

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

**Elimination von
somatischen und f-spezifischen Bakteriophagen,
sowie enteropathogenen Viren aus Abwasser
mittels Membranbelebungsverfahren**

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

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

**vorgelegt von
Katrin Regina Hupfauf
aus
Ulm**

2007

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

**Elimination von
somatischen und f-spezifischen Bakteriophagen,
sowie enteropathogenen Viren aus Abwasser
mittels Membranbelebungsverfahren**

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

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

**vorgelegt von
Katrin Regina Hupfauf
aus
Ulm**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Botzenhart

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Flehmig

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1. Einleitung	7
1.1. Übertragung von Krankheiten durch verunreinigtes Wasser	7
1.2. Abwasserreinigung mittels Membranbelebungsverfahren.....	13
1.3. Zielsetzung.....	15
2. Material.....	16
2.1. Wasserproben.....	16
2.1.1. Probennahme in der Kläranlage	19
2.1.2. Lehr- und Forschungsklärwerk der Universität Stuttgart (LFKW) in Büsnau	16
2.1.3. Versuchskläranlage (Membranbelebungsanlage) des Institutes für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft in Stuttgart-Büsnau	16
2.2. Allgemein verwendete Lösungen.....	19
2.3. Geräte und sonstige Laborausstattung.....	20
2.4. Software	22
2.5. Wirtsstämme für Phagenassays	22
2.6. Virenstamm als Standard für die LightCycler™ PCR	23
2.7. Lösungen für den Nachweis f-spezifischer Coliphagen	23
2.7.1. TYGA-Agar	23
2.7.2. ssTYGA-Agar	23
2.7.3. TYGB-Bouillon.....	24
2.7.4. Calciumglukoselösung.....	24
2.8. Lösungen für den Nachweis somatischer Coliphagen	25
2.8.1. Müller-Hinton-Bouillon	25
2.8.2. PAC-Agar	25
2.8.3. Calciumchloridlösung.....	26

2.9. Lösungen für den Nachweis von enteropathogenen Viren	26
2.9.1. Elutionspuffer für Glaswollfiltration.....	26
2.9.2. RNA-Isolierungskit.....	27
2.9.3. Primer/Sonden-Mix für den Nachweis enteroviraler RNA mittels Light Cycler TM PCR.....	28
3. Methoden.....	29
3.1. Nachweis von f-spezifischen Coliphagen im Abwasser (nach Havelaar und Hogeboom).....	29
3.1.1. Vorbereitungen zum Nachweis der f-spezifischen Phagen.....	29
3.1.2. Herstellung der Inokulumkultur und Ansatz der Phagenassays.....	30
3.2. Nachweis von somatischen Coliphagen	31
3.2.1. Vorbereitungen zum Nachweis der somatischen Coliphagen.....	31
3.2.2. Ansatz zum Nachweis der somatischen Coliphagen	32
3.3. Aufkonzentrierung enterischer Viren mittels Glaswollefiltration	32
3.3.1. Vorbereitungen und Durchführung der Glaswollefiltration	33
3.3.2. Eluieren der Viren aus den Säulen	34
3.4. Isolierung der Virus-RNA mittels High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).....	35
3.4.1. Vorbereitung des Kits	35
3.4.2. Durchführung der RNA-Isolierung mittels modifiziertem Standardprotokoll des High Pure Nucleic Acid Kit (Roche)	36
3.4.3. Lithiumchloridbehandlung.....	37
3.4.4. Vorbereitungen und Durchführung der LightCycler TM PCR	37
4. Ergebnisse	39
4.1. Zu- und Ablaufkonzentrationen für somatische Bakteriophagen ...	39
4.2. Zu- und Ablaufkonzentrationen für f-spezifische Bakteriophagen .	41
4.3. Eliminationsleistung der Membranbelebungsanlage für somatische und f-spezifische Bakteriophagen.....	44
4.4. Ergebnisse der Light CyclerTM PCR	44

5.	Diskussion	45
5.1.	Belastung der Oberflächengewässer durch Kläranlagenabwasser	45
5.2.	Viruskonzentrationen mittels Light Cyclers TM PCR	45
5.3.	Eliminationsleistung der Membranbelebungsanlage	46
5.4.	Membranbelebungsverfahren als Desinfektionsverfahren.....	48
6.	Zusammenfassung.....	49
7.	Anhang	50
8.	Literaturverzeichnis.....	62
	Danksagung.....	67
	Lebenslauf	68

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
BE	Beef Extrakt (Fleischextrakt)
Bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ECHO	Enteric cytopathic human orphan virus
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Insg.	insgesamt
konz.	konzentriert
l	Liter
LFKW	Lehr- und Forschungsklärwerk
M	molar
mg	Milligramm
min	mindestens
Min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PCR	polymerase chain reaction
phys. NaCl	physiologische Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion mit vorausgegangener Transkription
s	Sekunde(n)
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
TS	Trockensubstanz
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vol	Volumen
x g	x Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Übertragung von Krankheiten durch verunreinigtes Wasser

Der Mensch verbringt schon seit jeher seine Freizeit sehr gerne in, am und mit dem Wasser, was jedoch auch einige Probleme aufwirft. So erkannte man auch schon früh, dass sich hinter dem kühlen, erfrischenden Nass auch potentielle Übertragungswege für Krankheiten verbergen können, z.B. fand Stevensons 1953 heraus, dass das Baden in Gewässern mit mäßig starker Abwasserbelastung (total coliforme Bakterien $>2300 - 2400$ KBE / 100 ml Badewasser) überdurchschnittlich häufig mit nachfolgenden Diarrhöen einherging (46).

In Deutschland besteht im Allgemeinen kein hohes Infektionsrisiko durch Baden in einem zugelassenen natürlichen Gewässer. Eine Infektionsgefahr besteht hier vor allem, wenn Erreger durch mit Fäkalien kontaminierte und unzureichend gereinigte Abwässer in Seen oder Flüsse geraten (9), welche es daher dringend zu erkennen und zu vermeiden gilt.

Häufige, durch Wasser übertragene Erkrankungen, sind Erkrankungen der Atemwege und Schleimhäute von Augen, Nase und Rachen, Magen-Darmerkrankungen, sowie Hauterkrankungen. Das Spektrum reicht von Konjunktividen über Gastroenteritiden bis hin zu Warzenbefall durch das Molluscum contagiosum. Weitere schwerwiegendere Erkrankungen wie Hepatitis A und E, Cholera, Typhus und Poliomyelitis, um nur einige wenige zu nennen, sind ebenfalls nicht außer Acht zu lassen, auch wenn sie in unseren Gebieten eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Vor allem Viren, die beispielsweise durch Einbringen von fäkalienhaltigen Abwässern in ein Oberflächengewässer gelangen (40), adsorbieren häufig an sedimentierbare Schwebstoffe und gelangen so in die Gewässersedimente. In diesem Zustand sind sie länger infektiös als freie Viren und können durch Stürme, Boote, Taucher, Badende, etc wieder aufgewirbelt werden und Infektionen verursachen (52).

Tabelle 1:

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

Adenoviren	Zur Zeit sind 47 humanpathogene Adenovirus-Serotypen bekannt, die in 6 Subgruppen (A-F) unterschieden werden. Adenoviren kommen weltweit ohne wesentliche jahreszeitliche Schwankungen vor. Verursachte Erkrankungen: Infektionen des Respirationstraktes (Pharyngokonjunktivalfieber, Bronchitis, Pneumonie), Enteritis (Gastroenteritiden v.a. bei Säuglingen mit der Komplikation der Darminvagination), Konjunktivitis, epidemische Keratokonjunktivitis, (hämorrhagische) Zystitis, bei Immungeschwächten oft disseminierte, teils lebensbedrohliche Verläufe mit Hepatitis, Enzephalitis, Pankreatitis etc Man schätzt, dass Adenoviren an 5 - 10 % aller Respirationstraktfektionen beteiligt sind, des Weiteren sind sie die zweithäufigste virale Ursache für Gastroenteritiden bei Säuglingen (38).
Reoviren (Rotavirus, Reovirus)	Die Abkürzung „REO“ steht für Respiratory Enteric Orphan Viruses, wobei der Begriff Orphan (englisch: Waise) anzeigt, dass eine Zuordnung zu einer bestimmten Krankheit nicht möglich ist. Reoviren verursachen sowohl respiratorische, als auch enteritische Symptome. Es existieren 7 Serotypen, Vorkommen v.a. in den Wintermonaten. Verursachte Erkrankungen: Rhinitis, Pharyngitis, Diarrhöen Rotaviren sind die klinisch wichtigsten, menschlichen Reoviren und verantwortlich für Gastroenteritiden, welche gehäuft akut in den Wintermonaten beobachtet werden und mit teilweise wässrigen Durchfällen und Erbrechen einhergehen.

	Die daraus resultierende Exsikose ist eine der Hauptursachen der Säuglings- und Kindersterblichkeit in Entwicklungsländern (38). Man schätzt, dass weltweit jedes Jahr 1 - 3 Millionen Kinder an Rotavirusinfektionen sterben (20).
Picornaviren (Rhinoviren, Enteroviren, Hepatoviren)	Zur Familie der Picornaviren zählt man 6 Genera, wobei 3 davon von humanpathogener Bedeutung sind: die Rhinoviren (102 humane Serotypen), die Enteroviren (einschließlich Coxsackieviren (23 Serotypen des Typ A, 6 Serotypen des Typ B), ECHO-Viren (30 Serotypen) und das Poliovirus (Serotypen 1, 2, 3)), sowie das Hepatitis-A-Virus. Verursachte Erkrankungen: <i>Polioviren:</i> paralytische Poliomyelitis, aseptische Meningitis, Enzephalitis. Die WHO hat ein weltweites Impfprogramm aufgelegt, das zum Ziel hat, die durch das Poliovirus verursachte Poliomyelitis völlig auszurotten. Gegenwärtig gibt es noch Berichte von Erkrankungen durch dieses Virus in einigen Ländern Afrikas und des indischen Stammkontinentes (35). <i>Coxsackie A und B, ECHO-Viren:</i> Menigitiden, Peri-/Myokarditiden, Herpangina, Enzephalitis, Hand-Mund-Fuß-Exanthem, akute hämorrhagische Konjunktivitis, Pleurodynie (Myalgia epidemica, Bornholm'sche Krankheit), Pleuritis, Peritonitis, schwere ZNS-Infektionen bei Neugeborenen, Erkrankungen des Respirationstraktes („Sommergrippe“). <i>Rhinoviren:</i> häufigster Erreger des „Schnupfens“, Otitis media, Sinusitis (38) <i>Hepatitis A-Virus:</i> Milde Form der Hepatitis, in 0,1% der Fälle jedoch auch fulminante Verläufe mit akutem Leberversagen, bei Kanalarbeitern wird sie als Berufskrankheit anerkannt.

Caliciviren, Norwalkvirus, Hepatitis-E- Virus	Vor allem Norwalkviren, Norwalk-like- und Noroviren verursachen einen großen Teil der Gastroenteritiden (7), welche immer wieder v.a. in Gemeinschaftseinrichtungen und Krankenhäuser zu hohen Erkrankungsraten führen. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, aerogen (v.a. durch Erbrechen), jedoch auch über kontaminierte Lebensmittel und durch Wasser. Die Infektiosität ist sehr hoch, nur wenige Partikel reichen für eine Infektion, was große Schwierigkeiten bei der Beherrschung von nosokomialen Ausbrüchen bereitet (43). Epidemie: Michigan/USA, 1979 nach Baden in einem künstlichen See Das Hepatitis-E-Virus verursacht eine Hepatitis, die vor allem für Schwangere mit einer Mortalitätsrate von 20% eine besondere Gefährdung darstellt (3),(10). Hepatitis-E ist in Mexiko, sowie in tropischen und subtropischen Regionen Afrikas und Asiens endemisch (35), z.B. Epidemie am Hau-Fluß Vietnam, 1994
--	---

Zum Nachweis fäkaler Verunreinigungen werden so genannte Fäkalindikatoren herangezogen, wie E.coli, coliforme Keime und Bakteriophagen (55). Manche Bakteriophagen haben mit Enteroviren vergleichbare physikalische Eigenschaften und können mit geringerem Material- und Zeitaufwand bestimmt werden (20),(51),(25),(26). So werden somatische Coliphagen als Indikatoren angesehen (12) und es wurde ein Richtwert für Badewasser von <500 PFU / l vom Umweltbundesamt in Berlin vorgeschlagen (49), welcher von einer Wiener Arbeitsgruppe als praktikabel bestätigt wurde (52). Für Beckenwasser wurde ein Grenzwert von <100 PFU / l empfohlen (41).

Das Infektionsschutzgesetz der Bundesrepublik (28) hat nach § 1 Absatz 1 zum Ziel: „(...) übertragbaren Krankheiten beim Menschen vorzubeugen, Infektionen frühzeitig zu erkennen und ihre Weiterverbreitung zu verhindern.“ Und fordert nach § 41 Absatz 1: „Die Abwasserbeseitigungspflichtigen haben darauf

hinzuwirken, dass Abwasser so beseitigt wird, dass Gefahren für die menschliche Gesundheit durch Krankheitserreger nicht entstehen. (...)“.

