

# **Bayerisches Landesamt für Umwelt**

## **Schlussbericht**

Überprüfung der Abtötung bzw. Inaktivierung  
ausgewählter Krankheitserreger in Abwasser  
durch UV-Strahlung  
im Vergleich zur Reduktion  
von Fäkalindikatorbakterien  
und Untersuchungen zur Wiederverkeimung

Dipl. Biol. Stefanie Huber

Dr. Wolfgang Popp

Februar 2005



1	Einleitung .....	5
2	Material und Methoden .....	7
2.1	Proben/ Probenahmeterminale .....	7
2.2	Nachweisverfahren .....	7
2.2.1	Nachweis von Fäkalindikatorbakterien .....	7
2.2.2	Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. ....	8
2.2.3	Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. ....	9
2.2.4	Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> .....	10
2.2.5	Nachweis von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen und somatischen Coliphagen .....	10
2.2.5.1	Nachweis nach DIN EN ISO 10705 .....	10
2.2.5.2	Konzentrierung von Bakteriophagen .....	11
2.2.6	Nachweis von humanpathogenen Viren .....	12
2.2.7	Nachweis von <i>Cryptosporidium</i> spp. und <i>Giardia</i> spp. ....	12
2.3	Korrelation .....	12
2.4	Bestimmung suspendierter Feststoffe .....	12
2.5	Untersuchung von Flussproben .....	13
2.6	Versuche zur Wiederverkeimung .....	13
3	Ergebnisse .....	15
3.1	Vorversuche und Methodenverbesserung .....	15
3.1.1	Salmonellen .....	15
3.1.1.1	ohne unspezifische Anreicherung .....	15
3.1.1.2	mit unspezifischer Anreicherung .....	15
3.1.1.3	Vergleich zwischen den Isolierungsmethoden .....	16
3.1.1.4	Bestätigung .....	17
3.1.2	<i>Clostridium perfringens</i> .....	18
3.1.3	Bakteriophagen .....	18
3.1.3.1	Wirtskulturen und Referenzkontrollen .....	18
3.1.3.2	Konzentrierung .....	19
3.2	Reduktion von Mikroorganismen während der Abwasserreinigung .....	21
3.3	Reduktion von Mikroorganismen in UV-Anlagen .....	22
3.3.1	Reduktion der Fäkalindikatorbakterien .....	22
3.3.2	Reduktion nicht-sporenbildender Bakterien .....	23
3.3.2.1	Salmonellen .....	23
3.3.2.2	<i>Campylobacter</i> spp. ....	24
3.3.3	Reduktion von <i>Clostridium perfringens</i> .....	24
3.3.4	Reduktion von Bakteriophagen .....	26
3.3.4.1	F-spezifische RNA-Bakteriophagen .....	26
3.3.4.2	Somatische Coliphagen .....	27
3.3.5	Reduktion von humanpathogenen Viren .....	27
3.3.5.1	PCR-Nachweis .....	27
3.3.5.2	Nachweis mit Hilfe von Zellkulturen .....	28
3.3.6	Reduktion von parasitischen Protozoen .....	29
3.4	Korrelationsergebnisse .....	30
3.5	Suspendierte Feststoffe und UV-Desinfektion .....	32
3.6	Nachweis bestimmter Mikroorganismen in Flussproben .....	34
3.6.1	F-spezifische RNA-Bakteriophagen im Kernbach .....	34
3.6.2	Salmonellen in der Würm .....	36
3.7	Wiederverkeimungsversuche .....	36
3.7.1	Kläranlage Schäftlarn .....	36
3.7.2	Kläranlage Starnberg .....	39
4	Diskussion .....	43
4.1	Methoden .....	43
4.2	Konzentrationen von Mikroorganismen in den Abwasserreinigungsstufen .....	44
4.3	Reduktion von Mikroorganismen in UV-Desinfektionsanlagen .....	45
4.4	Korrelation der Konzentrationen verschiedener Mikroorganismen .....	48
4.5	Einfluss suspendierter Feststoffe auf die UV-Desinfektion .....	49
4.6	Untersuchungen von Kernbach und Würm .....	50

4.7 Wiederverkeimung von UV-bestrahlten Kläranlagenabläufen .....	51
4.8 Fazit .....	53
5 Zusammenfassung .....	55
6 Literaturverzeichnis .....	57
Danksagung .....	59

