwelt, ohne dass man weiß, welches Risikopotential im Hinblick auf Vermehrung, Selektion und Gentransfer sich daraus ergeben kann. In diesem Zusammenhang ist auch die Relevanz für die Trinkwasserversorgung zu sehen. Der Schutz von Rohwässern der Trinkwasseraufbereitung vor Kontaminationen mit Krankheitserregern und bakteriellen Trägern von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen dient der allgemeinen Gesundheitsvorsorge, da zum jetzigen Zeitpunkt nicht abgeschätzt werden kann, von wem und unter welchen Bedingungen klinisch relevante Antibiotikaresistenzen auch in Trinkwasser vorhandenen Bakterien z.B. in Aufbereitungsprozessen übertragen werden können.

Die WHO (World Health Organisation) beschreibt das Auftreten und die Verbreitung von Antibiotikaresisten-

zen als globales Problem mit dem die Menschheit in Zukunft in verstärktem Maße konfrontiert sein wird. So heißt es in dem Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014 der WHO: "WHO's first global report on antimicrobial resistance, with a focus on antibiotic resistance, reveals that it is no longer a prediction for the future. Antibiotic resistance – when bacteria change and antibiotics fail – is happening right now, across the world". Aktuelle Patientendaten des Robert Koch Institutes belegen einen deutlichen Nachweis von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in Pathogenen im Klinikbereich (<https://ars.rki.de>, data status: 28.01.2014).

Von daher sind intensive Untersuchungen zur Erkennung und Überwachung von Bereichen, die zur Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien beitragen, außerordentlich notwendig. Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen ist dabei ein höchst kritisches Beispiel der mikrobiologischen Evolution mit großer Relevanz für den Human- und auch für den Veterinärbereich, da bei bestehender multipler Resistenz eine Behandlung mit Antibiotika im Infektionsfalle eingeschränkt wird. D.h. diese Problematik besitzt direkte Auswirkung für unsere Gesellschaft.

Der Anstieg der Antibiotikaresistenzlage ist ursächlich durch den hohen Einsatz von Antibiotika bedingt. Für den Anstieg der Häufigkeiten von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt können vier wichtige Mechanismen genannt werden (i) der horizontale Gentransfer von Antibiotikaresistenzgenen; (ii) die Selektion von resistenten Bakterien durch antimikrobielle Reststoffe (auch in geringen Konzentrationen) oder andere Verunreinigungen wie Schwermetalle, (iii) genetische Prädispositionen in Bakterien für Genmutationen und Rekombinationen und (iv) die Verbreitung von resistenten Organismen aus humanen und tierischen mikrobiellen Begleitorganismen, die durch eine Antibiotika-Behandlung im Wirtsorganismen bereits eine Anpassung/Resistenz erworben haben. Diese ge-

nannten Mechanismen verändern die Resistenzlagen einerseits durch gerichtete molekulare Prozesse, die gezielt eine Anpassung an ein sich geändertes Umweltmilieu bewirken, und andererseits durch ungerichtete, spontane genetische Ereignisse.

## 2.1 Krankheitserreger (Mikroorganismen, Parasiten, Viren) und deren Indikatoren

Für Bakterien existieren in den einschlägigen Regulierungen für Trinkwasser ausschließlich kulturelle Untersuchungsverfahren, die jedoch nicht alle Zustände, in denen Bakterien zu überleben verstehen, sicher erfassen (s.u. u.a. Ausführungen zu qPCR und VBNC).

**Zu Parasitendauerformen:** Bisher durchgeführte Untersuchungen zum Vorkommen von Parasitendauerformen, insbesondere in Trinkwasser-Talsperrensystemen, zeigten, dass bei Abwassereinfluss vorzugsweise mit Giardien, bei Weidewirtschaft und tierischen Abspülungen mit Cryptosporidien zu rechnen ist. Auch Parasiten aus Tierkot können jedoch Menschen infizieren. Weitere Informationen zum Vorkommen von Parasitendauerformen und der Vermeidung von Belastungen des Roh- und Trinkwassers mit Parasiten können der UBA-Empfehlung von 2001 und weiterer Literatur entnommen werden (Richardson et al., 1991; Mac Kenzie et al., 1994; Atherton et al., 1995). Ihr Nachweis kann mit dem genormten Verfahren nach ISO 15553 erfolgen (Jones et al., 1996). Durch Validierungsuntersuchungen wurde nachgewiesen, dass mit der angegebenen Methode eine Wiederfindungsrate von 60 – 70 % zu erreichen ist (Kistemann, 1997).

**Zu enterale, humanpathogene Viren:** In der Literatur sind die unterschiedlichsten Methoden zur Quantifizierung von enteralen, humanpathogenen Viren genannt (Hamza et al., 2014). Die Standardmethode zum Nachweis der Viren im Wasser ist die Real-Time PCR. Sie hat jedoch den Nachteil, dass sie Genomfragmente detektiert und somit nur bedingt Hinweise auf die Konzentration der infektiösen Viren liefert. Goldstandard für die Analyse infektiöser Viren in einer Wasserprobe ist die „integrated cell culture“ – PCR (ICC-PCR). Sie ist bereits für eine Vielzahl von Viren etabliert und hat, im Vergleich zur Zellkultur den Vorteil, dass die positiven Aspekte der Zell-

kultur und der PCR kombiniert werden (Reynolds et al., 1996).

Im Rahmen des PRiMaT Projektes wurde die Möglichkeit untersucht, ob mittels Luminex Verfahren eine Bestimmung der Konzentration von infektiösen Viren möglich ist. Der Nachweis der Viren erfolgt hierbei über an magnetische Mikrosphären gebundene virus-spezifische Antikörper. Eine Quantifizierung ist durch die Bindung von Fluorochromen an diese Antikörper möglich. Abschließend stellte sich heraus, dass die Luminex Methode zwar die nötige Spezifität jedoch im Oberflächenwasser nicht die entsprechende Sensitivität aufwies (Hamza et al., 2014). Eine alternative Methode sind die beiden Stoffe EMA (Ethidium Monoazid) und PMA (Propidium Monoazid) (Nocker et al., 2007). Bei beiden Stoffen handelt es sich um Nukleinsäure-interkalierende Substanzen, die sich bei defekter Zellmembran oder Kapsid, irreversibel mit dem mikrobiellen Genom verbinden und eine nachfolgende PCR und somit auch eine Quantifizierung inhibieren. Umweltfaktoren wie z. B. Temperatur und pH Wert beeinflussen diese Art der Untersuchung nicht. Dahingegen können UV Strahlen das virale Genom beschädigen und eine Bindung der Substanzen verhindern.

Eine weitere Möglichkeit die Konzentration infektiöser Viren in einer Probe zu bestimmen ist die Vorbehandlung der Probe mit Enzymen. Die Proben werden in einem ersten Schritt mit Proteasen behandelt, die vor allem geschädigte virale Kapside verdauen. In einem zweiten Schritt werden Nukleasen verwendet, um ungeschützte Nukleinsäure abzubauen (Nuanalsuwan and Cliver, 2002). Weitere mögliche Methoden zur Analyse infektiöser Viren in Gewässerproben sind in der Arbeit von Hamza et al. vergleichend gegenübergestellt (Hamza et al., 2011a).

**Zu somatischen Coliphagen:** Diese sind Viren, die *E. coli* befallen und in ihrer Struktur humanpathogenen Viren ähnlich sind. Sie eignen sich zur Klärung der Frage, inwieweit eine Belastung des Rohwassers mit

humanpathogenen Viren vorliegt, da sie deren Verhalten in der Umwelt und unter den Bedingungen der Wasseraufbereitung besser widerspiegeln als die bakteriellen Indikatororganismen. Auch können somatische Coliphagen länger zurückliegende fäkale Verunreinigungen anzeigen, bei denen die bakteriellen Indikatoren bereits inaktiviert wurden, während humanpathogene Viren noch überlebt haben können.

Coliphagen können, müssen aber nicht menschlichen Ursprungs sein. Sie entstammen dem Magen-Darm-Trakt von Warmblütern, sind selbst jedoch nicht pathogen. Mit dem Vorkommen humanpathogener Viren korrelieren Coliphagen nur bei hohen Konzentrationen, z. B. im durch Abwasser belasteten Flusswasser. So wurde in fäkal verunreinigtem Oberflächenwasser ein Verhältnis von etwa 1000:1 oder mehr Coliphagen zu humanen enteralen Viren beschrieben (Kukkula et al., 1997). Daten aus verschiedenen Gewässern zeigen jedoch, dass wenn humanpathogene Viren – z. B. Adeno- oder Rotaviren – gefunden werden, die Coliphagen-Konzentrationen mindestens 10- bis 100-fach höher lagen (Tillett et al., 1998; Kukkula et al., 1999; Nurgalieva et al., 2002). Coliphagen werden aber wie *E. coli* immer mit Fäkalien ausgeschieden, während humanpathogene Viren nur von infizierten Personen mit dem Stuhl ausgeschieden werden.

Da der Zweck der Untersuchung auf somatische Coliphagen die Indikation eines möglichen Vorkommens humanpathogener Viren ist, kann diese Untersuchung entfallen, sofern aufgrund der Gegebenheiten im Einzugsgebiet eine humane Fäkalbelastung auszuschließen ist.

**Zu pathogen-opportunistischen Bakterien:** Mit Kulturverfahren wird der im Mikrobiom überwiegender Teil nicht kultivierbarer Bakterien nicht erfasst. Mit Ausnahme von *Clostridium perfringens* werden Anaerobier üblicherweise nicht nachgewiesen. Ebenso ist es nicht möglich, Bakterien zu erfassen, die sich in einem nicht-kultivierbaren physiologischen Stadium

(viable but not cultivable; VBNC) befinden. Eine Vielzahl von hygienisch relevanten Bakterien kann, z.B. unter Stressbedingungen, ein solches VBNC-Stadium einnehmen und ist damit lebend, aber nicht mehr im Kulturverfahren nachweisbar. Ihr Risikopotential bleibt jedoch erhalten, da sie unter geeigneten Bedingungen ihre Vermehrungsfähigkeit wieder erlangen. Weiterhin können langsam wachsende Bakterien wie zum Beispiel Mykobakterien, nur schwer aus Umweltproben isoliert werden, da sie häufig von der Begleitflora im Wachstum behindert oder überwachsen werden. Wie bereits erwähnt schreibt derzeit die Trinkwasserverordnung ausschließlich kulturelle Verfahren auch für Legionellen vor, die jedoch eine sehr lange Bebrütungszeit von bis zu 10 Tage erfordern. Dies kann insbesondere bei Legionellen-bedingten Ausbrüchen nachteilig für eine rasche, zeitnahe Erkennung von Infektionsreservoirs sein. Insofern ist es sinnvoll, sich mit weiteren Verfahren für den quantitativ mikrobiologischen Nachweis von Legionellen aber auch für *P. aeruginosa* zu befassen.

Hierbei sind vor allem molekularbiologische, PCR-basierte Verfahren zu nennen. Vielfach wird bei den fachlichen Diskussionen der Einwand erhoben, dass die Molekularbiologie nicht zwischen lebenden und toten Bakterien oder freier DNA unterscheiden kann, da die DNA ubiquitär vorhanden ist. Die Weiterentwicklung der Molekularbiologie bietet jedoch kommerziell erhältliche Verfahren an, die genau dieses Dilemma löst. Gezielt wird die DNA toter oder stark geschädigter Bakterien bzw. freie DNA für die PCR blockiert oder enzymatisch verdaut, so dass letztlich nur noch die DNA der lebenden und damit vermehrungsfähigen Bakterien dem PCR-Nachweis zur Verfügung steht (Varela-Villarreal et al., 2013; Nocker et al 2007).

## 2.2 Antibiotikaresistenzen

### Kulturverfahren

Antibiotikaresistenz-Testungen mit Hilfe von Kultur-basierten Methoden sind weltweit in klinischen Bereichen für die Therapie bei bakteriellen Infektionen bereits standardisiert (CLSI, 2012; EUCAST 2013; WHO, 2008; Wiegand 2008). Weitere Vorteile der Kultur-basierten Nachweisverfahren ist der Nachweis von lebenden Mikroorganismen und deren Vermehrungspotential unter geeigneten Bedingungen. Aufgrund der Robustheit und der einfachen Handhabung der Kulturverfahren können Langzeitstudien mit geringem apparativem Aufwand und Kosten betrieben werden, und ermöglichen auch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien. Insbesondere auch der Vergleich der Daten zwischen Laboratorien, welche mit klinischen bzw. Umweltisolaten arbeiten, da derzeit im klinischen Bereich vorwiegend Kulturverfahren genutzt werden. Jedoch ist hier zu beachten, dass die Datengrundlage aufgrund derer eine Resistenz beurteilt wird, im Wesentlichen auf klinischen Isolaten beruht. Die Analyse der Umweltisolate greift auch auf diese Datengrundlage zurück, dies kann jedoch zu falschen Interpretationen führen, da unklar ist ob die Grundmuster der klinischen Isolate mit denen der Umweltisolate vergleichbar sind.

Wenngleich diese Kulturverfahren einiger Anpassungen an die Probematrix erfahren müssen, beziehen sie sich auf die Richtlinien aus den klinischen und veterinärmedizinischen Bereichen (z.B. EUCAST, 2013; CLSI, 2007; DANMAP, 2011). Die Membranfiltration aus der Wassermikrobiologie wird vielfach genutzt, um so isolierte Bakterien zur weiteren Antibiotikaresistenz-Testung zu untersuchen. Der Gebrauch von Selektivnährböden erlaubt eine Koloniezahlbestimmung spezifischer Bakteriengruppen, wie z.B. Coliforme oder Enterokokken als Indikatoren der Wasserqualität. Als Reinkulturen werden diese Isolate identifiziert und ihre Antibiotikaresistenzmuster erfasst. Die Antibio-

tikaresistenz-Testung basiert auf den häufig verwendeten Agardilutions- oder Bouillondilutionstests. Die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen leiten sich aus den klinischen genutzten Minimalkonzentrationen zur Wachstumsinhibition (MHK) des Zielorganismus unter Standardbedingungen ab und diskriminieren zwischen resistenten und sensitiven kultivierbaren Organismen (z.B.: CLSI, 2012; EUCAST, 2011). In diesen Fällen kann man das Verhältnis von sensitiven zu resistenten Bakterien erfassen, in dem man die Koloniezahlen aus Kulturen mit Antibiotika mit den Zahlen aus Kulturen ohne Antibiotika vergleicht. Die genannte Herangehensweise erlaubt eine Abschätzung der jeweiligen Resistenzlage für die Zielorganismen in den Umweltkompartimenten und dient der Anreicherung von resistenten und multi-resistenten Bakterien.