Diese Anforderung spielt jedoch in der Praxis der Abwasserreinigung und – einleitung kaum eine Rolle, da selbst in modernen mechanisch-biologischen Kläranlagen der Gehalt an pathogenen Krankheitserregern nur ungenügend (zu 90 - 98 %) reduziert wird und hier somit ein Handlungsdefizit bezüglich des Infektionsschutzgesetzes besteht (17).

Da in vielen Gegenden Abwasser aus Kläranlagen in Oberflächengewässer geleitet werden, diese jedoch auch gleichzeitig als Freizeitgewässer genutzt werden, ist es vonnöten, effektivere Abwasserreinigungsanlagen einzusetzen, bzw. die Techniken zur Rückhaltung von Krankheitserregern auszubauen, um eventuelle Infektionsketten zu verhüten.

Über die Infektionsdosen bei enteropathogenen Viren gibt es wenig konkrete Angaben. Generell ist jedoch davon auszugehen, dass sie sehr niedrig liegen müssen, da bei enteropathogenen Viren eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Schmierinfektion typisch ist. Die bei Hepatitis A-Viren und Rotaviren angegebenen Infektionsdosen von 1 – 10 PFU dürften daher auch für die anderen enteropathogenen Viren gelten (32).

So erbrachten Untersuchungen von vier Abwasserreinigungsanlagen im Neckarraum eine Reduktion an enteralen und anderen enteropathogenen Viren von über 97 %, dennoch musste in den Kläranlagenabläufen noch mit Viruskonzentrationen von ca. 0 – 8,25 PFU / 1 l für enterale Viren, bzw. mit Konzentrationen von ca. 0 – 250 MPN / 1 l für andere enteropathogenen Viren, gerechnet werden (20).

Tabelle 2:

Viruskonzentrationen für enterale Viren in Oberflächengewässer und Abwasser, gemessen als PFU / l und MPN / l, ohne Berücksichtigung der Wiederfindungsraten (32),(20)

PFU = Plaque-Forming-Units

MPN = Most-Probable-Number

(modifiziert nach verschiedenen Autoren, Fleischer 1999)

Flüsse, Seen	Gereinigtes Abwasser	Rohabwasser	Autoren
13,3 PFU / l			Hahn et al. (1988),(24)
	89 – 188 PFU / l		Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (1991),(5)
		6,2 – 2250 PFU / l	Heijkal et al. (1981),(28)
0 – 180 PFU / l			Hughes (1992)
		150 – 10.750 PFU / l	Irving & Smith (1981),(31)
0 – 325 PFU / l			Tani et al. (1992)
	0 – 8,25 PFU / l 0 – 250 MPN / l	15 – 548 PFU / l 100 – 3600 MPN/l	Fleischer et al. (2000),(21)
0 – 89 MPN / l			Fleischer (1998a),(19)

So können z.B. anhand von quantitativen Untersuchungen des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg in einem Fluss maximale Werte von 35 PFU in 20 l (entsprechend 2 PFU / l) ermittelt werden. Höhere Werte zeigten sich beim MPN-Verfahren, mit dem vorzugsweise Adeno- und Rotaviren erfasst werden. Hier fanden sich bis zu 90 MPN / l.

Daraus geht hervor, dass in Oberflächengewässern die Viren in Mengen auftreten können, die im relevanten Bereich der Infektionsdosis liegen (32).

Ältere Abwasserreinigungsanlagen zeigten im Vergleich zu den oben genannten vier moderneren Anlagen eine um wenigstens eine Zehnerpotenz höhere Viruskonzentration, sodass anhand der ermittelten Daten ersichtlich wird, dass hier Handlungsbedarf besteht, um die mikrobielle Belastung unserer Gewässer zu vermindern (32).

Das Membranbelebungsverfahren stellt hier ein viel versprechendes Verfahren zur Verhütung von Infektionen durch Reduktion von Krankheitserregern dar, welches in dieser Arbeit anhand der Elimination von Bakteriophagen und Viren aufgezeigt werden soll.

1.2. Abwasserreinigung mittels Membranbelebungsverfahren

Der gesicherte Zugang zu Wasserversorgung und –entsorgung zählt zu einem Grundrecht jedes Menschen und daher muss es heute ein Anliegen sein, den kommenden Generationen weltweit diesen wertvollen Zugang bereitzustellen und zu sichern, wozu es aber auch neuer Lösungsansätze und Technologien bedarf. Hierzu zählt auch die Membrantechnologie, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (37).

Unter Membranbelebungsverfahren versteht man die Kombination aus einer konventionellen Belebungsanlage mit einer Membranfiltereinheit zur Abtrennung des Klärschlammes vom gereinigten Wasser.

Die Filtration ersetzt die Feststoffseparation, die in einem konventionellen Belebtschlamm-System ansonsten durch Nachklärung und eventuell einem Sandfilter erfolgt (58).

Somit wird eine sehr hohe Qualität der Abwasserreinigung erzielt, nicht nur feinste Partikel werden zurückgehalten, sondern auch pathogene Mikroorganismen, Keime und Viren. Eine Nachklärung mit Schlammrückführung entfällt. Dadurch ergeben sich Einsparungen beim Beckenvolumen gegenüber üblicher Belebungsanlagen, was die Anlagen sehr kompakt macht und sie auch bei geringem Raumangebot zu realisieren sind (58).

Die getauchten Module werden von unten her belüftet und die aufsteigenden Luftblasen erzeugen an der Membranoberfläche unzählige kleine Wirbel, welche die anhaftenden Partikel von der Membranoberfläche lösen. Bei Hohlfasermembranen werden durch die Vielzahl der Wirbel großflächige Bewegungen der Hohlfasern zueinander erzeugt, wodurch ein Querstrom innerhalb der Faserbündel induziert wird. Hierdurch wird der Energieverbrauch durch den Lufteintrag vermindert (2).

Das so aufbereitete Wasser ist vor allem an jenen Orten wichtig, an denen gereinigtes Abwasser z.B. direkt in ein Oberflächengewässer geleitet wird, das dem Menschen, z.B. zum Baden oder Tieren, beispielsweise in Form von Teichen zur Verfügung steht. Das gereinigte Abwasser erfüllt die EU-Badegewässerrichtlinie (16) problemlos (34).

Eine bessere Elimination von z.B. Medikamentenrückständen konnte nur für einige wenige pharmazeutische Stoffe nachgewiesen werden, da die Membranmodule keine gelösten Stoffe zurückhalten können (33), (15).

Membranfilter finden des Weiteren eine zunehmend größere Verbreitung im Bereich der Trinkwasseraufbereitung, auch hier steigt die Anzahl der installierten Anlagen stetig (22).

1.3. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Wasserproben einer Membranbelebungsanlage, sowie das Aufzeigen der Eliminationsleistung bezüglich somatischer und f-spezifischer (MS-2) Bakteriophagen. Obwohl die genannten Phagen mit einem Durchmesser von 0,025 µm wesentlich kleiner als die verwendete Porengröße von 0,1 µm des Membranfilters sind, ist dennoch von einer Reduktion auszugehen aufgrund adsorptiver Wechselwirkungen zwischen Phagen und den elektrostatischen Ladungsüberschüssen der Filteroberfläche (11).

Ein ähnliches Verhalten zeigen Viren, was in einer Studie in Japan bestätigt wurde, bei der bei einer Porengröße des Membranfilters von 0,1 µm eine Reduktion an Polio- und Noroviren von mehr als 4-log-Stufen erreicht wurde (44).

Um dies zu bestätigen, beinhaltete ein weiterer Versuchsansatz dieser Arbeit die Aufkonzentrierung von Viren mittels Glaswollefiltration mit anschließender Light Cycler® PCR zum Nachweis von Enteroviren im Zu- und Ablauf der Membrananlage.

Ein weiterer Grund für den hohen Rückhalt in Kombination mit einem Flockungsmittel ist die Tatsache, dass die Viren daran adsorbieren und am Membranfilter zurückgehalten werden. Somit ist der Virenrückhalt wiederum nicht direkt von der Porengröße des Membranfilters abhängig. Dies wurde ebenso in einer Studie bestätigt, hier wurden >99,9 % der infektiösen Viruspartikel, gebunden an das Flockungsmittel Aluminiumchlorid, gefunden (36).

2. Material

2.1. Wasserproben

2.1.1. Lehr- und Forschungsklärwerk der Universität Stuttgart (LFKW) in Büsnau

Das Klärwerk aus dem Jahre 1966 liegt unterhalb von Büsnau am Rande des Naturschutzgebietes „Rot- und Schwarzwildpark“ im Westen von Stuttgart. Das Klärwerk nimmt Abwasser aus Lauchenhau, dem nördlichen Vaihingen sowie aus Teilen der Universität Vaihingen-Pfaffenwald auf. Die Kapazität liegt bei 30 l/s. Die jährlich gereinigte Abwassermenge liegt bei ca. 900.000 m³, was einer Abwassermenge von ca. 10.000 Einwohnern entspricht. Bei erhöhtem Mischwasseraufkommen bei Niederschlägen wird ein Teil des Wassers nach Stuttgart abgeleitet. Das gereinigte Abwasser gelangt dann über den Bandtälesbach über Gloms, Enz und Neckar in den Rhein.

2.1.2. Versuchskläranlage (Membranbelebungsanlage) des Institutes für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft in Stuttgart-Büsnau

Bei der beprobten Kläranlage handelte es sich um eine vorübergehend aufgebaute Versuchskläranlage mit einem Gesamtvolumen von ca. 9 m³, bestehend aus einem Denitrifikationsabschnitt mit einem Volumen von ca. 3,6 m³ und einem Nitrifikationsabschnitt mit einem Volumen von ca. 5,4 m³ mit feinblasiger Belüftung. In den Nitrifikationsreaktor wurden zwei Membranmodule getaucht und grobblasig belüftet.

Mit Hilfe einer Pumpe wurde ein Unterdruck von etwa 30 - 60 kPa an die Hohlfasern der Membranmodule angelegt und das Wasser vom belebten Schlamm getrennt. Das nun gereinigte Wasser wurde teilweise in einem Permeatspeicher gesammelt, von welchem aus auch regelmäßig die Membranen rückgespült und damit gereinigt wurden.

Die grobblasige Belüftung (ca. 20 - 30 Nm³ / h Luft) sorgte für die nötige Strömungsgeschwindigkeit und verhinderte ein Verstopfen der Membranporen. Jeden Monat wurden die Membranen zusätzlich mit Natriumhypochlorid chemisch gereinigt.

Gespeist wurde die Anlage durch Abwasser des LFKW in Büsnau, welches nach dem Vorklärbecken, also nach der mechanischen Reinigung, abgezweigt wurde.

Das durchschnittlich die Anlage durchlaufende Volumen an mechanisch gereinigtem Abwasser betrug 20,1 m³ / d.

Als Fällungsmittel wurde dem Denitrifikationsabschnitt Aluminiumchlorid zugegeben. Die durchschnittliche CSB-Schlammbelastung lag bei 0,085 kg / kg TS*d, der Trockensubstanzgehalt bei 11,2 g / l, das durchschnittliche Schlammalter betrug 27 Tage.

Membranmodule:	Hersteller Zenon GmbH,
Membranbezeichnung:	ZeeWeed 230, Ultrafiltrationsmembran
	Porengröße 0,1 µm, Hohlfasermodule

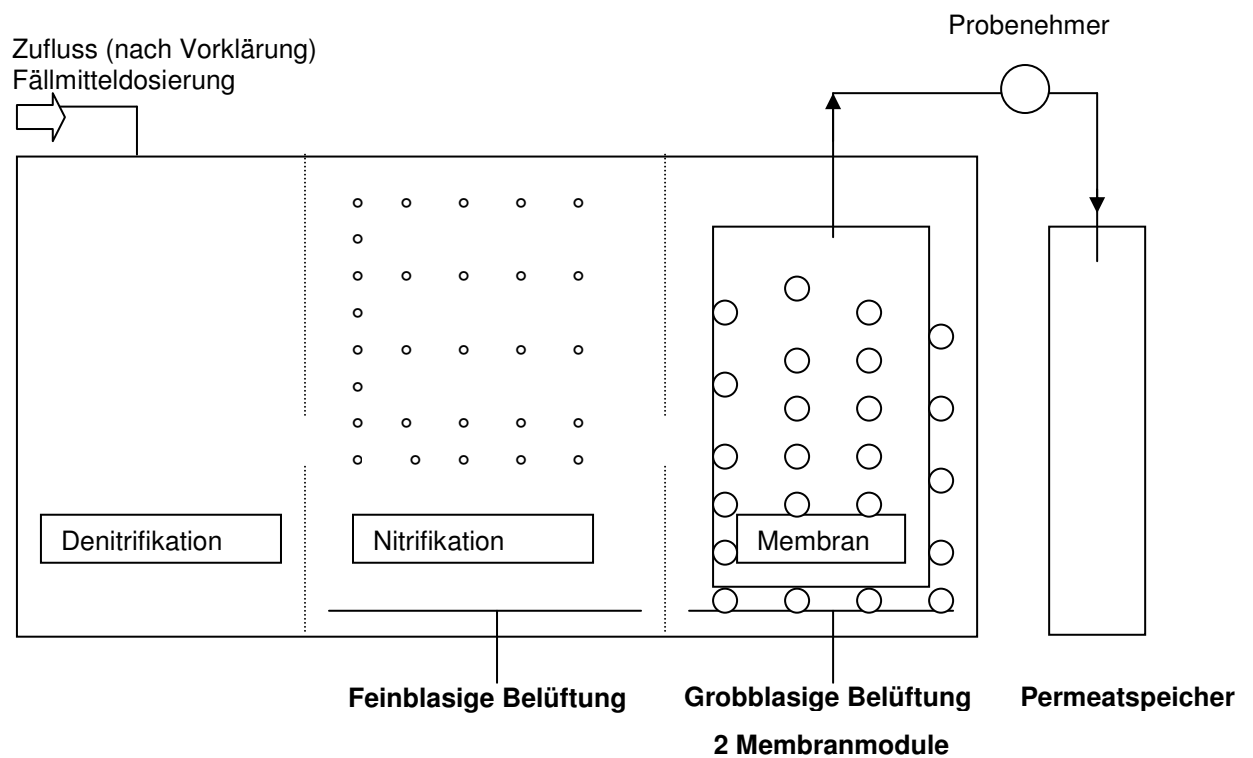
Die beiden Membranmodule hatten zusammen eine Gesamtoberfläche von 40 m², der durchschnittliche Durchlauf betrug 20,6 l / m²*h.