# 1 Einleitung

Die Obere Isar wird in vielen Bereichen – besonders im Stadtgebiet von München - zum Baden genutzt, obwohl ihre hygienische Wasserqualität nicht immer der eines Badegewässers entspricht. Da sie im Uferbereich relativ gering von diffusen Abschwemmungen aus landwirtschaftlich genutzten Flächen und aus Siedlungsbereichen belastet wird, wurde ihre Sanierung in der dem Bayer. Landtag vorgelegten Studie „Verbesserung der Gewässergüte bayerischer Gewässer in Hinblick auf Badegewässerqualität“ vorgeschlagen und als Pilotvorhaben ausgewählt (Popp et al. 2000). Der Ablauf der Kläranlage der Stadt Bad Tölz (Ausbaugröße 82.000 EW, Trockenwetter-Abfluss: 500 m<sup>3</sup>/h) stellt den ersten wesentlichen Belastungsschwerpunkt am Oberlauf der Isar dar, weshalb dort die erste Abwasserdesinfektionsanlage im Jahre 2000 in Betrieb genommen wurde. Dazu wurde am Ablauf des Sandfilters eine UV-Bestrahlungsanlage mit zwei Straßen mit je 72 Quecksilber-Niederdruckstrahlern (125 W, Wellenlänge: 254 nm) installiert, mit deren Hilfe die Leitwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie (EG 1976) meist um eine Zehnerpotenz unterschritten werden (Popp et al. 2004). Im bayerischen Förderprogramm zur Abwasserdesinfektion an einigen ausgewählten Gewässern (bisher Isar bis Moosburg; Loisach, Würm) wird eine Unterschreitung der Leitwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie um eine Zehnerpotenz am Ablauf der UV-Anlagen gefordert („Auflagewerte“), damit die Leit- und Grenzwerte im UV-bestrahlten Abwasser bei der Einleitung in das Gewässer auch eingehalten werden, falls ein Teil der Fäkalbakterien seine UV-Schäden repariert („Wiederverkeimung“). Die UV-Anlagen sind jeweils vom 15. April bis 30. September in Betrieb.

Nach der EG-Richtlinie werden die sog. Fäkalindikatorbakterien Gesamtcoliforme Bakterien, Fäkalcoliforme Bakterien und Fäkalstreptokokken untersucht. Allerdings weiß man aus zahlreichen Laborexperimenten (z.B. Chang et al. 1985), dass die Abtötungsraten von einigen pathogenen Mikroorganismen bei UV-Bestrahlung nicht denen der Fäkalindikatorbakterien entsprechen. Somit würde eine Einhaltung der Leit- und Grenzwerte der EG-Richtlinie bezüglich Indikatorbakterien nicht unbedingt auch eine weitgehende Reduktion von potentiellen Krankheitserregern bedeuten. In diesem Projekt wurde die Reduktion ausgewählter Krankheitserreger durch UV-Strahlung in Praxisanlagen im Vergleich zu Fäkalindikatoren untersucht. Aus der Gruppe der Bakterien wurden Salmonellen und *Campylobacter* spp., sowie der Sporenbildner *Clostridium perfringens* nachgewiesen. Als Modellorganismen für enteropathogene Viren dienten somatische Coliphagen und F-spezifische RNA-Bakteriophagen. Die Gruppe der parasitischen Protozoen war durch Cryptosporidien und Giardien vertreten. Im Jahr 2002 lag der Schwerpunkt auf der Erprobung

und Verbesserung der Nachweismethoden für die oben genannten Organismen in unbestrahltem und UV-bestrahltem Abwasser. Ein Großteil der Untersuchungen in 2002 und 2003 erfolgte mit Proben aus der Kläranlage Bad Tölz, da die UV-Anlagen in Lenggries, Wolfratshausen, Schäftlarn, Benediktbeuern-Bichl und Penzberg erst im Laufe des Sommers 2003 in Betrieb gingen. In den Jahren 2004 und 2005 wurden zahlreiche Experimente zur Wiederverkeimung von UV-bestrahltem Abwasser durchgeführt. Daneben wurden Flüsse (Kernbach, Würm) beprobt, in die Kläranlagen mit Desinfektionsstufe einleiten. Außerdem wurden Fragestellungen hinsichtlich des Einflusses suspendierter Feststoffe im Abwasser auf die UV-Desinfektion bearbeitet. In der Badesaison 2005 wurden zusätzlich einige Proben aus der UV-Anlage Bad Tölz auf humanpathogene Viren untersucht.