Diese kulturellen Methoden sind Arbeits- und zeitaufwendig und haben dadurch oftmals die Entwicklung von Vereinfachungen in der Umweltmikrobiologie zur Folge. Eine solche Anpassung ist z.B. der **Gebrauch von Selektivnährböden**, die bereits mit Antibiotika angereichert wurden, deren Konzentrationen für die jeweiligen Zielorganismen in den klinischen Richtlinien aufgelistet sind. Die Wahl der Nährböden weicht jedoch von dem vorgeschriebenen Nährboden aufgrund der fehlenden Selektivität oftmals ab und kann dadurch das Ergebnis der Resistenztestung beeinflussen. Mögliche Interaktionen von Komponenten der verwendeten Selektivnährböden mit den zugesetzten Antibiotika und mögliche Wechselwirkungen der zugesetzten Begleitflora mit den zugegebenen Antibiotika (mögliche Bio-Transformation) bleiben unberücksichtigt bzw. die Ergebnisse müssen durch zusätzliche Synergie-Tests abgesichert werden.

Für den Umweltbereich sind Kulturmethoden nur mit Einschränkungen geeignet, natürlicherweise vorhandene (intrinsischen) Resistenzen von erworbenen Resistenzen zu unterscheiden, da oftmals die entsprechenden Wildtyp-Stämme der Umweltisolate nicht charakterisiert sind. Hinzu kommt, dass über 90 %



der natürlichen Bakterienpopulation auf synthetischen Medien nicht kultiviert werden. Dazu sind molekularbiologische Methoden geeignet, die ganz gezielt Resistenzdeterminanten qualitativ und quantitativ in einem Umwelthabitat erfassen können, und damit das Dilemma der Nichtkultivierbarkeit umgehen können. Allerdings ist der alleinige Nachweis einer Resistenzdeterminante noch keine Beweis für deren tatsächliche Aktivität bzw. einer gesteigerten Aktivität von intrinsischen Komponenten wie Effluxpumpen. Hier sind phänotypische Untersuchungen wieder notwendig.

Zudem sind derzeit Kulturmethoden notwendig, um Multiresistenzen nachzuweisen. Nach derzeitiger Definition gilt z.B. ein Enterobakterien-Isolat aus dem ambulanten Bereich dann als multiresistent, wenn es gegen mindestens drei Antibiotikagruppen resistent ist (KRINKO, Bundesgesundheitsblatt, Ausgabe 55/2012). Der wesentliche Vorteil der kulturbasierten Methode ist dabei, dass die detektierten Resistenzen genau einem Isolat zugeordnet werden können. Dies ist derzeit mit molekularen Methoden zumindest routinemäßig noch nicht möglich, wenngleich auch hier die oben genannte Einschränkung der nachgewiesenen Aktivität gelten würde.

### Molekularbiologie

Davon ausgehend, dass genetische Determinanten für ein Resistenzverhalten verantwortlich sind, haben genetische Tests das Ziel, Resistenzgene oder genetische Elemente, die zum horizontalen Gentransfer in bakteriellen Isolaten oder Gemeinschaften beitragen, mit Hilfe von DNA Sonden oder Polymerase Chain Reaction (PCR) Methoden nachzuweisen. Ein Vorteil von molekularen Nachweismethoden ist der direkte Nachweis von Mikroorganismen oder Resistenzen in Umweltkompartimenten über spezifische Markergene ohne vorherige selektive Anreicherung auf Kulturmedien. Damit werden auch Mikroorganismen erfasst, die nicht unter Laborbedingungen wachsen können (z.B. VBNC Stadien) oder nur sehr langsam wachsen

aber zur Resistenz in spezifischen Kompartimenten beitragen können (Oliver, 2005, 2010; Trevors, 2011). DNA- und RNA-basierte Nachweisverfahren bieten einige Vorteile gegenüber Antibiogrammen (Kulturverfahren), wenn es darum geht die epidemiologische Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in einem Krankenhaus oder Abwassersystem zu verfolgen, da neben dem taxonomischen DNA-Markergenen zur Bakterienidentifizierung eben auch die Spezies-relevanten Resistenz- oder Virulenzgene im Parallelansatz nachgewiesen werden können (Microbial Source Tracking). So konnte mit Hilfe der PCR bereits gezeigt werden, wie verschiedenen Resistenzgene, die ursprünglich aus unterschiedlichen Pathogenen stammten, ausgehend von klinischen und kommunalen Abwässern, über Oberflächenwässer bis hin zu Trinkwässern gelangen können (Lupo et al., 2012; Schwartz et al., 2003, 2006; Volkmann et al., 2004). Über die Abfolge der Nukleotidsequenzen der Antibiotikaresistenzgene bzw. phylogenetisch relevanten Gene ist die hohe Spezifität und Sensitivität der molekularbiologischen Nachweissysteme definiert, mit deren Hilfe Bakterien mit ihrem genetischen Hintergrund unabhängig von ihrem physiologischen Status nachgewiesen werden können. Aus einem DNA-Extrakt einer Bakteriengemeinschaft können aus verschiedenen Umwelthabitaten direkt, ohne kulturelle Anzucht, sowohl hygienisch relevante Bakterien detektiert und deren Antibiotikaresistenzdeterminanten erfasst werden. Mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) ist sogar möglich, die Abundanzen von Bakterienspezies und Resistenz-Determinanten in den originalen Proben zu beschreiben und damit umfassend eine Resistenzsituation bzw. Risikopotential abzuschätzen.

Dennoch können die Besonderheiten der Umweltanalytik die molekularbiologischen Nachweissysteme auch negativ beeinflussen. Dazu zählen mögliche Kreuzreaktionen der PCR-Verfahren mit biotischen Bestandteilen einer nicht-charakterisierten Umweltsprobe (Begleitflora) oder die Wirkungen von wasserlöslichen abiotischen Inhaltsstoffen, die eine Inhibition

der PCR bedingen und damit die Ergebnisse verfälschen können. Eine weitere Limitierung der molekularbiologischen Nachweisverfahren ist die fehlende Standardisierung und Validierung der Verfahren im Ringversuch für die Anwendungen im Bereich der Umweltanalytik.

Der Nachweis von Multiresistenzen in hygienisch relevanten Mikroorganismen ist allein durch die Verwendung von DNA basierten Nachweisen aus Gesamt-DNA einer Umweltsprobe nicht zu bewerkstelligen. Hier ergänzen sich konventionelle Verfahren der Anreicherung und Antibiogrammtestung sinnvoll mit den molekularbiologischen Ansätzen, um gezielt die Anwesenheit von Mehrfach-Resistenzen phänotypisch und genotypisch in einem Isolat zu belegen. Da die Entwicklung von Multiresistenzen in hygienisch relevanten Mikroorganismen für die Gesundheitsvorsorge von großer Bedeutung ist, müssen auch hierfür standardisierte und validierte Protokolle zum Nachweis und zur Verbreitung dieser Risikokeime in der Umwelt entwickelt werden. Diese Analysen müssen derzeit noch mit Kulturmethoden durchgeführt werden, jedoch ist es wahrscheinlich, dass auch einzelne Zellen in wenigen Jahren molekular charakterisiert werden können. Eine solcher molekularer Ansatz würde dann Kultivierungsmethoden ablösen können.

## 3 Ausgangssituationen – Ergebnisse aus RiSKWa

### 3.1 Konventionelle Abwasserbehandlung in Kliniken und Kommunen

Im Teilprojekt **SchussenAktivplus** wurden Kläranlagen mit konventioneller Abwassertechnik und unterschiedlicher Ausbaugrößen untersucht. Im Rahmen der Untersuchungen wurden *E. coli*-, Enterokokken- und Staphylokokken-Isolate phänotypisch und genotypisch auf ihre Resistenz gegenüber klinisch-relevanten Antibiotika getestet. *E. coli*-Isolate wurden gegen Ampicillin, Cefprozid, Ciprofloxacin und Cotrimoxazol getestet; Enterokokken-Isolate gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Erythromycin und Vancomycin; Staphylokokken-Isolate gegen Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin und Oxacillin. Die Eliminationsleistung der Kläranlagen für die beiden Gattungen und *E. coli* betrug im Mittel 2,2 bis 2,5 log-Stufen. Eine vergleichbare Eliminationsleistung von konventionellen Kläranlagen wurde auch im Teilprojekt TransRisk mit rein molekularbiologischen Methoden ermittelt. In SchussenAktivplus zeigte sich, dass der Anteil Antibiotika-resistenter *E. coli*- und Enterokokken-Isolate während der Kläranlagen-Passage teilweise zunahm, während der Anteil resistenter Staphylokokken-Isolate abnahm. Aufgrund der deutlich geringeren Lebendkeimzahlen im Kläranlagenablauf im Vergleich zum Zulauf, war -absolut betrachtet- die Konzentration Antibiotika-resistenter *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken, die dem Vorfluter zugeschlagen werden, geringer als im Zulauf zu den Kläranlagen.

Auch im Verbundprojekt **TransRisk** wurden konventionelle Kläranlagen untersucht, die Abwässer von Städten und Gemeinden unterschiedlicher Größe aufbereiten. Zusätzlich wurden noch gezielt Klinikabwässer untersucht. In TransRisk wurden fakultative Pathogene und Antibiotikaresistenzgene im extrahierten Erbgut (Gesamt-DNA) aus einer Abwasserpopulation direkt, ohne vorherige Anreicherung und Isolierung von spezifischen Keimen, untersucht. Es konnten Korrelationen mit den Ergebnissen aus SchussenAktivplus erarbeitet werden. So wurden auch in TransRisk Eli-

minationsleistungen der Kläranlagen von bis zu 2 log-Stufen mit DNA-basierten Methoden ermittelt. Generell wiesen die Zuläufe aller untersuchten kommunalen Kläranlagen und vor allem Klinikabwässer hohe Zellanteile an Enterokokken und *P. aeruginosa*, und geringere Belastungen an *Enterobacteriaceae* auf. In Klinikabwässern wurden Methicillin-resistente Staphylokokken (*S. aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)) häufiger nachgewiesen als in Abwässern aus kommunalen Kläranlagen. Das Reduktionspotential der untersuchten Kläranlagen liegt bei bis zu 90 % für Enterokokken und 50 % für Enterobakterien. Für *P. aeruginosa* wurde jedoch keine Reduktion durch die Abwasserbehandlung sichtbar. Teilweise konnte sogar ein Anstieg an Anteilen für *P. aeruginosa* in der Gesamtpopulation gemessen werden.

Neben dem Nachweis von fakultativ pathogenen Bakterien wurde im Projekt TransRisk das Auftreten von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in Klinikabwässern und Kläranlagen untersucht. Die höchsten Belastungen an Antibiotikaresistenzgenen wurde in Klinikabwässern gemessen (Imipenemresistenz: *bla<sub>VIM1</sub>*; Vancomycinresistenz: *vanA*; Ampicillinresistenz: *ampC*; Erythromycinresistenz: *ermB*). In den Kläranlagenabläufen zeigte sich sogar eine Zunahme der Abundanzen der Antibiotikaresistenzen gegenüber den Kläranlagenzuläufen von bis zu einer log-Stufe für die Imipenem-, Vancomycin- und Ampicillinresistenz. Im Gegensatz zu den bisher genannten Resistenzgenen wurde das Erythromycinresistenzgen in jeder Kläranlage um mehr als 90 % reduziert.

In Bezug auf konventionelle Abwasserbehandlungen zeigen die Ergebnisse aus **TransRisk** und **SchussenAktivplus**, dass Klinikabwässer und kommunale Abwässer eine wichtige Quelle für den Eintrag von hygienisch relevanten Bakterien mit Antibiotikaresistenzen in die Umwelt darstellen. Die Ergebnisse der untersuchten Kläranlagenabläufe weisen auf einen möglichen Reservoir-Effekt, vor allem für Antibiotikaresistenzgene hin, da trotz einer Abnahme der Bakteri-

enfracht im Ablauf, eine Zunahme für einige der getesteten Antibiotikaresistenz-Determinanten gemessen wurde.

Im Teilprojekt **ANTI-Resist** wurden die Zuläufe einer Kläranlage sowie der Ablauf saisonal für zwei Jahre (2012 und 13) analysiert. Welche Antibiotikaresistenzgene überprüft werden sollten, wurde innerhalb des Partnerkonsortiums unter Berücksichtigung der klinischen Relevanz und der Verschreibung der verantwortlichen Antibiotika festgelegt und mit einer EU-COST Action zur Detektion von Antibiotika in der Umwelt (TD 0803 DARE) abgestimmt. Zusätzlich wurden nach dem gleichen Muster *Escherichia coli* isoliert und phänotypisch auf ihre Sensitivität gegenüber 20 Antibiotika überprüft. Die überprüften Gene gehörten zur Gruppe der Fluorchinolone (*qnrB*), Beta-Laktame (*ctx-m32*, *o-xa58 shv34*), Sulfonamide (*sul1* und *sul2*), Tetracycline (*tetM*), Vancomycin (*vanA*), Trimethoprim (*dnfrA*) und zu MRSA resistenten Bakterien (*mecA*). Die Ergebnisse zeigten ein hohes Vorkommen der Resistenzen von *E. coli* für alle Antibiotika in allen Jahreszeiten und innerhalb mehrerer Isolate Mehrfachresistenzen, nicht nur im Abwasser, sondern auch im gereinigten Wasser. Die Quantifizierung von Resistenzgenen unabhängig von Kultivierungen zeigte eine erhöhte relative Anzahl (im Bezug zur 16S) an Resistenzgenen der Beta-Laktame (*ctx-m32 oxa58, shv34*) und Sulfonamide (*sul1, sul2*), Vancomycin (*vanA*) und Trimethoprim (*dnfrA*). Interessanterweise zeigten die Abundanzen der Resistenzgene im Gegensatz zu den phänotypischen Daten der *E. coli* ein jahreszeitliches Muster auf.