Bis auf die Membranmodule wurde die gesamte Anlage von der Werkstatt des Institutes für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Abteilung Abwassertechnik aufgebaut.

Abbildung 1 : Membranmodul der Firma Zenon, ZeeWeed 230



Abbildung 2 : Versuchs-Membranbelebungsanlage in Büsnau



2.1.3. Probennahme in der Kläranlage in Stuttgart-Büsnau

Mit Hilfe von Dauerprobenehmern wurden jeweils über 24 Stunden eine Mischprobe mengenproportional aus dem Zu- und Ablauf der Kläranlage entnommen. Die Zulaufproben wurden nach der Vorklärung, also nach der mechanischen Reinigung im Zulauf zur Belebung, entnommen. Die Ablaufproben wurden nach den Membranfiltern vor dem Permeatspeicher entnommen.

Die Proben wurden im Zulauf in einem 5 l Kanister (autoklaviert), im Ablauf in einem 10 l Kanister (ebenfalls zuvor autoklaviert) gesammelt und schon während der Probeentnahme bis zur Abholung bei 4 °C gekühlt und jeweils abends in Kühlboxen mit Kühlaggregaten nach Tübingen transportiert und am folgenden Morgen weiterverarbeitet.

2.2. Allgemein verwendete Lösungen

AMPUWA	Fresenius AG
Ethanol 99 %	Uniapotheker
HCl (konz.) 32 %	Merck
HCl 1 M	Merck
NaOH 1 M	Merck
NaOH 10 M	Merck
Phys. NaCl 0,9 %	Merck
Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)	

2.3. Geräte und sonstige Laborausstattung

Tabelle 3: Geräte

Autoklav		KSG Sterilisatoren GmbH, Olding
Brutschrank 37 °C	Typ B 6420	Heraeus Instruments, Hanau
Dampftopf		Fritz Gössner
Druckbehälter	5 l, 10 l	Sartorius
Eismaschine	Scotsman AF-1D	Scotsman
Eisschrank – 20 °C und -90 °C		Liebherr
High-Speed-Zentrifuge	Rotor JA 20, J2-HS	Beckman
Koloniezählgerät		Boskamp Placont
Kühlschrank 4 °C	Super 707	Kirsch
Laborzentrifuge	3K10	Sigma
LightCycler TM Instrument		Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer	IKAMAG RH	IKA-Labortechnik
pH-Meter	Ph 537	WTW
Photometer	Ultrospec III	LKB Biochrom, Pharmacia, England
Pipettierhilfe	„Pipetboy“	Tecnomara
Probenehmer	PBT	Bühler
Säulen und Schläuche für Glaswollefiltration	40 cm x Ø 4 cm mit Schraubkappen aus PVC an beiden Enden	Eigenbau Dr. Jens Fleischer
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR VX8	Janke und Kunkel
Sterilbank	LaminAir® HBB 2472	Heraeus, Hanau
Sterilbank	HLB 2448	Heraeus, Hanau

Ultrazentrifuge	Rotor SW 28, L-60	Beckman
Vortex	Genie 2 TM	Bender-Hobein
Waage	Feinwaage bis 300 g, Chyo MP-300	Asa mbH
Waage	Feinwaage bis 160 g, Typ 822	Kern
Wasserbad	Typ 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	IG 150	Jouan

Sonstige Laborausstattung

- Babyflaschen 200 ml (Schott)
- Bunsenbrenner
- Drigalski-Spatel
- Einmalhandschuhe (Kimberly-Clark)
- Einmalimpfösen (Sarstedt)
- Einwegröhrchen 15 ml, 50 ml (Falcon)
- Filtereinheit Minisart 0,8 µm (Sartorius)
- Filtereinheiten Millex-GV 0,22 µm, Millex-GS 0,45 µm (Millipore)
- Glasflaschen mit Deckel 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml
- Glaskapillaren für PCR (Biozym)
- Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml
- Glasspatel
- Glaswolle, oiled sodocalcic glass-wool Rantigny 725 (R725), Saint Gobain, Isovere-Orgel, BP 19-F-60290 RANTIGNY, France
- Injectomat® Spritze 50ml mit Kanüle (Fresenius)
- Kanülen, steril, Sterican® 0,90 x 70 mm (B. Braun AG)
- Kühlblöcke
- Messzylinder 100 ml, 1000 ml (Nalgene)
- Parafilm M
- Petrischalen steril
- Pipetten 200-1000 µl, 100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl (Eppendorf)

- Pipettenspitzen steril (teilweise gestopft) 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Reagenzglasständer, sowie diverse Ständer für Eppendorf-Cups, etc.
- Rührfische, verschiedene Größen
- Serolab 2 ml (Serolab)
- Spritzen (Einweg), 5 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml (Plastipak®, Becton-Dickinson)
- Thermoblöcke
- Transportgefäße Plastik 1000 ml, 750 ml (Beckman) mit Deckel
- versch. Glaswaren (Reagenzgläser, Bechergläser, Eppendorfgefäße verschiedene Größen,...)
- Wasserstrahlpumpe mit Vakuumschlauch
- Zentrifugenbecher 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Beckman)

2.4. Software

Betriebssystem:

- Windows XP Home Edition

Textverarbeitung:

- Microsoft® Word 2002

Tabellenkalkulation:

- Microsoft® Excel 2002

2.5. Wirtsstämme für Phagenassays

- Salmonella typhimurium **WG 49**

Prof. Arie
Havelaar, Holland

- Escherichia coli **ATCC 13706**

American Type
Culture Collection

2.6. Virenstamm als Standard für die LightCycler™ PCR

Poliopool I-III (Sabin)

Behringwerke

2.7. Lösungen für den Nachweis f-spezifischer Coliphagen

2.7.1. TYGA-Agar

Trypticase Pepton	10 g	Difco
Hefeextrakt	1 g	Difco
NaCl	8 g	Merck
Bacto-Agar	16 g	Difco

- in 1000 ml VE-Wasser im Dampftopf lösen
- pH auf $7,2 \pm 0,1$ einstellen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren
- Platten in sterile Petrischalen gießen
- Lagerung der Platten im Kühlschrank bei 4 °C für 6 Monate möglich

Die Gesamtanzahl der gegossenen Agar-Platten belief sich auf ca. 1000 Stück.

2.7.2. ssTYGA-Agar

Trypticase Pepton	10 g	Difco
Hefeextrakt	1 g	Difco
NaCl	8 g	Merck
Bacto-Agar	8 g	Difco

- in 1000 ml VE-Wasser im Dampftopf lösen
- pH auf $7,2 \pm 0,1$ einstellen
- dann je 3 ml in ein steriles Reagenzglasröhrchen abfüllen und mit einem Zellstoffstopfen verschließen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren
- Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C für 6 Monate möglich

Die Gesamtanzahl der befüllten Agar-Röhrchen belief sich auf ca. 1000 Stück.

2.7.3. TYGB-Bouillon

Trypticase Pepton	10 g	Difco
Hefeextrakt	1 g	Difco
NaCl	8 g	Merck

- in 1000 ml VE-Wasser im Dampftopf lösen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren
- Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C

2.7.4. Calciumglukoselösung

Calciumchlorid-Dihydrat	3 g	Merck
Glucose	10 g	Merck

- unter geringer Wärmezufuhr in 100 ml VE-Wasser lösen
- mit Minisart 0,22 µm Filtereinheit sterilfiltrieren

2.8. Lösungen für den Nachweis somatischer Coliphagen

2.8.1. Müller-Hinton-Bouillon

Fertigmischung	21 g	Difco
----------------	------	-------

- in 1000 ml VE-Wasser lösen
- pH auf $7,4 \pm 0,1$ einstellen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren
- Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C für 6 Monate möglich

Zusammensetzung der Fertigmischung:

Fleischextrakt	2 g
Caseinhydrolysat	17,5 g
lösliche Stärke	1,5 g

2.8.2. PAC-Agar

Fleischextrakt	28 g	Sigma
Hefeextrakt	8 g	Difco
Magnesiumchlorid-hexahydrat	2 g	Merck
di-Natriumcarbonat	2 g	Merck
Bacto-Pepton	24 g	Difco
Bacto-Agar	24 g	Difco
Natriumchlorid	8 g	Merck

- in 2000 ml VE-Wasser lösen
- pH auf $7,2 \pm 0,1$ einstellen
- vollständige Lösung im Dampftopf
- in Babyflaschen (Schott) portionieren, jeweils 50 ml
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren
- Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C für 6 Monate möglich

Die Gesamtanzahl der vorbereiteten PAC-Agar-Flaschen belief sich auf ca. 100 Stück.

2.8.3. Calciumchloridlösung

CaCl ₂ x 2H ₂ O	13 g	Merck
---------------------------------------	------	-------

- in 100 ml VE-Wasser lösen
- 15 Min bei 121 °C autoklavieren

2.9. Lösungen für den Nachweis von enteropathogenen Viren

2.9.1. Elutionspuffer für Glaswollfiltration

Magermilchpulver (skimed milk)	1 g	Oxoid
Glycin	3,75 g	Roth

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

2.9.2. RNA-Isolierungskit

High Pure Viral Nucleic Acid Kit

Roche

- zur Isolierung von viralen Nucleinsäuren für die PCR oder RT-PCR

Packungsinhalt:

Bindepuffer: 25 ml Bindepuffer [6 M Guanidinium – HCl, 10 mM Tris – HCl , 20 % Triton ¹ X-100 (v/v), pH 4,4 (25 °C)]

Poly (A), lyophilizate: 2 mg poly(A) carrier RNA

Proteinase K, lyophilizate: 90 mg lyophilisierte Proteinase K

Inhibitor Removal buffer: 33 ml Puffer [5 M Guanidinium-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C) Endkonzentration nach der Zugabe von Ethanol]

Wash buffer: 2 x 10 ml Waschpuffer [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C) Endkonzentration nach der Zugabe von Ethanol]

Elution buffer: 30 ml nukleasefreies doppelt destilliertes Wasser

High Pure filter tubes: Polypropylenröhrchen mit doppelagigem Glasvlies-Filtrationseinsatz; maximale Aufnahmekapazität: 700 µl Probevolumen; 2 Beutel mit je 50 Stück

Collection tubes: 6 Beutel mit 50 Polypropylengefäßen (2 ml)

2.9.3. Primer/Sonden-Mix für den Nachweis enteroviraler RNA mittels Light CyclTMer PCR

ENTEROrealDETECT

zum Nachweis enteroviraler RNA

Product Code Entero50

mediagnost

(Reutlingen)

Für den Nachweis folgender Viren:

Polioimpfviren Sabin 1-3, *Coxsackie* A9, A7, B1, *Echoviren* 4, 15, 20 und 29

ENTEROrealDETECT ist ein Primer/Sonden-Mix für den Nachweis von enteroviraler RNA mittels one-step real-time RT-PCR. Kombiniert mit kommerziell erhältlichen Kits lässt sich enterovirale RNA durch RT-PCR hochspezifisch und sensitiv nachweisen (42).

3. Methoden

3.1. Nachweis von f-spezifischen Coliphagen im Abwasser (nach Havelaar und Hogeboom (27))

3.1.1. Vorbereitungen zum Nachweis der f-spezifischen Phagen

Es wurden Arbeitskulturen des Wirtsstamms *Salmonella typhimurium* WG 49 (80 % Laktose pos, Nalidixin und Kanamycin resistent), die in Serolabs bei -90 °C eingefroren waren, benutzt.

Zuerst mussten die idealen Anzuchtzeiten in Form einer Wachstumskurve der Arbeitskultur mittels photometrischen Messungen ermittelt werden, welche dann als Eichkurve für die weiteren Messungen verwandt wurde.

Die notwendige Menge an ssTYGA-Agar wurde vor Versuchsbeginn im Dampftopf gelöst und danach im Wasserbad bei 48 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die vorbereiteten TYGA-Agar-Platten wurden im Brutschrank vorgewärmt, wobei pro Wasserprobe ca. 50 - 60 Platten und noch einmal die gleiche Menge an ssTYGA-Röhrchen, wegen der erforderlichen Verdünnungen der Zu- und Abläufe, nötig waren.

Im Zulauf wurde das Abwasser in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

konzentrierte Probe, 10^{-1} und 10^{-2} .

Im Ablauf in folgenden Konzentrationen:

konzentrierte Probe, 10^{-1} .

Zusätzlich wurden pro Probe noch jeweils ca. 5 Positivkontrollen (MS-2 Phagen) und Negativkontrollen (NaCl) eingesetzt. Pro Verdünnung wurden jeweils 10 Ansätze angefertigt.

3.1.2. Herstellung der Inokulumkultur und Ansatz der Phagenassays

Zuerst wurden 50 ml TYGB auf 37 °C vorgewärmt, dann wurde davon 1 ml in eine Kuvette pipettiert und später als Leerwert zur photometrischen Messung verwendet. Danach brachte man 1 ml Arbeitskultur (frisch aufgetaut) in die TYGB und das Ganze wurde dann ca. 3,5 - 4h auf dem Schüttler vermehrt. Nach abgelaufener Zeit wurde die Extinktion gegen den TYGB-Leerwert bei 620 nm gemessen, mit der Eichkurve verglichen und falls nötig bis zu einer Konzentration von ca. 10^8 / ml weiterbebrütet.

Nach erreichter Konzentration musste die Inokulumkultur sofort auf Eis gestellt werden, um rasch abzukühlen, da es sonst zum Verlust der F-Pili gekommen wäre, was sich negativ auf die Wiederfindungsrate ausgewirkt hätte.

In der Zwischenzeit wurden die Verdünnungsreihen der Proben erstellt und sämtliche Proben mit 0,45 µm Millex-GV Filtereinheiten (mit beef Extrakt abgesättigt) filtriert.

Danach wurden den ssTYGA Röhrchen jeweils folgendes zugesetzt:

35 µl CaGlc-Lösung, 1 ml verdünnte Probe und 1 ml kalte Inokulumkultur WG 49.

Nach kurzem Vortexen wurde das Gemisch im Wasserbad bei ca. 48 °C ca. 3 - 5 Min inkubiert und danach der Inhalt der Röhrchen auf jeweils eine TYGA-Agar-Platte gegossen. Nach erschütterungsfreiem Erstarren entstanden so Double-layer-Agar-Platten, die dann für 18 - 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag konnten die Plaques ausgezählt werden.

3.2. Nachweis von somatischen Coliphagen

Für den Nachweis der somatischen Coliphagen wurde ein Direkt Plaque Assay (DPA) nach GRABOW & COUBROUGH, (23) verwendet. Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung und gute Reproduzierbarkeit.

Im Zulauf wurde das Abwasser in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} .

Im Ablauf in folgenden Konzentrationen:

konzentrierte Probe und 10^{-1} .

Zusätzlich wurden pro Proben noch jeweils ca. 5 Positivkontrollen (Φ X174) und Negativkontrollen (NaCl) eingesetzt. Pro Verdünnung wurden jeweils eine Portion PAC-Agar zu 50 ml benötigt.

3.2.1. Vorbereitungen zum Nachweis der somatischen Coliphagen

Zuerst benötigte man eine Übernachtsinokulumkultur des Escherichia coli ATCC 13706 Wirtsstammes. Diese wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml Müller-Hinton-Bouillon und einer starken Impföse des oben genannten Wirtsstammes angesetzt und bei 37 °C für mindestens 16 h bebrütet.

Dann wurde der PAC-Agar (abgefüllt zu je 50 ml in Babyflaschen) in der gewünschten Menge, meist ca. 5 - 6 Portionen, im Dampftopf erhitzt, verflüssigt und danach im Wasserbad auf ca. 48 °C abgekühlt.

Die Kläranlagenproben wurden wie oben genannt verdünnt und anschließend mit 0,45 µm Millex-GV Filtereinheiten (mit beef Extrakt gesättigt) steril filtriert. Die so verarbeiteten Proben wurden anschließend in einer Menge von 50 ml auch ins Wasserbad zum PAC-Agar gestellt und erwärmt.

3.2.2. Ansatz zum Nachweis der somatischen Coliphagen

Anschließend wurden nun zu den 50 ml Proben jeweils noch 500 µl CaCl₂ und 2,5 ml Inokulumkultur gegeben, vermischt und weitere 5 Min im Wasserbad inkubiert. Diese Zeit benötigen die Phagen zur Adsorption an E.coli.

Nach dieser Zeit wurde nun jeweils 50 ml PAC-Agar zugegeben, vermischt und wiederum 5 Min im Wasserbad inkubiert. Diese Mischung wurde auf möglichst 10 sterile Petrischalen verteilt. Da die Petrischalen per Hand befüllt wurden, variierte die Anzahl der gewonnenen bestückten Schalen zwischen 7 und 10. Die erhaltenen Platten mussten jetzt erschütterungsfrei erstarren, um danach für 18 – 24 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert zu werden. Am nächsten Tag ließen sich dann die Plaques auszählen.

3.3. Aufkonzentrierung enterischer Viren mittels Glaswollefiltration

In Anlehnung an die Methodik von VILAGINÈS et al., (50) und WYN-JONES et al. (56) wurde eine Absorptions-Elutionsmethode für die Filtration des Abwassers benutzt.

Dazu wurden Perspex-Säulen mit einem Innendurchmesser von 40 mm verwendet, die in Eigenarbeit von Herrn Dr. Fleischer (20) hergestellt wurden.

Die Menge des eingesetzten Abwassers belief sich im Zulauf auf 5 l, im Ablauf auf 10 l.

3.3.1. Vorbereitungen und Durchführung der Glaswollefiltration

Die Säulen wurden mit je ca. 10 g Glaswolle gestopft, mit Schraubkappen an beiden Enden versehen und in ein Stativ eingespannt.

Danach musste die Glaswolle konditioniert werden, was folgendermaßen geschah: 40 ml 1 N HCL, danach ein Spüldurchlauf mit 100 ml VE-Wasser, dann folgte ein Durchlauf mit 40 ml 1 N NaOH und erneut ein Spüldurchlauf mit 100 ml VE-Wasser. Die Säulen durften nun nicht mehr trocken fallen.

Abbildung 3 : Versuchsaufbau zur Glaswollefiltration

(mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Fleischer, LGA Stuttgart)



Zur gleichen Zeit wurden die Wasserproben vorbereitet, dazu wurden die Zu- und Ablaufproben in große Glasgefäße gefüllt, mit einem Rührfisch versehen und auf einen Magnetrührer bei ca. 20 °C gestellt.

Dann wurde den Proben 1 ml / l 1 M AlCl_3 -Lösung zugegeben. Es zeigte sich nach kurzer Zeit eine Trübung durch das ausgefallene $\text{Al}(\text{OH})_3$. Nun wurde den Proben unter ständigem Rühren tropfenweise HCl konz. zugegeben und auf einen pH von $3,5 \pm 0,1$ eingestellt.

Die Trübung verschwand wieder nach Erreichen des oben genannten pH-Wertes. Durch diese Fällungsprozedur wurden die Viren an Aluminiumhydroxid gebunden. Nach insg. 30 Min Rühren wurden die Proben dann in Sartorius-Drucktöpfe gegossen und mit den vorbereiteten Säulen durch Schläuche verbunden.

Der Druck wurde über einen Druckluftanschluß über Druckluftschläuche mit Schnellkupplungen aufgebaut und auf ca. 1,5 – 2 bar eingestellt.

Die Geschwindigkeit der Filtration war so zu wählen, dass ein ca. bleistiftdicker Strahl (ca. 10 – 50 l / h) in der Säule ankam. Der Ablauf der Säulen wurde in den Abguss geleitet.

3.3.2. Eluieren der Viren aus den Säulen

Zuerst musste der Elutionspuffer jedes Mal frisch hergestellt und abgekühlt werden. Es wurden dann 400 ml des Elutionspuffers nach und nach auf die Säulen gegeben und teilweise mit etwas Druckluft nachgeholfen. Das Eluat wurde schließlich in sterilen Beckmann Zentrifugenbecher gesammelt und musste auf einen pH von $4,5 \pm 0,1$ mittels 1 N HCl eingestellt werden. Nach etwas Schütteln zeigte sich eine Flockenbildung.

Danach stellte man die Eluate bei 4 °C für ca. 1h im Kühlschrank kalt und ließ die Flocken absetzen. Das nun ausgefallene Casein band wiederum Viren und erlaubte eine weitere Volumenreduzierung.

Die Eluate wurden bei 4200 x g für 15 Min zentrifugiert und der Überstand danach abgekippt. Dem nun erhaltenen Pellet gab man 10 ml 0,15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -Puffer mit einem pH von $7,4 \pm 0,1$ zu.

Die Zentrifugenbecher wurden in den Kühlschrank gestellt und über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Am folgenden Tag wurden die resuspendierten Pellets unter der Sterilbank teilweise mit 0,45 µm Millex-GV Filtereinheiten (mit beef Extrakt gesättigt) steril filtriert und in Serolabs bei -20 °C gelagert.

3.4. Isolierung der Virus-RNA mittels High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)

3.4.1. Vorbereitung des Kits

Herstellung der Arbeitslösungen:

Proteinase K: das Proteinase K Gefäß in 5 ml Elutionspuffer aufnehmen, aliquotiert bei 15 bis -25 °C lagern, 12 Monate stabil

Poly(A)carrier RNA: Poly(A)carrier-RNA-Gefäß in 0,5 ml Elutionspuffer lösen, aliquotiert zu je 75 µl bei -15 bis -25 °C lagern

Inhibitor Removal Puffer: Inhibitor Removal Puffer vor Gebrauch mit je 20 ml absolutem Ethanol versetzen

Waschpuffer: Waschpuffer vor Gebrauch mit je 40 ml absolutem Ethanol versetzen

Arbeitslösung: für je 10 Proben wird eine Portion poly(A) carrier RNA aufgetaut und mit 3,5 ml Bindepuffer versetzt

Die Analyse viraler Nukleinsäuren mittels LightCycler™ PCR setzt eine vorherige Isolierung voraus. Hierzu wurde das oben genannte Kit der Firma Roche verwendet. Das Standardprotokoll wurde jedoch modifiziert, da das Kit zur Isolierung viraler Nukleinsäuren aus Serum, Plasma oder Vollblut ausgelegt ist, im untersuchten Abwasser jedoch keine Proteinase K zur Lyse der Zellen benötigt wurde.

3.4.2. Durchführung der RNA-Isolierung mittels modifiziertem Standardprotokoll des High Pure Nucleic Acid Kit (Roche)

Jeweils 750 µl der oben hergestellten Arbeitslösung wurden in 2 ml tubes vorpipettiert, danach wurde je tube 600 µl Probe zugegeben, kurz gevortext und in einem Wärmeblock 10 Min bei 50 °C inkubiert. Danach wurde jedem tube 300 µl 100% Isopropanol zugegeben, wieder gevortext und 3 Min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die nun lysierten Proben wurden danach auf High Pure filter tubes, welche auf collection tubes aufgesetzt waren, gegeben, das Ganze 1 Min bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Nach Zugabe von 500 µl Inhibitor Removal Puffer erfolgte ein weiterer Zentrifugenlauf für 1 Min bei 8000 x g. Nun folgten 2 Waschdurchläufe mit der Zugabe von jeweils 450 µl Waschpuffer und anschließend zweimaligem Zentrifugieren für 1 Min bei 8000 x g. Die Durchläufe wurden jeweils verworfen und das filter-tube in ein neues Auffanggefäß eingesetzt. Eine letzte Zentrifugation erfolgte für 10 s bei 13 000 x g, das Auffanggefäß wurde hier durch ein Eppendorf-Cup ersetzt.

Nun wurden jeweils 100 µl Elutionspuffer (zuvor auf 60 °C erwärmt) zugegeben und erneut 1 Min bei 8000 x g zentrifugiert. Die gewonnenen RNA-Proben wurden bis zur Durchführung der LightCyclerTM PCR bei 4 °C gekühlt.

Die Isolierung der viralen Nukleinsäuren wurde mit sämtlichen gezogenen Zu- und Ablaufproben durchgeführt. Zusätzlich wurde eine RNA-Isolierung des Impfpoliostammes (Polio I-III (Sabin), Behringwerke) durchgeführt, welcher als Standard in die LightCyclerTM PCR eingesetzt wurde. Die Konzentration des Poliostammes betrug 10^6 / µl. Er wurde noch in folgenden weiteren Verdünnungen eingesetzt: 1:10, 1:50, 1:250, 1:1000.

3.4.3. Lithiumchloridbehandlung

Ein Teil der Proben wurde im Verlauf der PCR-Untersuchungen nach Durchlaufen des oben beschriebenen modifizierten Protokolls noch weiter nach folgendem Schema behandelt:

Pro tube wurden 25 µl 12 M LiCl zugegeben und bei 16 000 x g bei 4 °C zentrifugiert, danach wurde der Überstand verworfen (mit Wasserstrahlpumpe abgesogen) und mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation für 5 Min bei 16 000 x g wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet auf einem Wärmeblock bei 50 °C für 15 - 20 Min getrocknet. Nun wurde das Pellet in 10 µl Elutionspuffer resuspendiert, eine weitere Minute bei 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand auf Eis gestellt.