### 3.2 Erweiterte Abwassertechniken

Aufgrund der Erkenntnis, dass die konventionellen Abwassertechnologien die Bakterienfracht zwar reduziert, jedoch einen deutlich geringeren Einfluss auf die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen besitzt, wurde im Rahmen von **TransRisk** und **SchussenAktivplus** die Effizienz einer Ozonung, als zusätzliche Abwasserbehandlung, auf die Reduktion von potentiell humanpathogenen und Antibiotika-resistenten Bakterien im aufbereiteten Abwasser kommunaler Kläranlagen untersucht. Durch einen solchen zusätzlichen Behandlungsschritt soll u.a. diesem Trend der Antibiotikaresistenzemission entgegengewirkt werden. Die Ozonung soll das Ziel haben, die verbliebene Gesamtbakterienzahl (inklusive Antibiotika-resistente Keime) im Klarwasser zu reduzieren. Die Untersuchungen in **TransRisk** belegen auch eine deutliche Reduktion der gesamten Bakterienfracht von bis zu 90 % bei einer Ozonbehandlung von 0,5 und 1,0 g Ozon/g DOC. Ozon und/oder dessen Hydroxylradikale schädigen bekanntermaßen bakterielle Membranstrukturen und Nukleinsäuren und können dadurch bakterizid wirken. Bei den spezifischen Bakterienmarkern für Enterokokken und Enterobakterien wurde eine Verminderung nach Ozonung festgestellt: bis zu 2 log-Stufen Reduktion für Enterokokken und 0,2 log-Stufen für Enterobakterien. Deutlich geringer war die Reduktionsleistung bei *Pseudomonas aeruginosa*, wobei eine geringere Zelldichte in der Ausgangspopulation nachgewiesen wurde. Staphylokokken wurden nur sporadisch in geringen Zelldichten nachgewiesen, so dass Ozoneffekte nicht eindeutig belegt werden konnten. Im Gegenteil zu den Befunden zu Abundanzen von den genannten Mikroorganismen zeigte sich eine deutliche Häufung von Antibiotikaresistenzgenen in der überlebenden Bakterien-Fraktion nach der Ozonung. Dies zeigte sich für Imipenem-resistente (*bla<sub>VIM1</sub>*-Gen) und Vancomycin-resistente (*vanA*-Gen) Bakterien. Ein solches Ergebnis gibt erste Hinweise auf eine Selektion von Antibiotika-resistenten und Ozon-robusten Bakterien, die die Behandlung überleben oder sublethale

Schäden effektiver reparieren können. Träger des Erythromycin-Resistenzgenes (*ermB*) und des Ampicillin-Resistenzgens (*ampC*) wurden durch die Ozonung bis zu 50 % eliminiert.

Im Rahmen von **SchussenAktivplus** führte die Ozonung (0,2 g O<sub>3</sub>/g CSB; 0,88 g O<sub>3</sub>/g DOC) von behandeltem Abwasser zu einer zusätzlichen Reduktion zwischen 0,3 (Staphylokokken) und 1,0-1,1 log-Stufen für *E. coli* und Enterokokken im Vergleich zum Kläranlagenablauf nach konventioneller Reinigung. Ähnlich zu den molekularbiologischen Ergebnissen aus TransRisk nahmen teilweise die relativen Anteile gegen bestimmte Antibiotika resistenter Isolate während der Ozonung zu (z.B. um 16 % bei *E. coli* und um 5,5 % bei Staphylokokken). Der Anteil resistenter Enterokokken wurde durch die Ozonung deutlich um 25,4 % gesenkt. Es zeigte sich bei den phänotypischen Untersuchungen, dass die Zunahmen von resistenten *E. coli* speziell mit erhöhten Anteilen Ampicillin-resistenter Isolate und bei Staphylokokken mit erhöhten Anteilen an Isolaten mit einer Erythromycin-Resistenz gekoppelt waren. Die Abnahme resistenter Enterokokken dagegen war mit dem Rückgang des Anteils an Erythromycin-resistenten Isolaten verbunden.

Während der Passage der Ozonung der nachgeschalteten Filter kam es im Mittel zu einer weiteren Reduktion der Lebendkeimzahlen von *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken um 0,7 bis 1,1 log-Stufen.

### 3.3 Rohwasser inklusive Grundwasser

Im Rahmen des Projekts **AGRO** wurde das Quellwasser einer Karstquelle auf Antibiotikaresistenzgene untersucht. Insgesamt wurde auf 11 Antibiotikaresistenzgene aus sechs Antibiotikagruppen analysiert:

- Tetracyclinresistenzgene: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* und *tet(K)*
- Sulfonamidresistenzgene: *sul1* und *sul2*
- Trimethoprimresistenzgene: *dfrA1* und *dfrA12*
- Erythromycinresistenzgen: *erm(B)*
- Aminoglykosidresistenzgen: *aadA*
- $\beta$ -Lactamresistenzgen: *bla<sub>SHV</sub>*

Am häufigsten wurden die beiden Sulfonamidresistenzgene *sul1* (34,4 %) und *sul2* (25,6 %), das Trimethoprimresistenzgen *dfrA1* (31,1 %) und das Makrolidresistenzgen *erm(B)* (28,9 %) nachgewiesen. Insgesamt zeigte sich, dass eine erhöhte Trübung – z.B. durch Starkregen oder Schneeschmelze – mit einem Anstieg der Anzahl nachgewiesener Antibiotikaresistenzgene einhergeht.

Zusätzlich zu den qualitativen PCR-Untersuchungen auf Antibiotikaresistenzgene wurde auch die quantitative Bestimmung ausgewählter Gene (*sul1*, *sul2*, *tet(C)* und *erm(B)*) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass nach Starkregenereignissen wiederholt nicht nur ein deutlicher Anstieg der Anzahl nachgewiesener Antibiotikaresistenzgene, sondern auch der Kopienmengen der ausgewählten Gene im Quellwasser zu verzeichnen ist.

Insgesamt 3 Grundwassermessstellen wurden im Rahmen von **TransRisk** auf Belastungen mit ausgewählten fakultativ pathogenen Mikroorganismen und Antibiotikaresistenzgenen untersucht. Alle Messstellen befanden sich in einem Karstgebiet, so dass anthropogene Einflüsse aufgrund der geringeren Filterleis-

tung des Untergrunds besonders sichtbar werden können. Mit Hilfe der molekularbiologischen Nachweissysteme konnten hygienisch relevante Bakterien und deren Antibiotikaresistenzgene in Grundwasserproben quantifiziert werden. Vor allem bei Messstellen im Einflussbereich von Deponien zeigten sich deutlich messbare Abundanzen dieser Resistenz- und Bakterienmarkergene. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bis zu 7 Liter Grundwasser für die DNA-Extraktion eingesetzt werden musste, um ausreichend Gesamt-DNA aus der Population für die molekularbiologische Nachweise zu gewinnen. Die Ergebnisse zu den Abundanzen beziehen sich dabei auf 100 ng Gesamt-DNA aus einer Population. Bezieht man die Abundanzen lediglich auf 100 ml Volumen der Grundwasserproben wird ein negativer Befund bzw. Befund nahe der Detektionsgrenze vorgetäuscht, was aber nicht der Realität entspricht. Am Beispiel der Grundwasserproben wird die Problematik zur Wahl der korrekten Bezugsgröße besonders deutlich.

### 3.4 Trinkwasser

Auf internationaler Ebene wurden verschiedene Studien zum Vorkommen Antibiotika-resistenter Bakterien im Trinkwasser durchgeführt. Antibiotika-resistente Bakterien wurden in Trinkwassernetzen in den USA (Armstrong et al., 1981, Pruden et al., 2006; Xi et al., 2009), in Griechenland (Papapetropoulou et al., 1994; Papandreou et al., 2000), in Indien (Pathak et al., 1993), im Libanon (Tokajian und Hashwa, 2004), in Ägypten (El-Zanfaly, 1991) und Argentinien (Cordoba et al., 2001) nachgewiesen. In Deutschland wurden Studien zum Vorkommen von Antibiotika-resistenten Bakterien durchgeführt, die das Auftreten von Antibiotikaresistenzen und Resistenzgenen in Biofilmen des Trinkwassernetzes belegen und erhebliches öffentliches Interesse fanden (Schindler und Metz, 1991; Schwartz et al., 2003).

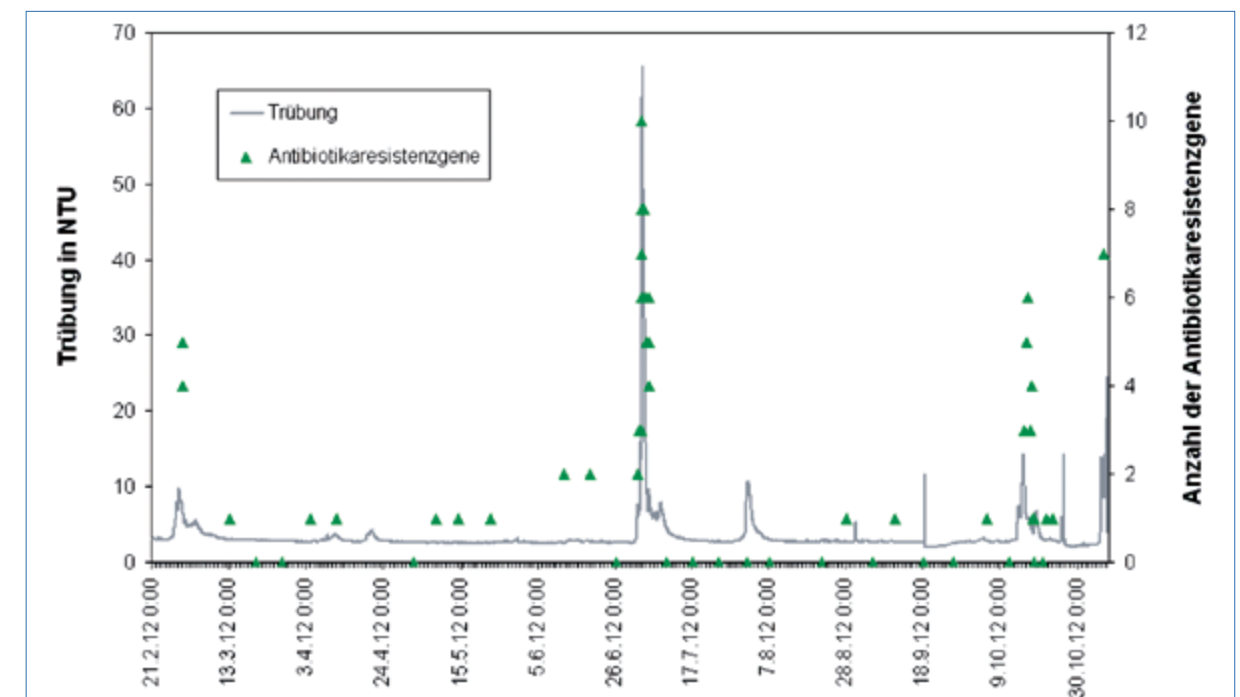


Abbildung 2: Nachweis von Antibiotikaresistenzen an einer Karstquelle im Rahmen des Projektes AGRO



Eine amerikanische Studie zeigt, dass ein breites Spektrum von Antibiotikaresistenzgenen in Quellwasser und aufbereitetem Trinkwasser mit PCR-Verfahren nachzuweisen war (Xi et al., 2009). Während der Trinkwasseraufbereitung konnte eine deutliche Abnahme der Resistenzgene beobachtet werden, wobei keine Angaben zur Effizienz einzelner Aufbereitungsstufen und zur Abhängigkeit vom Rohwasser gemacht wurden. Die Elimination von Resistenzgenen bei der Trinkwasser-Aufbereitung wird am Technologiezentrum Wasser (TZW) derzeit im Rahmen eines laufenden DVGW-Projektes untersucht.

Im **RiMaTH**-Verbundprojekt werden neue Nachweismethoden für Krankheitserreger in der Trinkwasser-Hausinstallation entwickelt bzw. validiert. Der Fokus liegt hierbei vor allem auf Legionellen. Das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen in den nachgewiesenen Krankheitserregern wird in diesem Verbundprojekt nicht untersucht. Mit dem Ziel, die Nachteile von auf kulturbasierenden Nachweismethoden (Boulanger und Edelstein, 1995) zu umgehen, beschäftigt sich ein Teil des Projektes mit der Neuentwicklung von molekularbiologischen (Chip-basierte PCR, Online-Fluoreszenz) bzw. physikalischen (Raman-Spektroskopie) Methoden. Ein anderer Teil des Projektes beschäftigt sich mit einer Vergleichsstudie der einzigen bisher gesetzlich zugelassenen Nachweismethode für Legionellen im Trinkwasser (kultureller Nachweis gemäß ISO 11731 bzw. DIN EN ISO 11731-2) und einer bereits genormten qPCR (ISO/TS 12869). Ziel hierbei ist die Schaffung einer Vergleichsbasis der Ergebnisse von kulturellen und molekularbiologischen Nachweismethoden, um die Befunde der qPCR besser bewerten zu können. Dies erweist sich aus den in Kapitel 2 beschriebenen Gründen (fehlende lebend/tot Diskriminierung der qPCR, VBNC-Zustand) als kompliziert.

Bakterien der Gattung *Legionella* (*Legionella* spp.) kommen praktisch ubiquitär in Gewässern vor. Viele Arten dieser Gattung stellen für den Menschen keine Krankheitserreger dar. Einige Spezies können aller-

dings, wenn sie z.B. durch das Einatmen von belasteten Aerosolen beim Duschen in die Lunge gelangen, beim Menschen Pontiac-Fieber oder Legionellose hervorrufen. Die für die öffentliche Gesundheit bedeutendste Spezies ist *Legionella pneumophila*, sie ist für über 90 % der Legionelleninfektionen beim Menschen verantwortlich (Fields et al., 2002). Da Legionellen nicht fäkalen Ursprungs sind, können sie von den mikrobiellen Indikator-Parametern nicht erfasst werden. Als Umweltkeime werden sie mit dem Frischwasser immer wieder in Trinkwasser-Hausinstallationen eingebracht, und können sich dort bei ungünstigen technischen Bedingungen (siehe DVGW Arbeitsblatt W 551 und VDI/DVGW Richtlinie 6023) bis zu einem Grad vermehren, an dem sie ein Gesundheitsrisiko für die betroffenen Verbraucher darstellen. Aus diesem Grund ist in der Trinkwasserverordnung ein technischer Maßnahmenwert von 100 koloniebildenden Einheiten (KBE) *Legionella* spp. pro 100 ml Trinkwasser vorgeschrieben, bei dessen Überschreitung der Betreiber der betroffenen Anlage zur Ergreifung von Maßnahmen verpflichtet ist (siehe § 16 Abs. 7 Trinkwasserverordnung). Dieser Maßnahmenwert bezieht sich auf den gesetzlich vorgeschriebenen kulturellen Nachweis, und ist aus den in Kapitel 2 beschriebenen Gründen nicht auf die Ergebnisse der qPCR (in genomischen Einheiten, GU) anwendbar, weshalb diese Methode bisher nicht für Untersuchungen verwendet werden kann, die nach Trinkwasserverordnung gefordert sind. Allerdings bietet diese Methode neben ihrer höheren Sensitivität auch eine deutliche Zeitersparnis im Vergleich zur Kultur, die wenigstens 10 Tage für den Nachweis benötigt, die qPCR hingegen nur einige Stunden.

Im Rahmen einer Vergleichsstudie wurden ca. 3000 Proben aus deutschlandweit verteilten Trinkwasser-Hausinstallationen parallel mittels Kultur, einer qPCR zum Nachweis von *Legionella* spp. und einer qPCR zum Nachweis von *Legionella pneumophila* (ausschließlich) untersucht. Die quantitativen Ergebnisse beider molekularbiologischer Methoden korrelieren

nur sehr schwach mit denen der Kultur, daher kann ein „Umrechnungsfaktor“ von GU in KBE nicht definiert werden.