3.4.4. Vorbereitungen und Durchführung der LightCycler™ PCR

Das Kit ENTEROreal DETECT wurde bei 4° C im Dunkeln gelagert. Zum Rekonstruieren benötigte man 100 µl H₂O_{PCRgrade}, welches auch im Set enthalten war. Nach dem Lösen wurde kurz gevortext und danach abzentrifugiert.

Der aufgelöste Mix ist eine Woche bei 4° C haltbar, bei -20° C lichtgeschützt gelagert min. 6 Monate.

Die isolierte RNA wurde nun zusammen mit dem ENTEROrealDETECT-Kit nach folgendem Schema unter sterilen Bedingungen in die gekühlten Glaskapillaren des LightCyclers™ pipettiert:

	Volumen [µl]
H₂O (PCR grade)	5,4
LC-RT-PCR Mix	2,0
ENTEROrealDETECT	1,0
MgCl₂ 25 mM	0,4
RT-PCR Enzym-Mix	0,2
RNA	1,0
Volumen gesamt [µl]	10

Danach wurden die Glaskapillaren mit einem Deckel verschlossen, der Probenaufnahmebehälter des LightCyclers™ damit bestückt und das Amplifikationsprogramm gestartet.

Tabelle 4: Temperaturprofil der Light Cyclers™ PCR

1 Zyklus	30 Min	55 °C	Transkription
1 Zyklus	2 Min	95 °C	Denaturierung
45 Zyklen	1 s	95 °C	Denaturierung, Annealing und Elongation
	15 s	60 °C	
	13 s	72 °C	
1 Zyklus	50 s	40 °C	Elongation und Ende

Als Standard wurde der Impfvirenstamm Poliopool I-III (Sabin) in einer Konzentrationen von 10⁶ und in folgenden weiteren Verdünnungen eingesetzt: 1:10, 1:50 und 1:250.

4. Ergebnisse

4.1. Zu- und Ablaufkonzentrationen für somatische Bakteriophagen

Für die Konzentrationsberechnungen der somatischen Bakteriophagen wurden insgesamt 10 Zulaufproben und 10 Ablaufproben untersucht. Alle untersuchten Proben waren im Kläranlagenzulauf positiv. Im Kläranlagenablauf dagegen waren 8 von 10 untersuchten Proben negativ, d.h. es fanden sich keine Plaques somatischer Bakteriophagen.

Die Minimal- und Maximalwerte lagen im Zulauf zwischen **$3,45 \times 10^2$ und $6,13 \times 10^3$ Plaques / ml.**

Im Ablauf wurden Werte zwischen **0 und $1,0 \times 10^{-1}$ Plaques/ml** gefunden.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 und 5 graphisch dargestellt und in Tabelle 5 finden sich die dazu gehörigen Zahlenwerte. Eine genaue Auflistung der gezählten Plaques findet sich im Anhang in Tabelle 7.

Abbildung 4:

Übersicht der Zulaufkonzentrationen für somatische Bakteriophagen

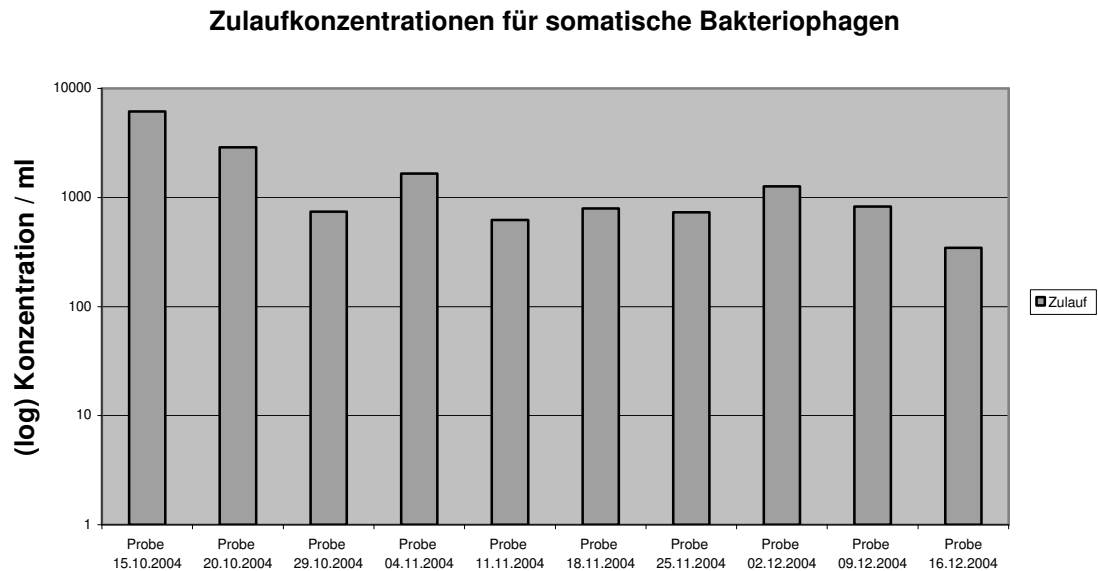


Abbildung 5:

Übersicht der Ablaufkonzentrationen für somatische Bakteriophagen

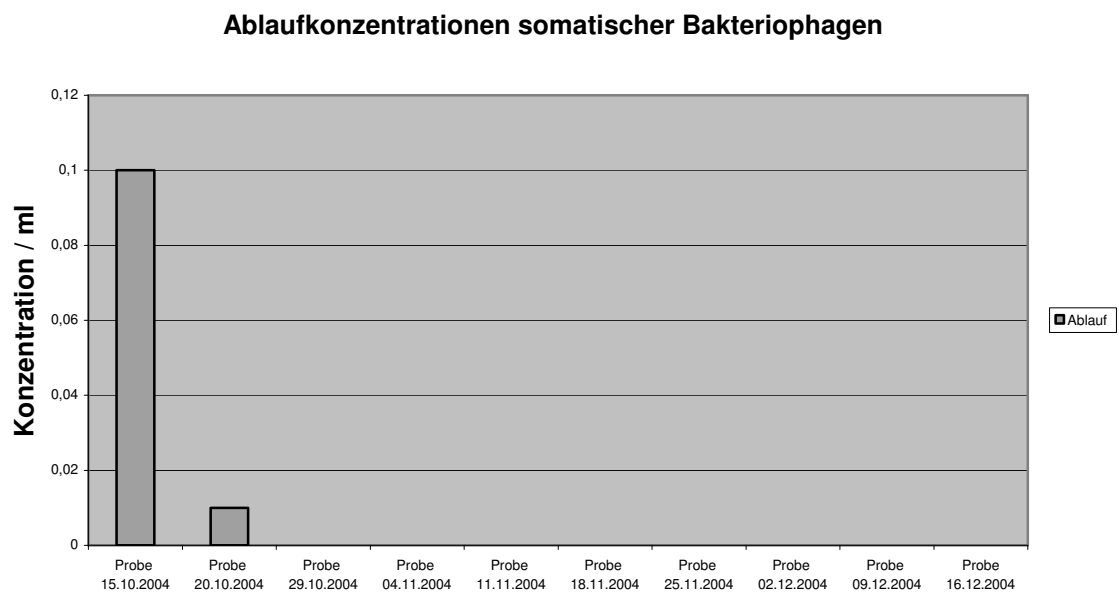


Tabelle 5:

Ergebnisse Zu- und Ablauf für somatische Bakteriophagen

MW / ml = Mittelwert Bakteriophagen im Zu- und Ablauf / ml

	MW / ml Zulauf	MW / ml Ablauf
Probe 15.10.2004	6130	0,1
Probe 20.10.2004	2880	0,01
Probe 29.10.2004	740	0
Probe 04.11.2004	1662	0
Probe 11.11.2004	620	0
Probe 18.11.2004	791,33	0
Probe 25.11.2004	730,67	0
Probe 02.12.2004	1262	0
Probe 09.12.2004	827,33	0
Probe 16.12.2004	345,33	0

4.2. Zu- und Ablaufkonzentrationen für f-spezifische Bakteriophagen

Für die Konzentrationsberechnungen der f-spezifischen Bakteriophagen wurden insgesamt 10 Zulaufproben und 10 Ablaufproben untersucht. Alle untersuchten Proben waren im Kläranlagenzulauf positiv.

Im Kläranlagenablauf dagegen waren 8 von 10 untersuchten Proben negativ, d.h. es fanden sich keine Plaques von f-spezifischen Bakteriophagen.

Die Minimal- und Maximalwerte lagen im Zulauf zwischen **$3,91 \times 10^1$ und $8,02 \times 10^2$ Plaques / ml.**

Im Ablauf wurden Werte zwischen **0 und $5,0 \times 10^{-1}$ Plaques / ml** gefunden.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6 und 7 graphisch dargestellt und in Tabelle 6 finden sich die dazu gehörigen Zahlenwerte. Eine genaue Auflistung der gezählten Plaques findet sich im Anhang in Tabelle 8.

Tabelle 6:

Ergebnisse Zu- und Ablauf für f-spezifische Bakteriophagen

MW / ml = Mittelwert Bakteriophagen im Zu- und Ablauf / ml

	MW / ml Zulauf	MW / ml Ablauf
Probe 15.10.2004	83,90	0
Probe 20.10.2004	42,50	0,2
Probe 29.10.2004	39,10	0
Probe 04.11.2004	802,20	0
Probe 11.11.2004	287,33	0
Probe 18.11.2004	495,80	0
Probe 25.11.2004	313,53	0,5
Probe 02.12.2004	262,93	0
Probe 09.12.2004	601,00	0
Probe 16.12.2004	545,67	0

Abbildung 6:

Übersicht der Zulaufkonzentrationen für f-spezifische Bakteriophagen

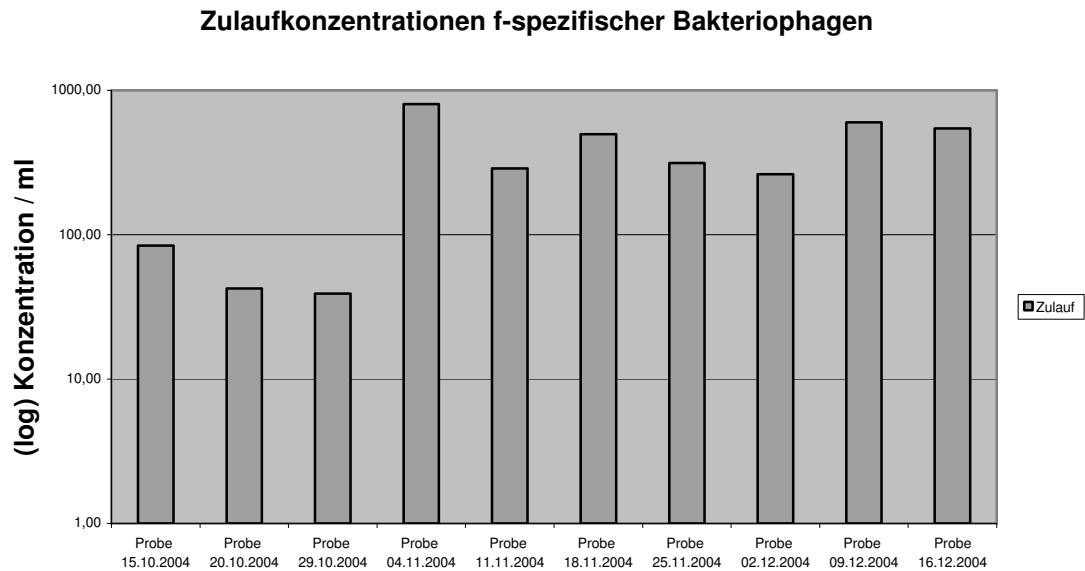
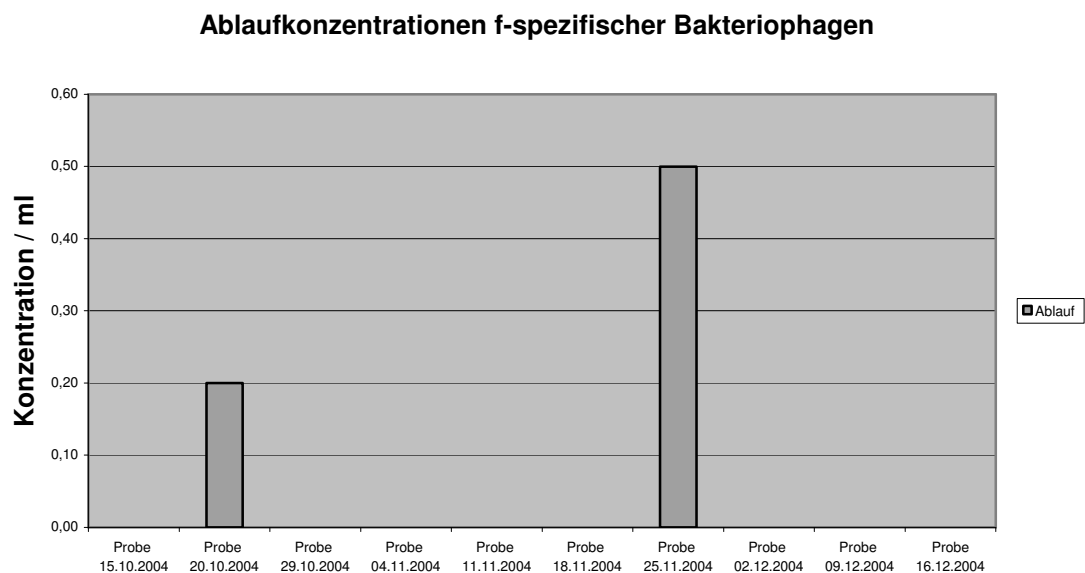


Abbildung 7:

Übersicht der Ablaufkonzentrationen für f-spezifische Bakteriophagen



4.3. Eliminationsleistung der Membranbelebungsanlage für somatische und f-spezifische Bakteriophagen

Die Eliminationsleistung bezüglich somatischer und f-spezifischer Bakteriophagen betrug nahezu 100 % (über 99,99 %).

Für die somatischen Phagen bedeutet dies bei Zulaufkonzentrationen von bis zu $6,13 \times 10^3$ Bakteriophagen / ml eine Reduktion um 3,6 log-Stufen.

Für die f-spezifischen Phagen konnte bei Zulaufkonzentrationen von bis zu $8,02 \times 10^2$ Bakteriophagen / ml eine Reduktion um 2,8 log-Stufen nachgewiesen werden.

4.4. Ergebnisse der Light CyclorTM PCR

Leider erbrachten die Untersuchungen mittels Light CyclorTM PCR keine brauchbaren Ergebnisse. Es wurden weder im Zu- noch im Ablauf signifikante Konzentrationen an Viren gefunden. Einzig der Impfpoliostamm, der als Standard eingesetzt wurde, erbrachte Ergebnisse.

Weitere Läufe zur Ursachenfindung wurden gestartet. So wurde unter anderem der Standard statt mit PCR H₂O mit Kläranlagenabwasser verdünnt, um eventuelle Störfaktoren durch im Klärabwasser enthaltene Stoffe ausfindig zu machen, leider jedoch ohne einen signifikanten Unterschied. Auch die weitere Behandlung mit Lithiumchlorid nach der Isolierung der RNA erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse. Nach diversen Versuchen, auch z.B. das eingesetzte Probevolumen zu erhöhen, welche jedoch auch nicht zum Erfolg führten, waren die aufbereiteten Proben verbraucht und die Versuche mussten erfolglos abgebrochen werden. Auch die vorherige Sterilfiltration mit 0,45 µm Minisart Filtern erbrachte keine Unterschied.

5. Diskussion

5.1. Belastung der Oberflächengewässer durch Kläranlagenabwasser

Die Bevölkerungszahlen und die Bevölkerungsdichte vor allem in Städten und Ballungsgebieten der Erde steigt unaufhörlich, was zu einem vermehrten Aus- und Neubau von Kläranlagen führt. Trotz der guten Eliminationsleistungen und dem hohen technischen Standard summieren sich jedoch auch bei uns in Deutschland die in die Vorfluter eingeleiteten pathogenen Keime, so dass aus jedem Vorfluter, der zur Trinkwasserherstellung genutzt wird, Viren und Fäkalkeime isoliert werden konnten (18). Somit wird deutlich, dass in diesem Bereich Handlungsbedarf besteht, um die wertvolle Ressource Wasser zu schützen. Dabei darf nicht vergessen werden, dass das Abwasserproblem vor allem in vielen anderen Teilen der Erde ein erhebliches Problem darstellt. Hierzu ist es vor allem wichtig, Technologien zu entwickeln, die auch mit wenig finanziellem Aufwand und trotzdem guter Effektivität zu realisieren sind.

5.2. Viruskonzentrationen mittels Light CyclerTM PCR

Da die Untersuchungen des Abwassers bezüglich der Konzentration von Viren leider keine Ergebnisse lieferten und unter Berücksichtigung der oben genannten weiterführenden Versuche, muss davon ausgegangen werden, dass in den gesammelten Proben keine ausreichende Konzentration an Enteroviren vorhanden war. Die auch zu den Enteroviren zählenden Polioviren werden z.B. seit Umstellung der Impfstrategie von Lebend- auf Totimpfstoff zur Bekämpfung der Poliomyelitis auch nicht mehr in hohen Konzentration im Abwasser angetroffen. In anderen Untersuchungen, wie z.B. anhand von Abwasser aus der Kläranlage Schramberg-Waldmössingen (Membranbelebungsverfahren) zeigten sich auch sehr geringe Raten an enteroviruspositiven Proben, jedoch viel häufiger unter anderem Adenoviren (4). Untersuchungen am

Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg zeigten, dass es beim Auftreten von Enteroviren im Abwasser zu jahreszeitlichen Schwankungen kommt, jedoch Adenoviren sehr viel häufiger und konstanter nachzuweisen waren. Untersuchungen von Oberflächenwasser über einen Zeitraum von zwei Jahren ergaben in über 40 % adenoviruspositive Proben und in nur 3 % enteroviruspositive Proben (32).

Daraus lässt sich schließen, dass für die Zwecke der Untersuchung der Virenelimination mittels Membranfiltration andere Viren bestimmt hätten werden sollen, die konstanter im Abwasser vorkommen. Leider konnten diese Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden, da die gezogenen Wasserproben mit den oben genannten Versuchen vollständig verbraucht waren.

5.3. Eliminationsleistung der Membranbelebungsanlage

Etliche Studien haben gute bis sehr gute Eliminationsleistungen dieser Anlagen gezeigt (53),(39),(17). So ermittelten Ueda und Horan anhand von Bakteriophagen eine Reduktion um 2,3 – 5,9 log-Stufen (48) bei einer Porenweite der Membranen von 0,4 μ , Ottoson et al fanden eine Phagenelimination von 3,8 log-Stufen und eine Elimination von Noroviren von 1,1 log-Stufen (39) ebenso bei einer Porenweite von 0,4 μ m. Matsushita et al konnten eine Phagenelimination von > 6 log-Stufen bei einer Porenweite von 0,1 μ m nachweisen (36).

Die ermittelten Reduktionsleistungen der in dieser Arbeit untersuchten Membrananlage beliefen sich bei den f-spezifischen und somatischen Phagen auf fast 100 % (über 99,99 %), bzw. 2,8 – 3,6 log-Stufen.

Im Vergleich zu konventionellen Belebungsanlagen zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine höhere und vor allem konstantere Eliminationsleistung für Bakteriophagen, so ergaben Untersuchungen von vier Anlagen im Neckarraum eine Eliminationsleistung von >95 %, jedoch schwankten die Werte teilweise sehr stark und fielen bis unter 70 % (20). Diese Schwankungsbreite war bei den hier untersuchten Proben nicht festzustellen.

Trotz der guten Eliminationsleistungen des Membranbelebungsverfahrens sind dem Verfahren Grenzen gesetzt und eine flächige Verbreitung derzeit eher nicht in Sicht. Neben den insgesamt höheren Kosten müssten dann parallel zur Verbesserung der Ablaufqualität der Kläranlagen Maßnahmen zur Behandlung von Mischwasserentlastungen oder zur Reduzierung der Entlastungshäufigkeiten erfolgen, was zu noch höheren Kosten führen würde (34).

Vor allem die Membranmodule und deren begrenzte Lebenszeit sind für die hohen Kosten verantwortlich, außerdem sind sie momentan noch nicht großflächig wirtschaftlich den konventionellen Anlagen gegenüber konkurrenzfähig (57).

Untersuchungen des Erft-Verbandes haben gezeigt, dass das Alter der Membranen, solange die Integrität gewährleistet ist, keinen negativen Einfluss auf die Rückhaltung von pathogenen Mikroorganismen zu haben scheint. Diese Untersuchungen wurden mit Membranen durchgeführt, die 2,5 Jahre in Betrieb waren (17).

Dennoch gibt es einige sinnvolle Einsatzmöglichkeiten für das Membranbelebungsverfahren, wie z.B. bei der direkten Versickerung von Kläranlagenabläufen (Kläranlage Merklingen) oder deren Vorfluter in Karstgebieten liegt (Kläranlage Monsheim) (34),(8), sowie die Kläranlage Schramberg- Waldmössingen, bei der das geklärte Abwasser direkt in einen Bach und einen Teich gelangt (4). Hier dient das Membranbelebungsverfahren direkt dem Schutz von Grund- und Oberflächenwasser, sowie Trinkwasserreservoirs (34) und somit dem direkten Infektionsschutz.

Die Europäische Kommission hat sich jedoch zum Ziel gesetzt, die Entwicklung der MBR – Technologie (**M**embrane **B**io **R**eactor) in Europa stärker voranzutreiben und unterstützt in diesem Rahmen vier Projekte, welche parallel von Oktober 2005 bis Dezember 2009 laufen. Seit den Anfängen der MBR – Forschung stellt dies die weltweit größte koordinierte Forschungsinitiative dar, an der etwa 50 europäische und internationale Firmen und Institutionen beteiligt sind. Von den Projekten wird erwartet, dass sie technische Meilensteine setzen,

Prozessverbesserungen ermöglichen und das Verfahren damit wettbewerbsfähiger machen, um eine breitere Anwendbarkeit zu erreichen (54). Durch die zunehmenden Fertigungskapazitäten sind die Membrankosten jedoch in den letzten 10 Jahren schon um den Faktor fünf gesunken (13), so dass das Verfahren immer mehr eine Alternative zu den konventionellen Verfahren darstellt.

5.4. Membranbelebungsverfahren als Desinfektionsverfahren

Als Desinfektionsverfahren ist das Membranbelebungsverfahren, trotz guter Leistungen, jedoch nicht unabdingbar einsetzbar, da sich die Eliminationsleistung nicht direkt und dauerhaft überprüfen lässt. Man kann immer nur Stichproben entnehmen und diese überprüfen. Eine Leckage der Membranen oder Änderungen des Oberflächen- und Adsorptionsverhaltens der Erreger sind nicht direkt und kontinuierlich überprüfbar.

Vor allem die direkte oder indirekte On-Line-Überwachung des Rückhaltes von Partikeln im Größenbereich von Viren ist derzeit nicht möglich, daher wird momentan empfohlen, bei der Aufbereitung mikrobiell belasteter Wässer zu Trinkwasser auf eine abschließende Desinfektion nicht zu verzichten, selbst wenn sehr niedrige Partikelgehalte im Filtrat erreicht werden (14).

Bei der Desinfektion mittels UV-Bestrahlung, Ozonung oder aber durch Chlorung kann man dagegen feste Werte angeben, bei denen das Wasser als unbedenklich gilt, bzw. kann diese Konzentrationen des betreffenden Stoffes direkt überprüfen, bzw. zugeben. Probleme der UV-Bestrahlung und Chlorung sind jedoch auch die oft ungenügende Reduktion der Erreger durch einen zu hohen Anteil an organischen Partikel im Abwasser, was eine Studie in den Niederlanden am Beispiel von somatischen und f-spezifischen Phagen gezeigt hat (6).

Eine Kombination der Verfahren, z.B. mit einer Membranfiltrationsanlage zur Reduktion der organischen Partikel und anschließender Desinfektion mittels Ozon oder Chlor ist daher sinnvoll.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Wasserproben aus einer Versuchskläranlage, welche mit einem Membranbelebungsverfahren ausgerüstet war, untersucht.

Die je 10 Zu- und Ablaufproben wurden über einen Zeitraum von 2 Monaten gewonnen und auf f-spezifische und somatische Bakteriophagen, mittels Plaque-Assay, sowie auf Enteroviren, mittels Light CyclerTM PCR untersucht.

Trotz der ca. viermal geringeren Größe der Bakteriophagen im Vergleich zur Porengröße des Membranfilters von 0,1 µm, konnte eine Elimination der f-spezifischen und somatischen Bakteriophagen von 2,8 bzw 3,6 log-Stufen nachgewiesen werden, was zeigt, dass das Rückhaltevermögen von Membranfiltern nicht alleinig von der Größe der Poren abhängig ist. Als weitere Ursache hierfür werden Faktoren, wie unter anderem die Adsorption an das verwendete Flockungsmittel, Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche und die Entstehung eines Biofilms auf den Membranen, verantwortlich gemacht.

Die Untersuchungen zur Enteroviruselimination mittels Light CyclerTM PCR erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse, was wohl an der Wahl der Viren lag, welche nicht so konstant im Abwasser vorkommen wie unter anderem Adenoviren.

Da die Anzahl der gezogenen Proben gering war, kann keine Aussage über die tatsächliche maximal erreichbare Eliminationsleistung des Membranbelebungsverfahrens gemacht werden, jedoch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit, wie andere Studien und Daten zu diesem Thema, in die selbe Richtung, sodass hier ein weiterer Beitrag zum Nachweis der Effektivität des Verfahrens geleistet werden konnte.

7. Anhang

Tabelle 7:

Zu- und Ablaufkonzentrationen für somatische Bakteriophagen

SZ2; SZ3 Konzentration **s**omatischer Bakteriophagen im **Z**ulauf, Angabe der Konzentration als Ziffer: **2** = 10^{-2} , **3** = 10^{-3} , ...