Das für den kulturellen Nachweis verwendete Selektivnährmedium GVPC wurde ursprünglich für die Kultivierung von *Legionella pneumophila* optimiert. Heute weiß man, dass dieses Medium einige Legionellenspezies nicht erfassen kann. So unterdrückt z.B. das enthaltene Glycin das Wachstum von einigen Stämmen von *Legionella dumoffii* und *Legionella micdadei* (Wadowsky und Yee, 1981). Die qPCR zum Nachweis von *Legionella* spp. hingegen erfasst praktisch alle bekannten Legionellenspezies. Mit dieser Methode wurden in über 99 % der untersuchten Trinkwasserproben große Mengen an *Legionella* spp. nachgewiesen, was aufgrund der weiten Verbreitung der Gattung in aquatischen Habitaten und der hohen Sensitivität der qPCR zu erwarten war. Für eine Risikobewertung sind diese Ergebnisse allerdings ungeeignet, da viele der aus der Umwelt stammenden Legionellenspezies keine Krankheitserreger für den Menschen darstellen. Die qPCR zum Nachweis von *Legionella* spp. erlaubt keine Aussage über das Vorhandensein von Pathogenen.

Über 93 % der in Deutschland im Jahr 2011 gemeldeten Legionellosefälle gehen auf *Legionella pneumophila* zurück (RKI, 2012). Diese Spezies ist von großer Bedeutung für die öffentliche Gesundheit, daher ist die qPCR, die ausschließlich dieses Pathogen nachweist, wesentlich besser für eine Risikobewertung geeignet als die auf Gattungsebene. Allerdings bleibt hier das Problem bestehen, dass der technische Maßnahmenwert für diese Methode nicht anwendbar ist. Andere Arbeitsgruppen (z.B. ANSES, 2011) haben einen Maßnahmenwert für *Legionella pneumophila* in Trinkwasser von 5000 GU / l empfohlen. Bei ca. 84 % der in diesem Projekt untersuchten ca. 3000 Proben stimmen Kultur und qPCR (*Legionella pneumophila*) überein, was Über- bzw. Unterschreiten des jeweiligen Maßnahmenwertes angeht. Bei den übrigen ca. 16 % handelt es sich größtenteils um „Fehlalarme“ der qPCR.

Das heißt: Liefert die qPCR zum Nachweis von *Legionella pneumophila* einen Befund kleiner 5000 GU/l, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass keine Überschreitung des technischen Maßnahmenwertes nach Kultur vorliegt. Diese Methode eignet sich gut für eine erste, vorläufige Risikoabschätzung, was sich mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen deckt (Lee et al., 2011). Allerdings sind die Ergebnisse der qPCR nicht gerichtsfest und können die nach Trinkwasserverordnung geforderten kulturellen Untersuchungen bisher nicht ersetzen!

### 3.5 Umwelt (Badegewässer/Oberflächenwässer/Regenüberlauf)

Im Rahmen des Projekts **Sichere Ruhr** wurde die Ruhr auf mikrobielle Belastungen untersucht. Die Wasserqualität der Ruhr wird neben diffusen Einträgen vor allem durch die Einleitung von geklärtem Abwasser und Regenwasserabschlägen beeinflusst. Mikrobiologische Untersuchungen an Mischwasserentlastungsanlagen und Kläranlagen an der Ruhr im Raum Essen haben gezeigt, dass in Folge von Starkregenereignissen abgeschlagenes, ungeklärtes, Mischwasser wie auch geklärtes Abwasser beträchtliche mikrobiologische Frachten aufweisen.

Das Ruhrwasser wird durch zahlreiche Kläranlagen-einträge fäkal belastet, wodurch die hohen Nachweisraten für *E. coli*, coliforme Bakterien und Coliphagen zu erklären sind. Sowohl die Bakterien als auch die Phagen haben ihren Ursprung im menschlichen Darm. Dahingegen haben Aeromonaden, die ebenfalls in jeder Probe nachgewiesen werden konnten, ihren Ursprung in der aquatischen Umwelt selbst. Humanpathogene Viren werden, in Abhängigkeit vom Virustyp, in teilweise sehr hohen Konzentrationen mit dem Urin oder Fäzes ausgeschieden. Rota- und Noroviren können, entsprechend dem Auftreten von Infektionen in der Bevölkerung, vor allem in der kalten Jahreszeit im Oberflächenwasser nachgewiesen werden. Adenovi-

ren bewirken eine latente Infektion und werden aus diesem Grund von infizierten Personen während des gesamten Jahres ausgeschieden, wodurch sie in der Literatur häufig als Indikator für eine virale, abwasserbedingte Belastung von Oberflächengewässern angesehen werden.

In Folge der verschiedenen Einträge aus Kläranlagen wie auch über diffuse Eintragspfade, lassen sich insbesondere nach Starkregenereignissen im Vorfluter höhere Konzentrationen von Krankheitserregern nachweisen. Nach Niederschlägen wird die Ruhr so hoch belastet, dass die Badegewässerqualität nur selten eingehalten werden kann. Während der Badesaison stammen beispielsweise knapp 15 % der niederschlagsbedingten *E. coli*-Einträge in die Ruhr aus diffusen oberflächennahen Einleitungen, insbesondere aus der Landwirtschaft, und ca. 60 % aus den Abschlägen verschiedener Regenbecken.

Das Spektrum der nachgewiesenen Pathogene umfasst zum einen die so genannten „emerging pathogens“ und einen großen Teil der bisher bekannten, wasserübertragbaren Krankheitserreger. In einem Zeitraum von 15 Monaten wurden in 184 Proben neben Cryptosporidien in 29 % aller Proben auch Giardien in 78 % aller Proben nachgewiesen. Hinsichtlich der enteralen Viren sind aus infektiologischer Sicht vor allem die Daten von Rota-, Noro- und Enteroviren interessant. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes konnten in 9,8 % der Proben Rotaviren nachgewiesen werden. Noro- und Enteroviren wurden in 29,5 % bzw. 22,3 % der Proben detektiert.

Unter Berücksichtigung der Badegewässerüberwachung (EU-Badegewässerrichtlinie 2006/7/EG) zeigt sich in Folge von Korrelationsrechnungen bereits eine fehlende Übereinstimmung der ermittelten Pathogenkonzentrationen zu den aus der Richtlinie verwendeten Indikatorparametern (*E. coli* und intestinalen Enterokokken). Einen ebenfalls fehlenden, statistischen Zusammenhang zeigte sich auch bei Coliphagen

und diversen humanpathogene Viren (Adeno-, Polyoma-, Entero- und Rotaviren). Neben der Nutzung der Ruhr als Badegewässer dient diese durch künstliche Grundwasseranreicherung auch als Rohwasserquelle für die Trinkwassergewinnung (Bspw. Mülheimer Verfahren).

Demnach erfordern die zuvor genannten Erkenntnisse hinsichtlich der mangelnden Übereinstimmung der Konzentrationen von Indikatororganismen und Pathogenkonzentrationen in Oberflächengewässern (und deren Nutzung zur Trinkwassergewinnung) eine Überprüfung der Repräsentativität von Indikatorparametern aus der Trinkwasserverordnung.

Insbesondere für Rotaviren zeigt sich im Rahmen von **Sichere Ruhr** die mangelnde Voraussagekraft der gängigen Indikatoren. Um Zusammenhänge der Rotavirenkonzentration mit der Konzentration anderer Pathogene nachzuweisen, ist ein, gegenüber „Sichere Ruhr“ zeitlich wie auch räumlich, noch umfangreicheres Probenahmeprogramm von Nöten. Aufgrund der, im Gegensatz zu anderen untersuchten Pathogenen, geringen Anzahl von Rotavirus-Positivproben konnte trotz des umfangreichen Probenahmeprogramms aus „Sichere Ruhr“ keine ausreichende Anzahl von Rotavirus-Messwerten erhoben werden, um eine für statistische Auswertungen valide Datenbasis aufzubauen. Insbesondere, da Rotaviren nur vereinzelt in den Proben nachgewiesen werden konnten, dann aber zum Teil außerordentlich hohe Werte aufwiesen.

So konnten in nur 10 % der Proben Rotaviren nachgewiesen werden. Dennoch stellten diese für eine potentiell badende Bevölkerung (aus einer telefonischen Befragung hochgerechnetes, demographisches Profil) die höchste Krankheitslast dar. Die Kombination der QMRA und DALY Konzepte in Verbindung mit den parallel erhobenen Pathogenkonzentrationen, ermöglichte die Berechnung dieser populationspezifischen Krankheitslast.

Das Beispiel Rotaviren zeigt die Notwendigkeit andere, geeignete Indikatorparameter zur umfassenden Beschreibung der Gewässerqualität auf, in Folge dessen, ein potentieller Badebetrieb mit Blick auf ein akzeptables Restrisiko zu regulieren ist.

Die hygienische Bewertung der Befunde zeigt, dass Baden in der Ruhr grundsätzlich realisiert werden könnte, wenn auch nicht immer und überall. Günstige Voraussetzungen für unbedenkliches Baden im Fluss sind mehrere regenfreie Tage in Folge. Aber dennoch: Die strengen europaweiten Anforderungen zur Einstufung der Ruhr als Badegewässer setzen sehr hohe Hürden. Allerdings bieten die bereits heute an verschiedenen Abschnitten der Ruhr günstigen hygienischen Bedingungen die Chance, eine rechtliche Basis zu finden, damit das Baden bei Trockenwetter geduldet werden kann.

Im Rahmen von **SchussenAktivplus** wurden im Kulturverfahren die Lebendkeimzahlen von *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken in zwei Oberflächenwässern untersucht. Während die Lebendkeimzahlen von *E. coli* und Enterokokken im Freiland um 0,6 bis 0,8 log-Stufen geringer waren als in den Kläranlagenabläufen, lag die Lebendkeimzahl der Staphylokokken im Freiland um etwa eine log-Stufe höher. Die Anteile resistenter *E. coli* waren im Oberflächenwasser vergleichbar zu den Anteilen im Abwasser. Auch im Freiland wurden ESBL-bildende *E. coli* und Methicillinresistente Koagulase-negative Staphylokokken (CNS) nachgewiesen. Der Anteil resistenter Enterokokken war im Oberflächenwasser um 12,1 % geringer als im Kläranlagen-Abfluss, wobei eine Erythromycin-Resistenz am häufigsten nachgewiesen wurde.

In den untersuchten Oberflächengewässern im Projekt **TransRisk** konnten alle untersuchten Antibiotikaresistenzgene für Vancomycin, Imipenem, Erythromycin und Ampicillin, sowie die taxonomischen Markergene für hygienisch relevanten Bakterien (Enterokokken, Staphylokokken, *P. aeruginosa*, Enterobakterien)

nachgewiesen und quantifiziert werden. Die höchsten Konzentrationen wurden in Bakterienpopulationen aus Fließgewässern nachgewiesen, die als Vorfluter von lokalen Kläranlagen genutzt werden. Aber auch in Fließgewässern ohne direkten Kläranlagen-Einfluss wurden die genannten Resistenzdeterminanten, wenn auch in geringeren Anteilen, quantifiziert. Dabei ist zu bemerken, dass in den untersuchten Bakterienpopulationen die Abundanz an Antibiotikaresistenzgenen bis zu einer log-Stufe über den Abundanz der untersuchten taxonomischen Bakterienmarkergenen lag, was auf einen horizontalen Gentransfer der Resistenzen in der Gesamtpopulation hindeutet oder auf eine deutlich erhöhte Genkopienzahl in den Trägerbakterien hinweist.

Zusätzlich wurden Retentionsbodenfilter (RBF) und Regenüberlaufbecken (RÜB) in **SchussenAktivplus** und **TransRisk** untersucht. In **SchussenAktivplus** konnte gezeigt werden, dass sich während der Passagen durch den RBF die Lebendkeimzahl der Enterokokken im Mittel um 1,5, der *E. coli* um 2,4 und der Staphylokokken um 2,5 log-Stufen verringerte. Das Resistenzniveau der Enterokokken hat sich während der Passage durch den RBF nicht verändert. Das untersuchte RÜB zeigte dagegen keine reduzierenden Effekte hinsichtlich der Konzentration fakultativ pathogener und Antibiotika-resistenter *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken.

Im Rahmen von **TransRisk** wurden Regenüberlaufbecken auf Belastungen mit fakultativ pathogenen Bakterien und Antibiotikaresistenzen mittels qPCR untersucht. Vor allem bei Starkregenereignissen konnten hohe Bakterienfrachten und Abundanzen an hygienisch relevanten Bakterien bzw. Resistenzgenen quantifiziert werden. Bakterienspezies, wie Methicillinresistente Staphylokokken (CNS und *S. aureus*), die lediglich in Klinikabwässern oder nur sporadisch in anderen Abwassersystemen detektiert wurden, sind dabei in deutlich nachweisbaren Zelldichten erfasst worden. Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss

von Viehwirtschaft hin, wobei Abschwemmungen bei Starkregen Regenüberlaufbecken zu einem Reservoir und Quelle der Emission von hygienisch relevante Bakterien und Antibiotikaresistenzen für Oberflächengewässer werden lassen.

Um das Resistenzspektrum der Gesamtheit der bakteriellen Gemeinschaften in einem Oberflächengewässer (Bach im Einzugsgebiet einer Karstquelle) und häuslichem Abwasser zu erfassen, wurden im Rahmen von **AGRO** umfassende molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Die untersuchten Gene (siehe Kapitel 3: Rohwasser inklusive Grundwasser) konnten in einer Vielzahl der Oberflächenwasserproben nachgewiesen werden.

In einem Säulenversuch zur Uferfiltration, der im Rahmen des **PRiMaT**-Projektes durchgeführt wurde, konnte die Verminderung resistenter Bakterien durch die Bodenpassage gezeigt werden. Außerdem wurden im PRiMaT-Projekt Vergleichsmessungen zu PCR-basierten Nachweismethoden in Laboren verschiedener Einrichtungen, z.B. zur Bestimmung von Adenoviren, durchgeführt. Die Messwerte zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Die Abweichung für Adenoviren lag durchschnittlich bei 0,4 log-Stufen.

### Schlussfolgerungen aus den jeweiligen RiSKWa-Projekten:

#### ANTI-Resist

- Die Abundanz der *E. coli* wurde durch die Kläranlage verringert, aber der Anteil resistenter *E. coli* blieb gleich zwischen Zulauf und Ablauf der Kläranlage.
- Die Anzahl der Multiresistenzen in *E. coli* wurden durch die Kläranlage nicht signifikant reduziert, es findet trotz der Klärung ein Eintrag von multiresistenten *E. coli* in das nachgeschaltete Gewässer statt.
- Unabhängig von *E. coli*, zeigte die Dynamik der Resistenzgene, des gesamten Zulaufs und Ablaufs der Kläranlage ein saisonales Muster.