SAK; SA1 Konzentration **s**omatischer Bakteriophagen im **A**blauf, Angabe der Konzentration als Buchstabe oder Ziffer: **K** = konzentrierte Probe, **1** = 10^{-1} , ...

PK **P**ositiv**k**ontrolle

NK **N**egativ**k**ontrolle

Auszählung vom

13.10.2004

Probe Nr. 1	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	35	3	0	0	24	0
2	35	4	0	0	27	0
3	28	5	0	0	38	0
4	38	5	0	0	19	0
5	18	2	0	1	25	0
6	17	4	0	0		
7	29	3	0	0		
8	12	2	0	0		
9	21	6	0	0		
10	20	2	0	0		
Mittelwert	25,3	3,6	0	0,1	26,6	0
Summe Plaques	253	36	0	1		
pro ml	5060	7200	0	0,2		

Auszählung vom

20.10.2004

Probe Nr. 2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	16	1	0	0	23	0
2	11	2	1	0	17	0
3	8	1	0	0	27	0
4	15	2	0	0	31	0
5	7	2	0	0	33	0
6	13	2	0	0		
7	17	3	0	0		
8	17	2	0	0		
9	14	2	0	0		
10						
Mittelwert	13,11	1,89	0,11	0	26,2	0
Summe Plaques	118	17	1	0		
pro ml	2360	3400	0,02	0		

Auszählung vom

29.10.2004

Probe Nr. 3	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	4	0	0	0	38	0
2	4	0	0	0	41	0
3	2	1	0	0	35	0
4	5	0	0	0	43	0
5	2	0	0	0		
6	6	0	0	0		
7	4	0	0	0		
8	1	1	0	0		
9	6	2	0	0		
10						
Mittelwert	3,78	0,44	0	0	39,25	0
Summe Plaques	34	4	0	0		
pro ml	680	800	0	0		

Auszählung vom

04.11.2004

Probe Nr. 4	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	110	8	0	0	0	66	0
2	77	14	0	0	0	46	0
3	77	12	0	0	0	44	0
4	76	8	2	0	0	45	0
5	87	8	0	0	0	38	0
6	82	11	1	0	0	51	
7	84	10	0	0	0		
8	89	10	0	0	0		
9	110	6	2	0	0		
10			0	0			
Mittelwert	88	9,67	0,5	0	0	48,33	0
Summe Plaques	792	87	5	0	0		
pro ml	1584	1740	1000	0	0		

Auszählung vom

11.11.2004

Probe Nr. 5	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	47	2	0	0	0	67	0
2	51	3	0	0	0	48	0
3	50	5	1	0	0	34	0
4	53	5	0	0	0		0
5	47	4	0	0	0		0
6	47	3	1	0	0		
7	52	9	0	0	0		
8	63	1	0	0	0		
9				0	0		
10							
Mittelwert	51,25	4	0,25	0	0	49,67	0
Summe Plaques	410	32	2	0	0		
pro ml	820	640	400	0	0		

Auszählung vom

18.11.2004

Probe Nr. 6	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	28	6	0	0	0	24	0
2	46	6	1	0	0	18	0
3	62	5	0	0	0	32	0
4	54	6	0	0	0	25	0
5	62	0	1	0	0	28	0
6	54	5	0	0	0		
7	59	7	1	0	0		
8	45	8	0	0	0		
9	47		0	0	0		
10							
Mittelwert	50,78	5,38	0,33	0	0	25,4	0
Summe Plaques	457	43	3	0	0		
pro ml	914	860	600	0	0		

Auszählung vom

25.11.2004

Probe Nr. 7	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	54	2	0	0	0	25	0
2	54	4	0	0	0	18	0
3	78	2	0	0	0	39	0
4	55	4	0	0	0	22	0
5	62	9	0	0	0	24	0
6	58	4	0	0	0		
7	43	9	0	0	0		
8	51	5	0	0	0		
9	53	6	0	0	0		
10	58	8	0	0	0		
Mittelwert	56,6	5,3	0	0	0	25,6	0
Summe Plaques	566	53	0	0	0		
pro ml	1132	1060	0	0	0		

Auszählung vom

02.12.2004

Probe Nr. 8	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	48	10	2	0	0	39	0
2	55	12	1	0	0	24	0
3	46	6	0	0	0	27	0
4	37	7	2	0	0	32	0
5	56	4	1	0	0		
6	62	10	0	0	0		
7	59	5	1	0	0		
8	60	3	0	0	0		
9			2	0	0		
10							
Mittelwert	52,88	7,125	1	0	0	30,5	0
Summe Plaques	423	57	9	0	0		
pro ml	846	1140	1800	0	0		

Auszählung vom

09.12.2004

Probe Nr. 9	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	58	2	0	0	0	28	0
2	41	1	2	0	0	32	0
3	55	4	2	0	0		
4	42	5	1	0	0		
5	60	1	0	0	0		
6	67	4	0	0	0		
7	43	0	1	0	0		
8	55	5	0	0	0		
9							
10							
Mittelwert	52,63	2,75	0,75	0	0	30	0
Summe Plaques	421	22	6	0	0		
pro ml	842	440	1200	0	0		

Auszählung vom

16.12.2004

Probe Nr.10	SZ2	SZ3	SZ4	SAK	SA1	PK	NK
1	25	0	0	0	0	22	0
2	15	1	0	0	0	32	0
3	29	2	1	0	0		
4	22	3	1	0	0		
5	17	3	0	0	0		
6	17	0	0	0	0		
7	24	1	0	0	0		
8	20	3	0	0	0		
9	19	0	0	0	0		
10				0			
Mittelwert	20,89	1,44	0,22	0	0	27	0
Summe Plaques	188	13	2	0	0		
pro ml	376	260	400	0	0		

Tabelle 8:

Zu- und Ablaufkonzentrationen für f-spezifische Bakteriophagen

FZK; FZ1	Konzentration <i>f</i> -spezifischer Bakteriophagen im Z ulauf, Angabe der Konzentration als Buchstabe oder Ziffer: K = konzentrierte Probe, $1 = 10^{-1}$, ...
FAK; FA1	Konzentration <i>f</i> -spezifischer Bakteriophagen im A blauf, Angabe der Konzentration als Buchstabe oder Ziffer: K = konzentrierte Probe, $1 = 10^{-1}$, ...
PK	P ositiv k ontrolle
NK	N egativ k ontrolle
d	nicht auszählbare Platte

Auszählung vom 15.10.2004

Probe Nr. 1	FZK	FZ1	FAK	FA1	PK	NK
1	98	6	0	0	98	0
2	89	9	0	0	85	0
3	59	7	0	0	90	0
4	76	7	0	0	92	0
5	72	11	0	0	101	0
6	88	19	0	0		
7	85	9	0	0		
8	101	d	0	0		
9	113	10	0	0		
10	87	3	0	0		
Mittelwert	86,8	9	0	0	93,2	0
Plaques	868	81	0	0		
pro ml	86,8	81	0	0		

Auszählung vom 20.10.2004

Probe Nr. 2	FZK	FZ1	FAK	FA1	PK	NK
1	115	7	0	d	103	0
2	d	d	0	d	100	0
3	62	3	d	0		
4	42	3	0	0		
5	d	5	0	0		
6	61	5	0	0		
7	99	d	0	0		
8	58	d	1	d		
9	78	d	0	d		
10	55	5	3	0		
Mittelwert	71,25	4,67	0,44	0	101,5	0
Plaques	570	28	4	0		
pro ml	57	28	0,4	0		

Auszählung vom 29.10.2004

Probe Nr. 3	FZK	FZ1	FAK	FA1	PK	NK
1	72	1	0	d	27	0
2	62	3	0	0	38	0
3	42	5	0	0	42	0
4	56	2	0	0		0
5	34	3	0	0		0
6	60	3	0	0		
7	25	7	0	0		
8	35	4	0	0		
9	27	2	0	0		
10	39	3	0	0		
Mittelwert	45,2	3,3	0	0	35,67	0
Plaques	452	33	0	0		
pro ml	45,2	33	0	0		

Auszählung vom 04.11.2004

Probe Nr. 4	FZK	FZ1	FAK	FA1	PK	NK
1	628	95	0	0	60	0
2	612	98	0	0	56	0
3	732	83	0	0		0
4	708	91	0	0		0
5	760	79	0	0		
6	748	102	0	0		
7	756	98	0	0		
8	744	78	0			
9	616	97	0			
10	920	61	0			
Mittelwert	722,4	88,2	0	0	58	0
Plaques	7224	882	0	0		
pro ml	722,4	882	0	0		

Auszählung vom 11.11.2004

Probe Nr. 5	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	305	31	5	0	0	48	0
2	247	23	4	0	0	52	0
3	334	30	5	0	0	44	0
4	292	16	3	0	0	64	0
5	256	18	1	0	0	54	0
6	324	29	4	0	0		
7	264	22	2	0	0		
8	348	18	6	0	0		
9	260	25	1	0	0		
10	360	21	2	0	0		
Mittelwert	299	23,3	3,3	0	0	52,4	0
Plaques	2990	233	33	0	0		
pro ml	299	233	330	0	0		

Auszählung vom 18.11.2004

Probe Nr. 6	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	428	40	3	0	0	68	0
2	528	57	4	0	0	72	0
3	500	68	5	0	0	38	
4	528	52	6	0	0		
5	420	47	7	0	0		
6	572	58	5	0	0		
7	420	42	6	0	0		
8	436	50	3	0	0		
9	552	67	4	0	0		
10	480	50	4	0	0		
Mittelwert	486,4	53,1	4,7	0	0	59,33	0
Plaques	4864	531	47	0	0		
pro ml	486,4	531	470	0	0		

Auszählung vom 25.11.2004

Probe Nr. 7	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	320	39	2	0	1	34	0
2	356	50	0	0	0	46	0
3	420	34	3	0	0	52	0
4	388	27	4	0	0	31	0
5	388	30	2	0	0		0
6	328	42	0	0	0		
7	316	28	2	0	0		
8	408	36	1	0	0		
9	432	42	5	0	0		
10	380	29	2	0	0		
Mittelwert	373,6	35,7	2,1	0	0,1	40,75	0
Plaques	3736	357	21	0	1		
pro ml	373,6	357	210	0	1		

Auszählung vom 02.12.2004

Probe Nr. 8	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	276	30	4	0	0	19	0
2	204	25	4	0	0	20	0
3	288	16	3	0	0	40	0
4	304	28	0	0	0	34	0
5	316	19	1	0	0		
6	244	34	6	0	0		
7	264	22	2	0	0		
8	260	26	4	0	0		
9	348	21	3	0	0		
10	204	27	0	0	0		
Mittelwert	270,8	24,8	2,7	0	0	28,25	0
Plaques	2708	248	27	0	0		
pro ml	270,8	248	270	0	0		

Auszählung vom 09.12.2004

Probe Nr. 9	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	572	62	7	0	0	40	0
2	560	57	6	0	0	31	0
3	680	59	4	0	0	55	0
4	700	63	6	0	0		
5	692	71	4	0	0		
6	644	63	5	0	0		
7	720	67	6	0	0		
8	720	76	3	0	0		
9	688	60	4	0	0		
10	724	75	3	0	0		
Mittelwert	670	65,3	4,8	0	0	42	0
Plaques	6700	653	48	0	0		
pro ml	670	653	480	0	0		

Auszählung vom 16.12.2004

Probe Nr.10	FZK	FZ1	FZ2	FAK	FA1	PK	NK
1	776	72	6	0	0	38	0
2	728	53	8	0	0	42	0
3	884	68	2	0	0	27	0
4	704	76	5	0	0		
5	648	62	4	0	0		
6	592	55	8	0	0		
7	672	62	4	0	0		
8	692	41	4	0	0		
9	624	d	4	0	0		
10	660	d		0	0		
Mittelwert	698	61,125	5	0	0	35,67	0
Plaques	6980	489	45	0	0		
pro ml	698	489	450	0	0		

8. Literaturverzeichnis

- (1) **Abwassertechnische Vereinigung (ATV)** (1998): Desinfektion von biologisch gereinigtem Abwasser. Regelwerk Abwasser – Abfall Merkblatt M 205
- (2) **ATV-DVWK-Arbeitsgruppe IG-5.5** (2002): Aufbereitung von Industrieabwasser und Prozesswasser mit Membranverfahren und Membranbelebungsverfahren, Teil 2: Aerobe Membranbelebungsverfahren. Arbeitsbericht der ATV-DVWK-Arbeitsgruppe IG-5.5 „Membrantechnik“ im ATV-DVWK-Fachausschuss IG 5 „Industrieabwasserreinigung“. KA (49), 11, 1563-1571
- (3) **Balayan, M. S.** (1993): Hepatitis E virus infection in Europe: Regional situation regarding laboratory diagnosis and epidemiology. Clin. Diag. Virol. 1: 1-8
- (4) **Baumann, I.** (2006): Elimination von enteropathogenen Viren und Bakterien mittels Membranbelebungsverfahren. Dissertation der Fakultät für Medizin der Eberhart-Karls-Universität Tübingen (noch unpubl., im Druck)
- (5) **Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft** (1991): Untersuchungen zur Keimreduktion im gereinigten Abwasser durch UV-Bestrahlung. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft. Heft 3 / 91
- (6) **Berg, H. H. J. L. van den, Italiaander, R., Roda Husman, A.M. de** (2005): Disinfection of treated sewage water using chlorination or non-ionising radiation (UV). 13. International Symposium on health related Water Microbiology, Swansea (U.K.), 05.09.2005, Poster 69
- (7) **Blacklow, N. R.** (1984): Norwalkvirus: A major cause of epidemic gastroenteritis. Am. J. Public Health; 72: 1321-1323
- (8) **Bleisteiner, S., Kexel, S., Wedi, D.** (2006): Membranbelebungsanlage Monheim, Erfahrungen über Betrieb, Leistungsfähigkeit und Auswirkung auf das Gewässer. GWF Wasser Abwasser, 147 (7-8), 501-508
- (9) **Brockfeld, T.** (1998): Ökologisches Stoffgebiet, Mediscript, Bad Wörishofen
- (10) **Brown, E. A., Ticehurst J., Lemon, S. M.** (1994): Immunopathology of hepatitis A and hepatitis E infections. In: Thomas, H.C., Waters, J. (eds.): Immunology of Liver Diseases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers B.V., 11-37