#### AGRO

- Häufiger Nachweis von Resistenzgenen im Quellwasser einer Karstquelle sowie in den Oberflächengewässern im Einzugsgebiet.
- Es konnten relevante Antibiotikaresistenzgene für die untersuchte Karstquelle identifiziert werden: *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *erm(B)*.
- Starkregenereignisse führten zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl nachgewiesener Antibiotikaresistenzgene und ihrer Genkopien im Quellwasser.

#### PRiMaT

- Validierung der PCR-Methode durch Vergleichsmessungen in unterschiedlichen Laboren erfolgreich durchgeführt

- Etablierung der Lebend-/Tot-Unterscheidung für PCR-Nachweise (PMA-Methode)
- Reduktion von Resistenzgenen und Viren bei einem Säulenversuch zur Uferfiltration
- Untersuchung und Validierung neuer Möglichkeiten (Luminex und EMA/PMA) zum Nachweis von infektiösen Viren im Wasser als Alternative zur Zellkultur.
- Die Untersuchung neuer Methoden zum Nachweis infektiöser Viren hat eine wesentliche Bedeutung für die zukünftigen Untersuchungen von Oberflächen- und Abwasser hinsichtlich ihrer viralen Belastung. Bisher ist der Goldstandard die ICC-PCR (s. oben), mit dem Nachteil, dass die Methode personal- und kostenintensiv ist. Als alternative Methode wurden die Möglichkeiten der Luminex Methode untersucht. Zwar werden die Ansprüche an die Spezifität erfüllt, die Sensitivität ist jedoch, verglichen mit der Real-Time PCR, zur gering.

#### RiMaTH

- Der molekularbiologische Nachweis von *Legionella* spp. im Trinkwasser (qPCR gemäß ISO/TS 12869) eignet sich nicht für eine Risikoabschätzung, da hier kein Rückschluss auf das Vorhandensein von Krankheitserregern gezogen werden kann.
- Der molekularbiologische Nachweis von *Legionella pneumophila* im Trinkwasser (qPCR gemäß ISO/TS 12869) eignet sich bei der Verwendung eines noch genau zu bestimmenden alternativen Maßnahmenwertes gut für eine schnelle, vorläufige Risikoabschätzung.
- Ein „Umrechnungsfaktor“ von GU und KBE lässt sich nicht definieren.

Die Ergebnisse der qPCR sind nicht gerichtsfest und können die gesetzlich geforderten kulturellen Analysen bisher nicht ersetzen!

#### SchussenAktivplus

- Bei der konventionellen Abwasserreinigung werden *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken im Mittel um 2,2 bis 2,5 log-Stufen eliminiert, wobei der prozentuale Anteil Antibiotika-resistenter *E. coli*- und Enterokokken-Isolate während der Kläranlagen-Passage teilweise zunahm, während der Anteil resistenter Staphylokokken-Isolate abnahm.
- Eine um Ozonung erweiterte Abwasserbehandlung führte zu einer zusätzlichen Reduktion der absoluten Konzentration fakultativ pathogener und Antibiotika-resistenter Keime im Kläranlagen-Ablauf.
- Während der Passage durch einen Filter kam es teilweise zu einer Erhöhung des Anteils an resistenten *E. coli*-, Enterokokken- und Staphylokokken-Isolaten.
- Die Passage durch den Retentionsbodenfilter führte zu einer reduzierten Konzentration an *E. coli*, Enterokokken und Staphylokokken, die letztendlich dem Vorfluter zugeschlagen wird.

#### Sichere Ruhr

- Erstmalige quantitative Risikobewertung (QMRA) für Ruhr-Badegäste:
- Gefährdung durch Darmvirusinfektionen am relevantesten.



- Erfolgreiche Öffentlichkeitsbeteiligung: hohes Interesse – Verständnis – Engagement für Badebetrieb in Medien und Öffentlichkeit
- Technische Maßnahmen zur hygienischen Verbesserung bewertet: Mischwasser – Kläranlage – Landwirtschaft sind die Ansatzpunkte
- Leitfaden „Flussbaden“ beschreibt Gesetzesrahmen, Monitoring, Frühwarnsystem, Hygieneverbesserung, Kosten eines möglichen Badebetriebs, Kommunikation
- Baden in deutschen Flüssen: „Interessengemeinschaft Baden“ versucht einen Probebetrieb an der Ruhr
- Oberflächenwässer mit Abwassereinfluss und sogar Grundwässer zeigen bezogen auf die Gesamtpopulation Belastungen mit opportunistisch-pathogenen Mikroorganismen und Antibiotikaresistenz-Determinanten.

**TransRisk**

- Klinische und kommunale Abwässer tragen auch nach konventioneller Behandlung zum Austrag von opportunistisch-pathogenen Mikroorganismen in die aquatische Umwelt bei.
- Klinisch relevante Antibiotikaresistenz-Determinanten werden in höherer Abundanz in den Abwässern bzw. Kläranlagenausläufen im Vergleich zu den Trägerorganismen nachgewiesen (Hinweis auf horizontalen Gentransfer).
- Eine vierte Reinigungsstufe für Kläranlagen, wie die Ozonung, führt zu einer weiteren Reduktion der Bakterienfracht und opportunistisch-pathogenen Mikroorganismen, aber nicht zu einer kompletten Eliminierung.
- Antibiotika-resistente Bakterien im Abwasser zeigen zum Teil eine Robustheit gegenüber oxidativen Verfahren und überleben die Ozon-Behandlung.

**4.1 Emerging Pathogens**

**4.1.1 Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung**

Bezüglich der Auswahl von „emerging pathogens“ wird für das Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung auf das nachfolgend dargestellte Konzept (Abbildung 3) des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission hingewiesen. Dieses sollte zukünftig konsequent umgesetzt werden.

**4.1.2 Trinkwasserinstallation**

Für die Trinkwasserinstallation in Gebäuden sollten das in der Trinkwasserverordnung vorgeschriebene Verfahren zur Verifizierung der Legionellenkontamination ebenso konsequent umgesetzt werden. Die Integration weitergehender Nachweisverfahren in die Trinkwasserregulierung sollte jedoch zeitnah geprüft

werden. Für die Trinkwasserinstallation medizinischer Einrichtungen wird empfohlen, *P. aeruginosa* als Indikator aufzunehmen.

**4.2 Antibiotika-resistente Erreger bzw. Antibiotikaresistenzen**

**4.2.1 Abwasser**

In den Forschungsprojekten **TransRisk**, **Schussen-Aktivplus** und **ANTI-Resist** wurden bakterielle Indikatoren und Indikatoren für Antibiotikaresistenzen ausgewählt, die für die Beschreibung von Belastungssituation als geeignet erscheinen. Auf der taxonomischen Ebene sind dies *Escherichia coli* und fäkale Enterokokken, die bereits als Indikatoren für die mikrobiologische Überprüfung der Wasserqualität genutzt werden. Als weiterer bakterieller Indikator dient das opportunistisch-pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, das im aquatischen Nutzungspfad für die

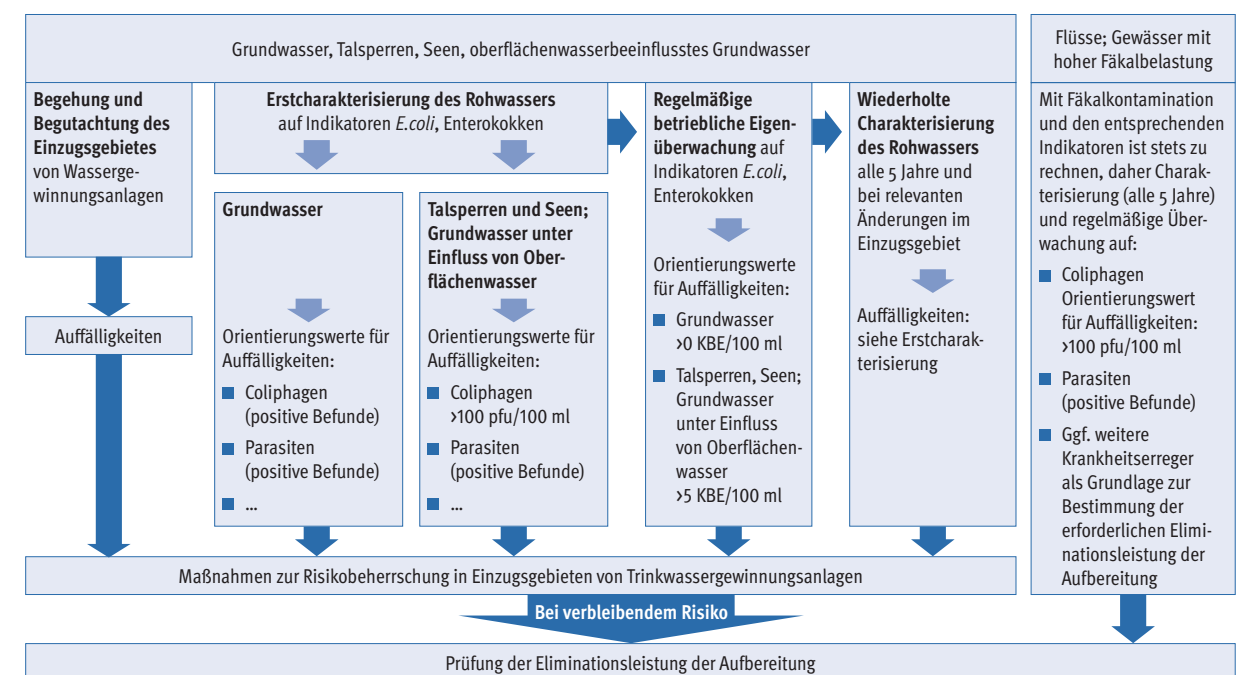


Abbildung 3: Konzept zur Überwachung von Rohwasser für die Trinkwasseraufbereitung (© Energie Wasser Praxis, 9/2015, S. 44-51)

Überwachung der Wasserqualität von Relevanz ist. Wie bei *E. coli* besitzt *P. aeruginosa* Relevanz bei der Entstehung von Multi-Resistenzen gegen klinisch relevanten Antibiotika und im horizontalen Gentransfer. Wenngleich andere Bakterienspezies, wie z.B. *Klebsiella pneumoniae* oder *Aeromonas* spp. als Indikatoren in Frage kommen können, so haben die o.g. Bakterien die Vorteile, dass sie ubiquitäre und wichtige Träger von Antibiotikaresistenzen sind und zudem beim Transfer dieser Resistenzen in verschiedenen Umweltbereichen von Relevanz sind.

Als Indikatoren für die Abundanzen von klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen wurden folgende Resistenzdeterminanten für den Bereich Abwasser ausgewählt: Sulfonamid-Resistenz (*sul1* und *sul2*), Imipenem-Resistenz bei *P. aeruginosa* (*bla<sub>IMI1</sub>*), Beta-Laktam-Resistenz bei Enterobacteriaceae (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*), Vancomycin-Resistenz bei Enterokokken (*vanA*), Erythromycin-Resistenz bei Streptokokken/Enterokokken (*erm(B)*) und Methicillin-Resistenz bei Staphylokokken (*mecA*).

Die ausgeführten Indikatororganismen und Indikatorgene, die im Rahmen von RiSKWa von den zwölf Projekten eingesetzt wurden, wurden größtenteils auch von einem europäischen COST-DARE Konsortium vorgeschlagen (Rizzo et al., 2013), dessen Thema die Entwicklung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in Abwasserbereichen war und innerhalb dessen in einem interdisziplinären Konsortium Standards formuliert wurden.

#### 4.2.2 Rohwasser/Grundwasser

Aufgrund der aktuellen Datenlagen schlägt das TZW folgende Antibiotikaresistenzgene als Indikatoren vor:

- Sulfonamidresistenzgene: *sul1* und *sul2*
- Trimethoprimresistenzgen: *dfrA1*
- Makrolidresistenzgen: *erm(B)*

Diese Resistenzgene wurden sehr häufig in Oberflächenwasser, dem Quellwasser einer Karstquelle, Uferfiltrat und Abwasser nachgewiesen (Tiehm et al., 2006 und 2009; Stoll et al., 2012 sowie unveröffentlichte und hier gezeigte Daten).

Zusätzlich zu diesen Antibiotikaresistenzgenen belegen die Daten aus **TransRisk** eine Häufung des Vancomycin-Resistenzgens *vanA* in Grundwasserproben (Alexander et al., 2014, submitted). Aus früheren Studien wurde dieses Resistenzgen auch in Trinkwasserbiofilmen nachgewiesen (Schwartz et al., 2003; Schwartz et al., 2008). Die Tatsache, dass das *vanA*-Gen auf einem mobilen genetischen Element (Transposon) liegt, kann ein horizontaler Gentransfer nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.3 Trinkwasser

Aufgrund der aktuellen Datenlagen schlägt das TZW folgende Antibiotikaresistenzgene als Indikatoren vor:

- Sulfonamidresistenzgene: *sul1* und *sul2*
- Trimethoprimresistenzgen: *dfrA1*
- Makrolidresistenzgen: *erm(B)*

Diese Resistenzgene wurden sehr häufig in Oberflächenwasser, dem Quellwasser einer Karstquelle, Uferfiltrat und Abwasser nachgewiesen (Tiehm et al., 2006 und 2009; Stoll et al., 2012 sowie unveröffentlichte und hier gezeigte Daten).

#### 4.2.4 Umwelt (Oberflächenwasser/ Badegewässer, Regenüberlauf)

In dem Projekt **Sichere Ruhr** konnten die aus der internationalen Literatur bekannten Aussagen bestätigt werden. Keiner der klassischen fäkalen Indikatoren wie z. B. *E. coli*, coliforme Bakterien oder Enterokokken sind als Indikatoren für Viren geeignet (Baggi et al., 2001; Gerba and Rose, 1990; Hauri et al., 2005).

Hinsichtlich der Umweltresistenz und -persistenz wären Bakteriophagen (somatisch Coliphagen, F-spezifische RNA Phagen oder Phagen von *Bacteroides fragilis*) besser geeignet. Allerdings konnte im Projekt und auch in der Literatur keine eindeutige Korrelation zwischen diesen Phagen und enteralen Viren in Oberflächengewässern nachgewiesen werden (Hot et al., 2003; Jiang and Chu, 2004). Zudem wurde bereits gezeigt, dass auch chemische Stoffe wie z. B. TCPP, ein Flammschutzmittel, kein geeigneter Indikator für Viren im Oberflächenwasser ist (Jurzik et al., 2010).

Seit einigen Jahren wird in der Literatur auch immer wieder die Möglichkeit diskutiert, inwiefern nachfolgend genannte Viren selbst als Indikatoren für eine fäkale Wasserbelastung dienen können: Enteroviren (Gantzer et al., 1998; Kopecka et al., 1993), Rotaviren (Miagostovich et al., 2008), Adenoviren (Pina et al., 1998; Puig et al., 1994) und humane Polyomaviren (Bofill-Mas et al., 2000; Hamza et al., 2009; McQuaig et al., 2009). Folgende drei Argumente sprechen jedoch gegen die Verwendung von Viren als Indikatoren für eine fäkale Beeinflussung:

- 1) Für den Nachweis dieser Virengruppen im Rahmen von Routineuntersuchungen ist der methodische Aufwand zu hoch.
- 2) Die Auswahl von ein oder zwei Viren zur Verwendung als Indikator ist schwierig, da jeder Virustyp unterschiedliche Umweltbedingungen toleriert und damit die Anwesenheit eines Virus nicht die Anwesenheit eines anderen zuverlässig anzeigen kann.
- 3) Schließlich kann bei einigen Viren ihre Anwesenheit im Oberflächenwasser auf Infektionen in der Bevölkerung zurückgeführt werden, so dass saisonale Schwankungen der Konzentrationen zu erwarten sind (z. B. Rotaviren, Noroviren und Enteroviren).

Die durch die Europäische Badegewässerrichtlinie (2006/7/EG) vorgegebenen Indikatoren (*E. coli* und

intestinale Enterokokken) weisen eine begrenzte Indikatorfunktion auf. Pathogenkonzentrationen von Cryptosporidien, Giardien, Adenoviren oder *Clostridium perfringens* zeigen nur unzureichende statistische Zusammenhänge zu den Konzentrationen der üblichen bakteriellen Indikatoren. Zudem zeigen erste Ergebnisse deutliche Unterschiede der Zusammenhänge zwischen verschiedenen Probenahmestellen. Dies lässt sich mit der unterschiedlichen, qualitativen Zusammensetzung der Eintragspfade erklären. Die ganzheitliche Betrachtung eines potentiellen Badegewässers wie sie in den Badegewässerprofilen der EU-Badegewässerrichtlinie angedacht ist, erweist sich als unabdingbarer Bestandteil zur Gewährleistung einer unbedenklichen (Bade-) Gewässerqualität.

Die hygienische Qualität der Ruhr wird ganz wesentlich durch starken Regen und daraus resultierendes Hochwasser beeinträchtigt. Eintragsquellen sind Abflüsse von Regenüberlaufbecken und das eingesickerter Wasser nach der Gülledüngung in Flussnähe sowie die Abläufe von Kläranlagen. Die bisherigen Ergebnisse zur hygienischen Wasserqualität der Ruhr an den verschiedenen Probenahmestellen zeigen, dass zwar an Trockenwettertagen die Einhaltung der Badegewässerrichtlinie häufig erreicht wird, jedoch an diesen Tagen auch für Badende durchaus kritische Keimbelastungen gefunden wurden. Aus diesem Grund ist die weitere Verbesserung und stetige Kontrolle der hygienischen Wasserwerte in der Ruhr eine Voraussetzung für die künftige Bademöglichkeit.

Im Hinblick auf Antibiotikaresistenz sind die bereits genannten Nachweise für klinische relevante Resistenzgene im Abwasser und Rohwasser/Grundwasser zu verwenden, deren Häufung auch in aquatischen Umwelthabitaten in RiSKWa nachgewiesen wurde.

Wie in **Sichere Ruhr** gefunden wurde, variieren die Konzentrationen an hygienisch relevanten Bakterien, Viren und parasitischen Protozoen erheblich in Abhängigkeit von zeitlichen Schwankungen der relevanten

Einleitungen. Insbesondere Niederschlagsereignisse und deren Einfluss auf Kläranlagenabläufe, Mischwasserentlastungen und Oberflächenabschwemmungen z.B. von landwirtschaftlichen Flächen haben sich als Hauptfaktor erwiesen. In gleicher Weise ist davon auszugehen, dass neben den genannten Erregern selbst auch Antibiotika-resistente Stämme oder Resistenzgene in ähnlich schwankenden Konzentrationen im Oberflächengewässer vorkommen können. Auch hier sind zeitlich heterogene Einträge aus spezifischen Quellen (insb. landwirtschaftliche Flächen mit den dort ggf. eingesetzten Antibiotika sowie kommunale Abwasserfrachten) bei Probenahmen und Risikobewertungen zu berücksichtigen. Allerdings zeigen die Ergebnisse aus TransRisk, dass auch in Oberflächengewässern von einer deutlichen Grundbelastung mit klinisch relevanten Antibiotikaresistenzdeterminanten auszugehen ist. Dies zeigen Langzeituntersuchungen über 2 Jahre.

Da für die enterale Humanpathogene bisher weder mikrobiologische noch chemische Indikatorparameter gefunden werden konnten, ist es nicht sinnvoll die Qualität von Oberflächenwasser bzw. Badegewässer anhand der klassischen Fäkalindikatoren vorzunehmen. Eine Möglichkeit die Konzentrationen von Viren, Parasiten und Bakterien im Oberflächenwasser zu bewerten ist die QMRA (quantitative microbial risk assessment) Methode. Um zudem die Ergebnisse international und fachgebietsübergreifend vergleichen zu können, könnte zusätzlich der DALY (disability-adjusted life years) berechnet werden. Im „Sichere Ruhr“-Projekt wurde entsprechend vorgegangen.

Grundlage für die QMRA Berechnungen sind die Dosis und die Parameter spezifischen Dosis-Wirkungskurven. Im Rahmen des Projektes errechnet sich die Dosis anhand der Dauer des Schwimmens, der aufgenommenen Wassermenge und der Pathogenkonzentration im Wasser ( $D = C \times T \times R$ ; mit  $D$  – Dosis,  $C$  – Konzentration der Mikroorganismen im Wasser;  $T$  – Dauer des Schwimmens und  $R$  – aufgenommene Wassermenge). Mit Hilfe von Dosis-Wirkungsbeziehungen wird zunächst die Wahrscheinlichkeit einer Infektion berechnet. Während für die Rota- und Enteroviren die Dosis- Wirkungsbeziehung mit einer beta-Poisson Verteilung beschrieben werden kann, muss für die Noroviren eine hypergeometrische Funktion verwendet werden, da Noroviren in natürlichen Gewässern häufig aggregieren. Für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung muss ein weiterer Faktor mit einbezogen werden, der – bei der Aufnahme von einem theoretischen Pathogen – die Wahrscheinlichkeit einer Infektion beschreibt. Die eigentliche Risikoberechnung erfolgt mit Hilfe einer Monte Carlo Simulation die auf der Grundlage einer Hockey Stick Verteilung durchgeführt wird. Für jedes Pathogen werden ca. 10.000 Simulationen durchgeführt. Dabei ist die Pathogenkonzentration immer gleich, die Dosis allerdings ändert sich aufgrund z.B. der variierenden Badedauer und/oder aufgenommener Wassermenge.

Entscheidend ist jedoch die Bewertung der errechneten Infektions- bzw. Erkrankungshäufigkeiten. Während die US EPA ein Erkrankungsrisiko durch Baden in Oberflächengewässern von 3,6 % toleriert, liegt der EU Badegewässerrichtlinie ein Wert von 3 – 5 % zu Grunde.

Zusätzlich kann für die Berechnung des Schadensmaßes das DALY-Konzept der WHO herangezogen werden. Mit diesem Konzept soll die Bedeutung verschiedener Krankheiten auf die Gesellschaft gemessen werden. Auch soll die Effizienz von Vorbeugung und Behandlung messbar werden. Mit DALY soll nicht nur die Sterblichkeit, sondern auch die Beeinträchtigung des normalen, beschwerdefreien Lebens durch eine Krankheit erfasst werden und in einer Maßzahl zusammengerechnet werden. Ein besonderer Vorteil des DALY ist der mögliche länder- und kulturübergreifende Einsatz. Es misst Gesundheitslücken und beschreibt den Unterschied zwischen einer tatsächlichen Situation und einer idealen Situation.

Ein einheitliches Bewertungskonzept zur Darstellung von Antibiotikaresistenzlagen für unterschiedlichen aquatischen Kompartimenten ist schwierig umzusetzen, da zurzeit keine standardisierten Vorgehensweisen definiert sind. Ein sinnvolles Bewertungskonzept muss ein integrativer Ansatz sein, der für eine Risikobewertung die vorherrschenden Bedingungen/Parameter berücksichtigt und separat bewertet, um letztlich eine integrative Gesamtbeurteilung abgeben zu können.

Einige wesentliche Parameter für die separaten Bewertungskonzepte sind: (i) die Gesamt-Bakterienfracht, (ii) Nachweisverfahren (Kultur-basiert und/oder DNA/RNA-basiert) (iii) Abundanzen von hygienisch-relevanten Mikroorganismen, (iv) Abundanzen von klinisch-relevanten Resistenzdeterminanten inklusive mobile genetische Elemente; (v) Nachweis von Multi-Resistenzen, (vi) Wirkung der Aufbereitungstechniken (Reduktionspotentiale), etc..



Speziell für die Bewertung der Antibiotikaresistenzen in aquatischen Bereichen ist zu beachten, dass nicht nur einzelne Trägerorganismen der Resistenzgene qualitativ/quantitativ erfasst werden, sondern, aufgrund der Mobilität der Antibiotikaresistenz-Determinanten zwischen unterschiedlichen Bakterienarten, deren Abundanzen in der Gesamtpopulation eines Habitats quantifiziert wird (siehe Ausführung zu Carbapenem-Resistenz in Enterobacteriaceae; Kapitel 1.7: Antibiotikaresistenz im Wasser).

Für jede dieser vorgeschlagenen Komponenten sollte eine Bewertung im Einzelfall vorgenommen werden und in eine skalierbare Matrix (Punktesystem/Ampelprinzip) überführt werden. Die Zusammenführung der Einzelkomponenten führen zu einem integrativen Bewertungsansatz, der die jeweiligen ausgewählten Parameter berücksichtigt.

Aus diesem Ansatz heraus wird deutlich, wie wichtig es ist, Nachweisverfahren zum Auftreten von Antibiotika-resistenten Bakterien und Resistenzgenen für den Umweltbereich zu definieren und Indikatoren für die Resistenzproblematik festzulegen, um eine Vergleichbarkeit von Studien zu gewährleisten.

Es müssen dafür jedoch allgemein gültige Grenzwerte geschaffen werden, die ähnlich wie bei chemischen Komponenten, bei Überschreitung ein Risikopotential definieren. Solche Angaben existieren für den klinischen Bereich, wenn es darum geht, Antibiotikaresistenz bei Bakterienisolaten aus Patienten zu charakterisieren. Dieser Ansatz ist aber für den Umweltbereich nicht definiert. Es ist hier anzumerken, dass diese Grenzwerte bezogen auf die Konzentration von Resistenzdeterminanten auch im klinischen Bereich nicht existiert. Eine Homogenisierung bzw. Vergleichbarkeit zwischen Umwelt- und Klinikstudien, wird aber vermutlich nur über die Analyse der Konzentrationen von Resistenzdeterminanten zu erreichen sein. Dies liegt im Wesentlichen in der fehlenden Kultivierbarkeit der meisten Umweltbakterien begründet.

Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick, auf welchen Grundlagen ein Bewertungskonzept für Antibiotikaresistenz in der Umwelt beruhen kann und welche Ziele damit erreicht werden sollen.



Abbildung 4: Grundlagen für die Erstellung eines angepassten Bewertungskonzepts

Beim Nachweis von hygienisch relevanten Bakterien kommen in der Praxis häufig kulturelle Nachweismethoden zum Einsatz. Dies ist zum einen hauptsächlich historisch begründet, da moderne kulturunabhängige Methoden noch relativ neu sind, und zum anderen sicherlich dem geschuldet, dass relevante Regelwerke und Normen (z.B. TrinkwV, Badegewässer-RL, etc.) mit ihren Richt- und Grenzwerten auf explizit genannte kulturelle Methoden verweisen.

Neuere Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass auch nicht-kultivierbare Bakterien in aquatischen Proben vorhanden sein können, welche nicht notwendigerweise tot sind, sondern sich in einem lebenden aber nicht-kultivierbaren Zustand (VBNC – viable but not cultivable) befinden. Dieser Anteil lässt sich beispielsweise mit molekularbiologischen Untersuchungsmethoden wie z.B. qPCR oder FISH erfassen. Mit neuesten Methoden wie z.B. der PMA- oder EMA-qPCR kann zudem unterschieden werden, ob es sich bei mittels PCR-Reaktionen nachgewiesenen Genabschnitten um intakte (lebende) Bakterien oder um geschädigte Bakterien (Zellwand-permeabel) und/oder freie DNA-Fragmente handelt. In Ergänzung zum kulturellen Befund erhält man mit diesen Methoden einen oft zahlenmäßig deutlich höheren Nachweis an nicht-kultivierbaren Organismen. Aktuell ist eine hygienische Bewertung dieser Befunde aber nicht zuverlässig möglich, da Kenntnisse zur Infektiosität dieser VBNC-Stadien oder gar Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die jeweiligen Bakterienarten fehlen. Zudem ist nicht vollständig bekannt, unter welchen Bedingungen ein Wechsel vom kultivierbaren in den nicht-kultivierbaren Zustand oder umgekehrt erfolgt. Für *P. aeruginosa* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kupferionen einen Wechsel in den VBNC-Status auslösen, und dass nach einem Rückgang der Kupferkonzentration die Kultivierbarkeit wieder hergestellt werden konnte (Dwidjosiswojo et al., 2001). Von ähnlichen Wechseln ist auch in der aquatischen Umwelt auszugehen. Der Einsatz molekularbiologischer kultivierungsunabhängiger Methoden macht

im Einzelfall Sinn, da (i) die Ergebnisse teilweise deutlich schneller vorliegen und (ii) die „Dunkelziffer“ der nicht-kultivierbaren aber dennoch vorhandenen Bakterien erfasst werden kann. Dennoch besteht deutlicher Forschungsbedarf für die Bewertung der damit erzielten Ergebnisse. Insbesondere die hygienische Relevanz der VBNC-Stadien gilt es weiter aufzuklären. Zudem sind qPCR-Nachweise die eine Unterscheidung von „lebenden“ und „toten“ Bakterien ermöglichen bislang nur für wenige Bakterienarten etabliert. Dies wäre jedoch nötig, um eine Unterscheidung bei der hygienischen Bewertung zu ermöglichen. Hier gilt es, die Methoden entsprechend auf die relevanten Erreger und die angezielten Probenmatrices zu übertragen.

Die Ausbreitung von Resistenzgenen kann durch Vermehrung der resistenten Bakterien (vertikaler Gentransfer von den „Eltern zu den Nachkommen“) aber auch durch horizontalen Gentransfer erfolgen. Im Gegensatz zu höheren Lebewesen können Mikroorganismen Teile ihres genetischen Materials ohne Vermehrung zwischen Zellen der gleichen Art und auch über Art- und Gattungsgrenzen hinweg austauschen (Smalla, 2003). Diese Resistenzübertragung kann durch Plasmide von einem Bakterium zum Nächsten (Konjugation), Viren (Transduktion) oder freie DNA (Transformation) erfolgen. Der horizontale Gentransfer ist für die Ausbreitung besonders wichtig, da ein Austausch zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Organismen und vice versa erfolgen kann (Schwartz und Kohnen, 2008).