- (11) **Dizer**, H., Althoff, W., Bartocha, W., Dorau, W., Grohmann, A., Lopez-Pila, J.M., Seidel, K. (1994): Reduzierung von Bakterien und Viren in Kläranlagsabläufen durch Mikrofiltration in einer Modellanlage. Zbl.Hyg. 196, 23-37
- (12) **Donnison**, A. M., Ross, C. M. (1995): Somatic and f-specific coliphages in New Zealand waste treatment lagoons. Water Research, 29 (4): 1105-1110
- (13) **Döpfens**, E. (2004): Getauchte Membranen zur Abwasserreinigung und Wasseraufbereitung. Filtrieren und Separieren, 18 (4), 171-175
- (14) **DVGW** (2006): www.dvgw.de/wasser/informationen/frdasfach/wasserversorgung.html, Hygienische Sicherheit von Ultrafiltrations- und Mikrofiltrationsanlagen zur Trinkwasseraufbereitung, Energie-Wasser-Praxis, 4
- (15) **DWA**, (2005): 2. Arbeitsbericht des DWA-Fachausschusses KA-7, Membranbelebungsverfahren, veröffentlicht auf der DWA-Internetseite www.dwa.de, Online-Plus-Bereich, Arbeitsberichte
- (16) **EG-Richtlinie** (1976): Richtlinie des Rates vom 16. Juni 1975 über die Qualität der Badegewässer (76/160/EWG). Amtsblatt der EG Nr. L 194/34
- (17) **Erft-Verband**, Bereich Abwassertechnik, Drensla, K., Brepols, C., Janot, A.; Abschlußbericht für das Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (MUNLV) des Landes Nordrhein-Westfalen (2004): Optimierung einer Belebungsanlage mit Membranfiltration
- (18) **Fleischer**, J. (1997): Nachweis von enteropathogenen Viren im Wasser. Jahresbericht 1996. Landesgesundheitsamt Stuttgart
- (19) **Fleischer**, J. (1998a): Untersuchungen zur Belastung von Oberflächen- und Rohwässern mit enteropathogenen Viren und anderen Krankheitserregern. Jahresbericht des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg. 84-87
- (20) **Fleischer**, J. (1998b): Elimination von enteropathogenen Viren und Fäkalindikatoren bei der erweiterten biologischen Abwasserreinigung: Vergleich zwischen 4 Anlagen des Neckarraumes. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- (21) **Fleischer**, J., Wagner-Wiening, C., Kimmig, P. (2000): Virological and bacteriological investigations surveying drinking water resources in Germany. IWA-2000 Paris, Health-Related Water Microbiology, Book Nr. 7, HRMP-B13, 125-126

- (22) **Gimbel**, R., Hagmeyer, G. (2001): Membranfilter sichern zunehmend die Trinkwasserqualität. Forum Forschung 2001:104-109
- (23) **Grabow**, W. O. K., Courbrough, P. (1986): Practical direct plaque assay for coliphages in 100-ml samples of drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 52, 430-433
- (24) **Hahn**, T., Tougianidou, D., Herbold, K., Flehming, B., Botzenhart, K. (1988): Vorkommen von Enterobakterien, Coliphagen und enteralen Viren in einem Kiesaquifer des Neckarraumes. Z. dt. geol. Ges. 139, 559-565
- (25) **Havelaar**, A. H. (1986): F-Specific bacteriophages as a model viruses in water treatment processes. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, The Netherlands
- (26) **Havelaar**, A. H. (1991): Bacteriophages as a model viruses in water quality control. Water Res. 25: 529-545
- (27) **Havelaar**, A. H., Hogeboom, W. M. (1994): A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bacteriol. 56, 439-447
- (28) **Heijkal**, T. W., Keswick, B., LaBelle, R. L., Gerba, C. P., Sanchez, Y., Dreesman, G., Hafkin, B., Melnick, J. L. (1982): Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. Journal AWWA, June 318-321
- (29) **Hughes**, M. S., Coyle, P. V., Connolly, J. H. (1992): Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland. Epidemiol. Infect. 108, 529-536
- (30) **Infektionsschutzgesetz** (IfSG) (2000), BGBl. I S. 1045
- (31) **Irving**, L. G., Smith, F. A. (1981): One-year survey of enteroviruses, adenoviruses and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. Appl. Environ. Microbiol. 41, 51-59
- (32) **Kimmig**, P., Fleischer, J. (2000): Untersuchungen zur Belastung von Rohwässern mit enteropathogenen Viren und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung. Abschlußbericht zum DVGW-Projekt 11/97, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart
- (33) **Kimura**, K., Hara, H., Watanabe, Y. (2004): Membranes in Drinking and Industrial Water Production. Desalination, 178 (1-3): 135-140
- (34) **Krampe**, J. (2005): Einsatz von Membranen bei der biologischen Abwasserreinigung
- (35) **Madigan**, M. T., Martinko, J. M. (2006): Brock Mikrobiologie, 11, Pearson Studium, München

- (36) **Matsushita**, T., Matsui, Y., Shirasaki, N. (2006): Analysing mass balance of viruses in a coagulation-ceramis microfiltration hybrid system by a combination of the polymerase chain reaction (PCR) method and the plaque forming units (PFU) method, Wat. Sci. Tech. 53 (7), 199-207
- (37) **Mayr**, B. S. (2005): Kommunale Membran-Kläranlage, EnviCare[®], www.envicare.at
- (38) **Oethinger**, M. (Hrsg.), Hengel, H., Wand-Württenberger, A. (2000): Mikrobiologie und Immunologie, Urban&Fischer, München, Jena
- (39) **Ottoson**, J., Hansen, A., Björlenius, B., Norder, H., Stenström, T. A. (2006): Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and mebrane process in a wastewater pilot plant. Water Res. 40, 1449-1457
- (40) **Payment**, P (1981): Isolation of viruses from drinking water at the Pont-Viau water treatment plant Can. J. Microbiol. 27, 417-420
- (41) **Petrovicova**, A., Simkova, A., Cervenka, J. (1987): Enteroviruses and coliphages in different water ecosystems. Int. Symposium Viruskontamination der umwelt und Verfahren der Kontrolle, Dresden, Med. Akademie: 78-84
- (42) **Produktbeschreibung mediagnost für ENTEROrealDETECT**, ENTEROrealDETECT zum Nachweis von enteroviraler RNA, Version November 2004, Mediagnost GmbH, Reutlingen
- (43) **Robert-Koch-Institut** (2001), Bericht zu einem Gastroenteritis-Ausbruch durch Norwalk-like-Viren in einem Krankenhaus, Epid. Bull. 33
- (44) **Sano**, D., Ueki, Y., Watanabe, T., Omura, T. (2005): Removal of indigenous noroviruses by membrane filtration. 13. International Symposium on health related Water Microbiology, Swansea (U.K.), 05.09.2005, Poster 62
- (45) **Standardprotokoll des High Pure Nucleic Acid Kit (Roche)**, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, for isolation of viral nucleic acids for PCR or RT-PCR, Version 5.05.2001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- (46) **Stevenson**, A. H. (1953): Studies of bathing water quality and health. J. Am. Publ. Hlth. Assoc. 43: 529-538
- (47) **Tani**, N., Shimamoto, K., Ichimura, K., Nishii, Y., Tomita, S., Oda, Y. (1992): Enteric Virus Levels in River Water. Water Research, 26 (1), 45-48
- (48) **Ueda**, T., Horan, N. J. (2000): Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. Water Res 34 (7), 2151-2159

- (49) **Umweltbundesamt** (1995): Mikrobiologische Untersuchungsverfahren von Badegewässer nach Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG. Bundesgesundheitsblatt, 10: 385-396
- (50) **Vilaginès**, P., Sarrette, B., Husson, G. (1993): Glass wool for virus concentration at ambient water pH-level. Wat. Sci. Tech. 27, 299-306
- (51) **Walter**, R. (Hrsg), Armon, R., Botzenhart, K., Dürkop, J., Farrah, S. R., Ilming, N., Kott, Y., Lebeth, F., Michlmayer, F., Schiel, W. (2000): Umweltvirologie, Springer, Wien
- (52) **Walter**, R., Groß, F.-J., Zoufal, W. (1998): Die Qualität der Badegewässer im Sommer 1998 in Wien, oder Erfahrungen und Erkenntnisse beim Umsetzen der EU-Badewasserrichtlinie (76/160/EWG). Mitt. Sanitätsverwaltung, 23-31
- (53) **Winnen**, H., Suidan, M. T., Scarpino, P. V., Wrenn, B., Cicek, N., Urbain, V., Manem, J. (1996): Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular-weight compounds. Wat. Sci. Tech. 34 (9), 197-203
- (54) **www.mbr-network.eu**, MBR-Netzwerk: ein Cluster von EU-Projekten rund um das Thema MBR-Technologie, <http://www.mbr-network.eu/mbr-projects/proj-desc-abstarct-de.php>
- (55) **Wyer**, M. D., Fleisher, J. M., Gough, J., Kay, D., Merrett, H. (1995): Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. Wat. Sci. Tech. 31, 337-344
- (56) **Wyn-Jones**, A., Pallin, R., Sellwood, J., Touganidou, D. (1995): Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. Wat. Sci. Tech. 31, 337-344
- (57) **Yoon**, T. I., Lee, H. S., Kim, C. G. (2004): Comparison of pilot scale performances between membrane bioreactor and hybrid conventional wastewater treatment systems. J Membrane Sci 242 (1-2), 5-12
- (58) **Zenon**, Homepage der Firma Zenon, <http://www.zenon.com/lang/Deutsch/produkte/mbr/MBR-Verfahren.shtml>

Danksagung

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

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

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

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

Dr. Christiane Wolz, Vittoria Bisanzio und Simone Esser danke ich für die umfangreiche Unterstützung bei den PCR-Arbeiten und vor allem für die nette Atmosphäre im „3.Stock“!

Danke auch an Frau Schrader und Herrn Dr. Krampe vom Institut für Siedlungswasserbau, Abteilung Abwassertechnik, in Stuttgart für die Möglichkeit der Beprobung ihrer Anlage und Unterstützung bei der Probenentnahme und Ausarbeitung der Arbeit.

Vielen Dank auch an meine Freundinnen Sandra Fürst, die mir sehr bei der Formatierung und den diversen Software-Problemen geholfen hat, sowie an Ines Kuhlicke fürs Korrekturlesen. Danke auch an meine Tante Regina Linder bei der Hilfe im Kampf um die neue deutsche Rechtschreibung.

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

Vielen Dank an meine Mutter und meinen Stiefvater für die liebevolle Betreuung unserer Kinder, vor allem, wenn's mal wieder „eng“ wurde.

... und natürlich vielen Dank an meinen Mann Ingo Baumann und meine drei Töchter Ronja, Lejana und Maja, die oft viel Geduld mit mir aufbringen mussten! Ich hab' Euch lieb!

Lebenslauf

Name	Katrin Regina Hupfauf	
Geburtsdatum	05.12.1978	
Ort	Ulm	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Familienstand	verheiratet	
Kinder	Ronja Hupfauf (1998) Lejana Hupfauf (2002) Maja Hupfauf (2005)	
Eltern	Angelika Hupfauf, geb. Walz Dr. med. Georg Hupfauf	
Schulausbildung	1985 – 1986	Meinloh-Grundschule Ulm
	1986 – 1988	Martin-Schaffner-Grundschule Ulm
	1988 – 1989	Drais- Grundschule Karlsruhe
	1989 – 1992	Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe
	1992 – 1998	Neues Gymnasium Stuttgart
	1998	Allgemeine Hochschulreife
Universitätsausbildung	SS 1999	Beginn des Medizinstudiums Eberhard – Karls – Universität Tübingen
	03 / 2001	Ärztliche Vorprüfung
	04 / 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	09 / 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	12.05.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2004-2006	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen
		1. Terial Chirurgie 2. Terial Innere Medizin 3. Terial Gynäkologie
Dissertation	2004-2006 Promotion an der Universität Tübingen Abteilung für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene „Elimination von somatischen und f-spezifischen Bakteriophagen, sowie enteropathogenen Viren mittels Membranbelebungsverfahren“	