Generell ist das Risiko des Resistenzgentransfers schwer zu quantifizieren, weil nur wenige Daten zum Gentransfer existieren. Es gibt einige wenige Studien zur Übertragungshäufigkeit von Antibiotikaresistenzgenen (siehe z.B. Hunter et al., 2008). Dabei handelt es sich aber vor allem um klinische Studien, deren Übertragbarkeit auf Umweltbedingungen kritisch zu bewerten ist.

Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass Bakteriophagen als Reservoir für Antibiotikaresistenzgene dienen können, und eine wichtige Rolle bei ihrer Mobilisierung spielen (Calero et al., 2014).

Um gezielt eine Reduktion der Ausbreitung von klinisch-relevanten, Antibiotika-resistenten Bakterien und deren Resistenzgene zu kontrollieren und Ausbreitungswege zu überwachen, müssen kulturbasierte und molekularbiologische Nachweisverfahren für den Umweltbereich definiert werden. Ein Augenmerk bei der Definition dieser Verfahren muss ihre Kompatibilität mit klinischen Daten sein.

In diesem Zusammenhang muss die Bedeutung von biologischen Prozessen, Technologien und operativen Parametern in der Abwasserbehandlung für die Evolution von Antibiotikaresistenzen und Antibiotika-resistenten Bakterien besser verstanden werden, um gezielt diese Entwicklung zu minimieren bzw. zu kontrollieren. Für ein besseres Verständnis der mikrobiologischen Dynamiken in den Filtersystemen sollten zukünftige Untersuchungen mit den Populationsdynamischen Prozessen in Biofilmen auf den Filtersubstraten konzentrieren, um zu zeigen, ob Antibiotika-resistente Keime ein anderes Adhäsionspotential ausweisen als Antibiotika-sensitive, und welche Risiken damit einher gehen können.

Ein Ansatz dazu ist die Anwendung von „Next generation sequencing“ Technologien, die das Metagenom einer Gesamtpopulation abbilden kann, und damit die konventionelle PCR und qPCR komplementiert. Mit Hilfe dieser neuen Technologie ist es möglich, erweiterte Genomdatenbanken auch von Umweltbakterien zu erstellen, deren Rollen in der Evolution und im Transfer von Antibiotikaresistenzen noch weitgehend unbekannt sind. Hierbei kann auch gezielt auf mobile genetische Resistenzelemente (z.B. Integrons, Transposons, Plasmide) fokussiert werden, um deren Einfluss auf die Resistenzentwicklung zu beschreiben (Schwartz et al., 2014).

In der Abwasser – aber auch in der Trinkwasseraufbereitung – sind molekulare Antworten von Bakterien auf konventionelle und alternative Behandlungsverfahren (z.B. Chlorung, Ozonung, UV-Bestrahlung) zur Inaktivierung von problematischen Keimen nur unzureichend verstanden. Dies liegt vor allem an der kulturbasierten Effizienztestung der Verfahren mit Hilfe von Referenzbakterien. Die Untersuchungen aus RiSKWa zeigten zwar eine deutliche Reduktion der Bakterienfracht, z.B. bei der Ozonung von Abwasser, jedoch bei gleichzeitiger Selektion von Antibiotika-resistenten Bakterien in überlebenden Populationsanteilen. Die Mechanismen sind noch nicht verstanden und bedingen ein mögliches Restrisikopotential beim Einsatz solcher Verfahren in der Abwasserbehandlung. Auch die Rolle, die Biofilmen als Reservoir von Antibiotikaresistenz-Determinanten einnehmen, ist noch weitergehend ungeklärt.

Durch die Düngung mit antibiotikahaltigem Tierdung und Klärschlamm wurden und werden Antibiotika in Böden eingetragen. Bodenmikroorganismen unterliegen, in Abhängigkeit der Dosis und Wirkungsdauer der vorliegenden Antibiotika, selektiven Wirkungen, die zu Veränderungen der Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation von Böden führen können. Außerdem besitzen zahlreiche Bodenmikroorganismen eine natürliche intrinsische Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika. Gegenüber der Resistenzinduktion durch in Böden eingetragene Antibiotika wird dem direkten Eintrag resistenter Keime über Gülle, Mist und Klärschlamm, sowie dem Transfer der Resistenzgenen von den eingetragenen Organismen an die Bodenmikroflora, wesentlich höhere Bedeutung beigemessen. Allerdings ist bisher wenig über die Relevanz von Boden als natürliches Reservoir von Resistenzgenen und davon ausgehende Verbreitung in der Umwelt bekannt. Hierfür müssten verschiedene Pfade wie die Übertragung auf Pflanzen, Abschwemmung von der Oberfläche und Eintrag ins Grundwasser berücksichtigt werden.

Weiterhin sollten Antibiotikaresistenzdeterminanten in den Bereichen Abwasser, Oberflächenwasser, Rohwasser und Trinkwasser gezielt untersucht werden, um zu erkennen, inwieweit genetische Informationen über Pathogene ausgetauscht und Umweltbakterien als Vehikel für Resistenz- und Virulenzfaktoren fungieren können. Im Projekt ANTI-Resist konnte gezeigt werden, dass diese Informationen eine Grundlage für die Entwicklung von immisionsbezogenen Managementoptionen sind, und dass hier bereits die Vergabe von Antibiotika in ein solches Konzept mit einbezogen werden muss.

Die aquatische Umwelt spielt zweifelsohne bei der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen eine wichtige Rolle. Dies bezieht sich auch auf die Entstehung von neuen klinisch relevanten Antibiotikaresistenzen in der Umwelt, ohne die genauen Entwicklungsprozesse zu kennen.

Daten belegen, dass der Ursprung von klinisch relevanten Resistenzgenen auch in der Umwelt und nicht nur im klinischen Bereich zu finden ist. Diese Erkenntnisse zeigen den Zusammenhang von Evolution und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Kliniken und urbanen Umwelthabitaten. Für den Umweltbereich liegen jedoch keine umfassenden Daten vor, die es erlauben würden, eine Bewertung eines bestehenden Risikos durch Antibiotikaresistenzen vorzunehmen. Demzufolge wäre es sinnvoll, solche Informationen in übergreifenden Datenbanken zusammen mit systematisch ausgewählten Parametern zu erfassen, um ein erweitertes Verständnis zu Antibiotikaresistenz-Dynamiken in einem globalen Maßstab zu erhalten. Ähnliche Datenbanken für klinische Daten aus Europa sind EARSS und EUCAST. Umweltdaten sind dabei jedoch nicht berücksichtigt. Regularien wie die Wasserrahmenrichtlinie (Water Framework Directive 2000/60/EC) fordern zwar einen guten biologischen und chemischen Status von Wasserkörpern mit Bezug auf spezifische Umweltqualitätsstandards. Die Berücksichtigung von Krankheitserregern, wie auch

spezifischen, klinisch relevanten Antibiotika-resistenten Bakterien bzw. Antibiotikaresistenzgenen ist in nationalen und internationalen Regularien zurzeit jedoch nicht enthalten; sollte aber aufgrund der kontinuierlichen Zunahme von Antibiotikaresistenzen in den verschiedenen natürlichen Wasserkörpern Eingang finden. Standardisierte Überwachungsstrategien für Antibiotika-resistente Bakterien mit klinischer Relevanz in der aquatischen Umwelt würden somit der allgemeinen Gesundheitsvorsorge dienen. Ganz gezielt könnten dann lokale kritische Bereiche (z.B. stark belastete Abwasserteilströme) mit geeigneten Techniken behandelt werden, um Bakterienfrachten und damit das Verbreitungsrisiko von Antibiotikaresistenzen zu minimieren. Es bleibt festzustellen, dass es derzeit nicht möglich ist, einen Ist-Zustand der Verbreitung klinisch relevanter Antibiotikaresistenzen in der Umwelt zu beschreiben. Neben technischen Herausforderungen wird es eine der wesentlichen Aufgaben sein, Nachweismethoden zu etablieren, welche sowohl den klinischen Notwendigkeiten als auch den Ansprüchen einer Umweltanalyse genügen.

## Referenzen

- Ali, S.H. (2004): A socio-ecological autopsy of the E. coli O157:H7 outbreak in Walkerton, Ontario, Canada. *Soc Sci Med.* 58:2601-2612.
- ANSES (2011): Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on „Methods of detection and enumeration of *Legionella* in water. ISBN 978-2-11-128215-5
- Armstrong, J. L., D. S. Shigeno, J. J. Calomiris, R. J. Seidler (1981): Antibiotic-resistant bacteria in drinking-water. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 277-283.
- Atherton, F., C.P. Newman, D.P. Casemore (1995): An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a public water supply in the UK. *Epidemiol Infect.* 115:123-131.
- Auld, H., D. MacIver, J. Klaassen (2004): Heavy rainfall and waterborne disease outbreaks: the Walkerton example. *J Toxicol Environ Health A.* 67:1879-1887.
- Baggi, F., A. Demarta, R. Peduzzi (2001) Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol.* 152:743-751.
- Bales, S., H.G. Baumann, N. Schnitzler (2001): Infektionsschutzgesetz, Kommentar und Vorschriftensammlung. W. Kohlhammer, Stuttgart.
- Bofill-Mas, S., S. Pina, R. Girones (2000): Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 66:238-245.
- Boulanger, C. A., P. H. Edelstein (1995): Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1805–1809
- Brieseman, M.A. (1987): Town water supply as the cause of an outbreak of *Campylobacter* infection. *N Z Med J.* 100:212-213.
- Bundesministerium für Gesundheit (2013): Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001). Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. August 2013 (BGBl. I S. 2977), die durch Artikel 4 Absatz 22 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist.
- Cantas et al. (2013): A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology* 4, 96
- Calero-Caceres W., A. Melgarejo, C. Stoll, M. Colomer Lluch, F. Lucena Gutierrez, J. Jofre, M. Muniesa (2014): Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* In press
- Carducci, A., P. Morici, F. Pizzi, R. Battistini, E. Rovini, M. Verani (2008): Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Sci Technol.* 58:893-897.
- Carrique-Mas, J., Y. Andersson, B. Petersen, K.O. Hedlund, N. Sjogren, and J. Giesecke (2003): A norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. *Epidemiol Infect.* 131:737-744.
- Carstens A., U. Keppler, M. Exner, A. Hauri, M. Kaase, C. Wendt (2014): Plasmid-vermittelter Multispezies-Ausbruch mit Carbapenem-resistenten Enterobacteriaceae. *Epidemiologisches Bulletin* 2014(47):455 - 459.
- CDC (2013): Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water and Other Nonrecreational Water — United States, 2009–2010. *MMWR CDC Surveill Summ.* 62:714 - 720.
- Charron, D., M. Thomas, D. Waltner-Toews, J. Aramini, T. Edge, R. Kent, A. Maarouf, J. Wilson (2004): Vulnerability of waterborne diseases to climate change in Canada: a review. *J Toxicol Environ Health A.* 67:1667-1677.
- Chorus, I., H.-C. Selinka, R. Szewzyk (2013): Virologische Untersuchungen sowie Ermittlung der Eliminationsleistung der Langsandsandfiltration unter anaeroben Bedingungen. *Abschlussbericht zum BMBF-Verbundvorhaben. Umweltbundesamt Berlin.*
- Cordoba M. A., I. L. Rocchia, M. M. De Luca, B. C. Pezzani, J. A. Basualdo (2001): Resistance to antibiotics in injured coliforms isolated from drinking water. *Microbiol. Immunol.* 45: 383-386.
- Craun, G.F. (1979): Waterborne giardiasis in the United States: a review. *Am J Public Health.* 69:817-819.
- Craun, G.F., J.M. Brunkard, J.S. Yoder, V.A. Roberts, J. Carpenter, T. Wade, R.L. Calderon, J.M. Roberts, M.J. Beach, S.L. Roy (2010): Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clin Microbiol Rev.* 23:507-528.
- Curriero, F.C., J.A. Patz, J.B. Rose, S. Lele (2001): The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *Am J Public Health.* 91:1194-1199.
- D'Antonio, R.G., R.E. Winn, J.P. Taylor, T.L. Gustafson, W.L. Current, M.M. Rhodes, G.W. Gary, Jr., R.A. Zajac (1985): A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Intern Med.* 103:886-888.
- DANMAP [internet]. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. [30 August 2014]. Available from: <http://www.danmap.org/2011>.
- DIN EN ISO 11731-2 (2008): Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen – Teil 2: Direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl. Beuth-Verlag, Berlin
- Drayna, P., S.L. McLellan, P. Simpson, S.H. Li, M.H. Gorelick: Association between rainfall and pediatric emergency department visits for acute gastrointestinal illness. *Environ Health Perspect.* 118:1439-1443.
- Dura, G., T. Pandics, M. Kadar, K. Krisztalovics, Z. Kiss, J. Bodnar, A. Asztalos, E. Papp: Environmental health aspects of drinking water-borne outbreak due to karst flooding: case study. *J Water Health.* 8:513-520.
- DVGW Arbeitsblatt W 551 (2004): Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen – Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums – Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasserinstallationen. Beuth-Verlag, Berlin
- El-Zanfaly H. T. (1991): The need for new microbiological water-quality criteria. *Wat. Sci. Technol.* 24: 41-48.
- EUCAST (2013): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org/2013>.
- Exner, M., V. Gornik (2004): Parasitic zoonoses transmitted by drinking water. Giardiasis and cryptosporidiosis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 47:698-704.
- Exner, M., C. Koch, J. Gebel (2011): Relevante wasserassoziierte Krankheitserreger sowie Indikatoren und deren hygienisch-medizinische Bedeutung. *Umweltmed Forsch Prax.* 16:141 - 160.
- Exner, M., S. Pleischl, H.J. Grummt, S. Engelhart (2011): Erfahrungen zur Prävention und Kontrolle von Legionellen in Deutschland Plädoyer für ein proaktives Risikomanagement 1. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 54:699-708.
- Exner, M., G.J. Tuschewitzki (1994): Zum Vorkommen und Bewertung von Krankheitserregern und Indikatorbakterien im Rohwasser und Trinkwasser der Aufbereitungsanlage Roetgen sowie zu Kontroll- und Präventionsmaßnahmen zur Sicherstellung einer hygienisch einwandfreien Trinkwasserqualität Hygiene Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen.
- Fields, B. S., R. F. Benson, R. E. Besser (2002): *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:506–526.
- Fong, T.T., M.S. Phanikumar, I. Xagorarakis, J.B. Rose (2010): Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol.* 76:715-723.
- Franke, C., A. Rechenburg, S. Baumann, M. Willkomm, E. Christoffels, M. Exner, T. Kistemann (2009): The emission potential of different land use patterns for the occurrence of coliphages in surface water. *Int J Hyg Environ Health.* 212:338-345.
- Gantzer, C., A. Maul, J.M. Audic, L. Schwartzbrod (1998): Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl Environ Microbiol.* 64:4307-4312.
- Gerba, C.P., J.B. Rose (1990): *Viruses in Source and Drinking Water.* Springer Verlag, New York.
- Germap (2012): Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch, Bericht über Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der human- und Veterinärmedizin in Deutschland, [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05\\_Tierarzneimittel/germap2012.html](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/germap2012.html); jsessionid=B905EF1A1C481E4391EEDD2869C7BB36.2\_cid340
- Hamza, I.A., L. Jurzik, A. Stang, K. Sure, K. Uberla, M. Wilhelm (2009): Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 43:2657-2668.
- Hauri, A.M., M. Schimmelpfennig, M. Walter-Domes, A. Letz, S. Diedrich, J. Lopez-Pila, and E. Schreier (2005): An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol Infect.* 133:291-298.
- Hayes, E.B., T.D. Matte, T.R. O'Brien, T.W. McKinley, G.S. Logsdon, J.B. Rose, B.L. Ungar, D.M. Word, P.F. Pinsky, M.L. Cummings, and et al. (1989): Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N Engl J Med.* 320:1372-1376.
- Heß S., C. Gallert (2014): Demonstration of staphylococci with inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) resistance in sewage and river water and of the capacity of anhydroerythromycin to induce MLS<sub>B</sub>, *FEMS Microbiol Ecol* 88 (1):48-59
- Holme, R. (2003): Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event. *Water Sci Technol.* 47:1-6.
- Hot, D., O. Legeay, J. Jacques, C. Gantzer, Y. Caudrelier, K. Guyard, M. Lange, L. Andreoletti (2003): Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* 37:4703-4710.
- Hoxie, N.J., J.P. Davis, J.M. Vergeront, R.D. Nashold, K.A. Blair (1997): Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Public Health.* 87:2032-2035.
- Hrudey, S.E., E.J. Hrudey (2007): Published case studies of waterborne disease outbreaks—evidence of a recurrent threat. *Water Environ Res.* 79:233-245.
- Hrudey, S.E., P. Payment, P.M. Huck, R.W. Gillham, E.J. Hrudey (2003): A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci Technol.* 47:7-14.
- Hunter P. R., D. C. Wilkinson, L. A. Catling, G. C. Barker (2008): Meta-analysis of experimental data concerning antimicrobial resistance gene transfer rates during conjugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (19): 6085-6090.
- ISO 11731 (1998): Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen. Beuth-Verlag, Berlin



- ISO/TS 12869 (2012): Water quality – Detection and quantification of *Legionella spp.* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genetic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Beuth-Verlag, Berlin.
- Jiang, S.C., W. Chu (2004) PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol.* 97:17-28.
- Jones, I.G., M. Roworth (1996) An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health.* 110:277-282.
- Jurzik, L., I.A. Hamza, W. Puchert, K. Uberla, M. Wilhelm (2010): Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *Int J Hyg Environ Health.* 213:210-216.
- Kahlmeter G. (2014): Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Ups J Med Sci.* 119(2), 78-8.
- Kaplan, J.E., R.A. Goodman, L.B. Schonberger, E.C. Lippy, G.W. Gary (1982): Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis.* 146:190-197.
- Kistemann, T. (1997): Trinkwasserinfektionen - Risiken in hochentwickelten Versorgungsstrukturen. *Geographische Rundschau* 49:210 - 215.
- Kistemann, T., T. Classen, C. Koch, F. Dangendorf, R. Fischeder, J. Gebel, V. Vacata, M. Exner (2002): Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Appl Environ Microbiol.* 68:2188-2197.
- Kistemann, T., T. Claßen, M. Exner (2003): Der erste Giardiasis Ausbruch durch Trinkwasser in Deutschland. *bbr Fachmagazin für Brunnen und Leitungsbau*:40 - 46.
- Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal, J.M. Lopez-Pila (1993): Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 59:1213-1219.
- Kramer, M.H.Q., G.; P. Hartemann, M. Exner (2001): Waterborne diseases in Europe, 1986-1996, . *J Am Water Works Assoc.* 93:48 - 53.
- Krewski, D., J. Balbus, D. Butler-Jones, C. Haas, J. Isaac-Renton, K.J. Roberts, M. Sinclair (2002): Managing health risks from drinking water--a report to the Walkerton inquiry. *J Toxicol Environ Health A.* 65:1635-1823.
- Kukkula, M., P. Arstila, M.L. Klossner, L. Maunula, C.H. Bonsdorff, P. Jaatinen (1997): Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* 29:415-418.
- Kukkula, M., L. Maunula, E. Silvennoinen, C.H. von Bonsdorff (1999): Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 180:1771-1776.
- Lee J V, S. Lai, M. Exner, J. Lenz, V. Gaia, S. Casati, P. Hartemann, C. Lück, B. Pangon, M. L. Ricci, M. Scaturro, S. Fontana, M. Sabria, I. Sanchez, S. Assaf, S. Surman-Lee (2011): An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *J Appl. Microbiol.* 110: 1032-1044
- Lopez, C.E., A.C. Dykes, D.D. Juraneck, S.P. Sinclair, J.M. Conn, R.W. Christie, E.C. Lippy, M.G. Schultz, M.H. Mires (1980): Waterborne giardiasis: a communitywide outbreak of disease and a high rate of asymptomatic infection. *Am J Epidemiol.* 112:495-507.
- Mac Kenzie, W.R., N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addiss, K.R. Fox, J.B. Rose, and et al. (1994): A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 331:161-167.
- MacKenzie, W.R., W.L. Schell, K.A. Blair, D.G. Addiss, D.E. Peterson, N.J. Hoxie, J.J. Kazmierczak, J.P. Davis (1995): Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis.* 21:57-62.
- Matsell, D.G., C.T. White (2009): An outbreak of diarrhea-associated childhood hemolytic uremic syndrome: the Walkerton epidemic. *Kidney Int Suppl*:S35-37.
- Maunula, L., I.T. Miettinen, and C.H. von Bonsdorff (2005): Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis.* 11:1716-1721.
- McQuaig, S.M., T.M. Scott, J.O. Lukasik, J.H. Paul, V.J. Harwood (2009): Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 75:3379-3388.
- Medema, G., Loret, J.F., Stenström, T.-A., Ashboldt (2006): Final Report- Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan. <http://www.kiwa.nl>.
- Medema, G.J., W. Hoogenboezem, A.J. van der Veer, H.A. Ketelaars, W.A. Hijnen, P.J. Nobel (2003): Quantitative risk assessment of *Cryptosporidium* in surface water treatment. *Water Sci Technol.* 47:241-247.
- Mentzing, L.O. (1981): Waterborne outbreaks of campylobacter enteritis in central Sweden. *Lancet.* 2:352-354.
- Merbecks, S. (2004): Zu einer Häufung von Norovirus-Erkrankungen als Folge verunreinigten Trinkwassers. *Epidemiol Bull.* 301 - 302.
- Meyer et al., (2013): Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany, *Int. J of Medical Microbiology*, 303, 388-395
- Miagostovich, M.P., F.F.M. Ferreira, F.R. Guimaraes, T.M. Fumian, L. Diniz-Mendes, S.L.B. Luz, L.A. Silva, J.P.G. Leite (2008): Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microb.* 74:375-382.
- Moist, L.M., J.M. Sontrop, A.X. Garg, W.F. Clark, R.S. Suri, M. Salvadori, R.J. Gratton, J. Macnab (2009): Risk of pregnancy-related hypertension within five years of exposure to bacteria-contaminated drinking water. *Kidney Int Suppl*:S47-49.
- Myrmel, M., E. Rimstad, Y. Wasteson (2000): Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int J Food Microbiol.* 62:17-26.
- N.N. 2005. Dutch Drinking Water Directive (2005): Inspectierichtlijn. Analyse micro-biologische veiligheid drinkwater. VROM-Inspectie, editor, The Hague, Netherlands.
- Neringer, R., Y. Andersson, R. Eitrem. 1987. A water-borne outbreak of giardiasis in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 19:85-90.
- Nocker A., P. Sossa-Fernandez, M.D. Burr, A.K. Camper (2007): Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol.* 73:5111-7.
- Nurgalieva, Z.Z., H.M. Malaty, D.Y. Graham, R. Almuchambetova, A. Machmudova, D. Kapsultanova, M.S. Osato, F.B. Hollinger, A. Zhangabylov (2002): *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *Am J Trop Med Hyg.* 67:201-206.
- O'Connor, D.R. (2002): Report of the Walkerton Inquiry: The Events of May 2000 and Related Issues. <http://www.walkertoninquiry.com/report1/index.html>.
- Oliver JD. (2005): The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93-100.
- Oliver JD. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:415–25.
- Olsen, S.J., G. Miller, T. Breuer, M. Kennedy, C. Higgins, J. Walford, G. McKee, K. Fox, W. Bibb, P. Mead (2002): A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. *Emerg Infect Dis.* 8:370-375.
- Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, R. Girones (1998): Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 64:3376-3382.
- Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, R. Girones (1994): Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested Pcr Amplification. *Appl Environ Microb.* 60:2963-2970.
- Ramsay, C.N., A. P Wagner, C. Robertson, H.U. Smith, K. Pollock (2014): Effects of Drinking-Water Filtration on *Cryptosporidium* Seroepidemiology, Scotland. *Emerg. Inf. Dis.* 20:70 - 76.
- Richardson, A.J., R.A. Frankenberg, A.C. Buck, J.B. Selkon, J.S. Colbourne, J.W. Parsons, R.T. Mayon-White (1991): An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. *Epidemiol Infect.* 107:485-495.
- Risebro, H.L., M.F. Doria, Y. Andersson, G. Medema, K. Osborn, O. Schlosser, P.R. Hunter (2007): Fault tree analysis of the causes of waterborne outbreaks. *J Water Health.* 5 Suppl 1:1-18.
- Robert Koch Institut (2012): Legionärskrankheit im Jahr 2011. *Epidemiologisches Bulletin* Dezember 2012 (50):499-507
- Papandreou, S., O. Pagonopoulou, A. Vantarakis, M. Papapetropoulou (2000): Multiantibiotic resistance of gram-negative bacteria from drinking water samples in southwest Greece. *J. Chemother.* 12: 267-273.
- Papapetropoulou, M., J. Iliopoulou, G. Rodopoulou, J. Detorakis, O. Paniara (1994): Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking-water in Southern Greece. *J. Chemother.* 6: 111-116.
- Pathak, S. P., A. R. Gautam, A. Gaur, K. Gopal, P. K. Ray (1993): Incidence of transferable antibiotic-resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* in urban drinking-water. *J. Environ. Sci. Health Part A – Environmental Science and Engineering and Toxic/Hazardous Substance Control* 28: 1445-1455.
- Pruden, A., R. Pei, H. Storteboom, K. H. Carlson (2006): Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7445-7450.
- Seiler, C., T.U. Berendonk (2012): Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol* 3:399.
- Schindler, P. R., G. H. Metz (1991): Coliform bacteria in drinking-water from South Bavaria - identification by the Api 20E-System and resistance patterns. *Wat. Sci. Technol.* 24: 81-84.
- Schmoll, O.C., I.; I. Feuerpfeil, H.-C. Selinka, R. Szewzyk (2012): Die Bewertung gesundheitlicher Risiken durch Krankheitserreger im Trinkwasser: Theoretische Maßstäbe und praktische Konsequenzen. *Umweltmed Forsch Prax.* 17:81 - 95.
- Schwartz, T., H. Volkmann, S. Kirchen, K. Kohnen, K. Schön-Hölz, B. Jansen, et al. (2006): Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 158–67.
- Schwartz, T., W. Kohnen (2008): Antibiotikaresistenzen in Abwasser – Nachweis und Vermeidung der Verbreitung. *GWF Wasser Abwasser* 148 (12): 886-891

- Schwartz, T., W. Kohnen, B. Jansen, U. Obst. (2003): Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 325-335.
- Smalla, K. (2003): Bakterielle Antibiotikaresistenzgene und horizontaler Gentransfer. Forschungsreport: Verbraucherschutz - Ernährung - Landwirtschaft. Die Zeitschrift des Senats der Bundesforschungsanstalten. 10: 36-39.
- Stoll, C., J. P. Sidhu, A. Tiehm, S. Toze (2012): Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ. Sci. Technol.*, 46 (17), 9716-26.
- Thomas, K.M., D.F. Charron, D. Waltner-Toews, C. Schuster, A.R. Maarouf, J.D. Holt (2006): A role of high impact weather events in waterborne disease outbreaks in Canada, 1975 - 2001. *Int J Environ Health Res.* 16:167-180.
- Tiehm, A., C. Stoll, S. Langer, H.-P. Rohms, T. Binder, V. Schumacher (2009): Bedeutung von Antibiotikaresistenzen für die Rohwasserqualität: Vorkommen, Transport und natürliche Eliminationsprozesse. Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Karlsruhe Band 40, ISSN 1434-5765.
- Tiehm, A., M. Stieber, C. Stoll, H.-P. Rohms, V. Schumacher, T. Binder (2006): Bedeutung von Antibiotikaresistenzen für die Rohwasserqualität. *energie/wasser-praxis* 12/2006: 12-13
- Tillett, HE, d.L.J., P.G. Wall (1998): Surveillance of outbreaks of waterborne infectious diseases: categorising levels of evidence. *Epidemiol Infect.* 120:37 - 42.
- Tokajian, S., F. Hashwa. (2004): Incidence of antibiotic resistance in coliforms from drinking water and their identification using the biolog and the API identification systems. *J. Chemother.* 16: 45-50.
- Trevors, J. (2011): Viable but not-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells. *J Microbiol Methods* 86:266-73.
- Varela Villarreal, J., C. Jungfer, U. Obst, T. Schwartz (2013): DNase I and proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *J. Microbiol Meth.* 94:161-169.
- VDI/DVGW-Richtlinie 6023 (2013): Hygiene in Trinkwasser-Installationen – Anforderungen an Planung, Ausführung, Betrieb und Instandhaltung. Beuth-Verlag, Berlin.
- Volkman, H., T. Schwartz, P. Bischoff, S. Kirchen, U. Obst (2004): Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J Microbiol Methods* 56:277-86.
- Wadowsky, R. M., R. B. Yee (1981): Glycine-Containing Selective Medium for Isolation of *Legionellaceae* from Environmental Specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:768-772.
- Wiegand, I., K. Hilpert, R.E. Hancock. (2008): Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3(2), 163-75.
- WHO (2008): Guidelines for drinking water. 3rd ed. Geneva: World Health Organization.
- Xi, C., Y. Zhang, C. F. Marrs, W. Ye, C. Simon, B. Foxman, J. Nriagu. (2009): Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (17): 5714-5718.