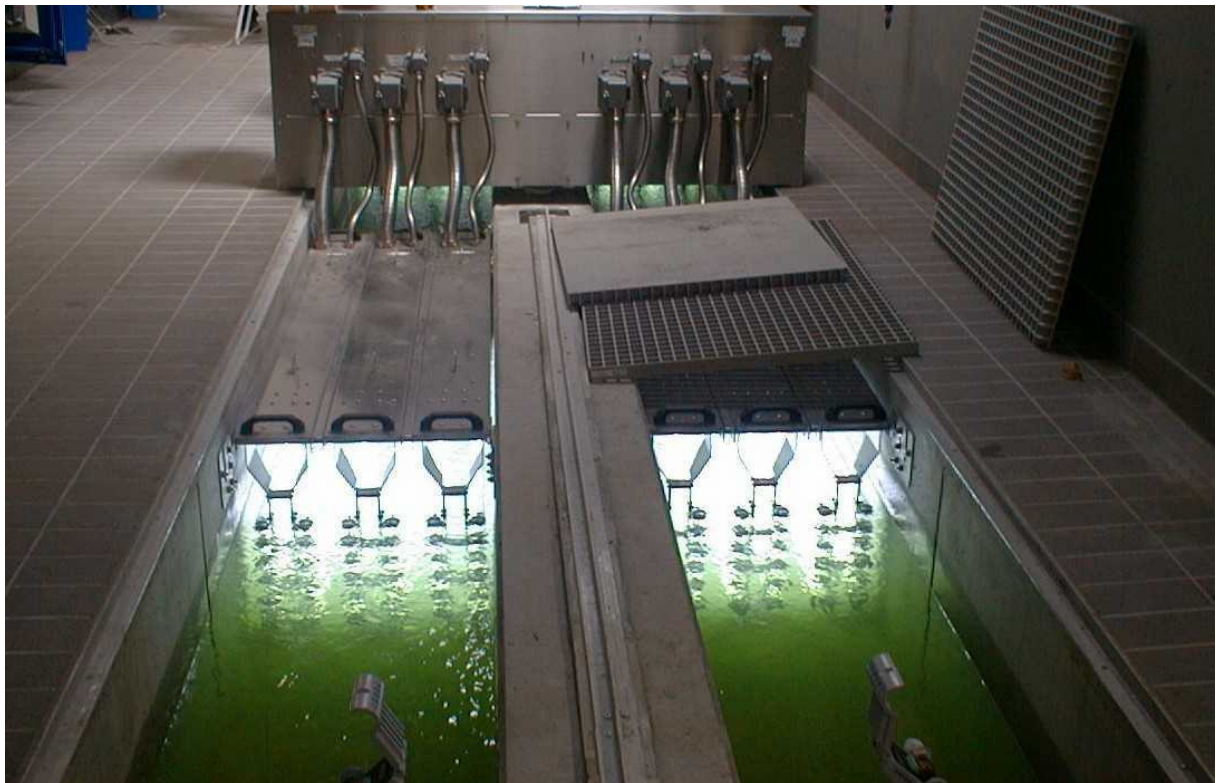


Abb. 1: Bestrahlungserinne der UV-Anlage Bad Tölz (Foto: LfW, Ref. 34)

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Proben/ Probenahmetermine**

Alle Proben wurden mit Hilfe eines Probenahmestabes und innen sterilen Glasflaschen genommen. Im Zeitraum zwischen 24.06. und 30.09.2002 und zwischen 12.05. und 29.09.2003 wurden - in der Regel in einem Abstand von 14 Tagen - Wasserproben in der Kläranlage Bad Tölz genommen. Dabei handelte es sich um Proben aus dem Kläranlagenablauf vor bzw. nach UV-Bestrahlung.

Für Vorversuche und zur Verbesserung der Methoden wurde auch mit den Abläufen der Kläranlagen Starnberg (nach Biofilter, Ausbaugröße 100.000 EW, Trockenwetter-Abfluss: 700 m<sup>3</sup>/h) und Schäftlarn (nach Sandfilter, Ausbaugröße 7.500 EW, Trockenwetter-Abfluss: 30 m<sup>3</sup>/h) gearbeitet (Juni 2002 – März 2003).

Für die Überprüfung der allgemeinen Reduktionsleistung einer Kläranlage bezüglich pathogener Mikroorganismen wurde ebenfalls die Anlage in Starnberg ausgewählt (Nov. 2002 bis März 2003).

Die Versuche zur Wiederverkeimung wurden auf den Kläranlagen Schäftlarn (Juni – Sept. 2004, Sept. 2005) und Starnberg (Mai – Aug. 2005) durchgeführt. Für die Untersuchungen zum Einfluss suspendierter Stoffe wurden Proben in der Anlage Lenggries (kein Sandfilter, Ausbaugröße 10.000 EW) genommen (Juli – Aug. 2004). Der Kernbach und die Kläranlage Benediktbeuern-Bichl (Ausbaugröße 8.000 EW) wurden außerhalb (Jan. – Febr. 2004, Jan. – Apr. 2005) und in der Betriebszeit der UV-Anlage (Sept. 2004, Juli – Aug. 2005) für Fragestellungen zur Wiederfindung beprobt. In 2005 (Apr. – Juni) wurden auch Proben aus der Würm untersucht. Die Nachweise von humanpathogenen Viren erfolgten in Proben aus der UV-Anlage Bad Tölz (Juni – Juli 2005).

### **2.2 Nachweisverfahren**

#### **2.2.1 Nachweis von Fäkalindikatorbakterien**

Um die Reduktionsleistung der UV-Anlage bezüglich pathogener Mikroorganismen und Fäkalindikatorbakterien miteinander vergleichen zu können, wurde zum einen die Anzahl von Gesamt- und Fäkalcoliformen Bakterien sowie von Fäkalstreptokokken im Kläranlagenablauf vor und nach UV-Bestrahlung bestimmt.

Der Nachweis von Gesamt- und Fäkalcoliformen Bakterien erfolgte nach einem „Most-Probable-Number-Verfahren“ (MPN-Verfahren) mit Fluorocult® Laurylsulfat-Bouillon (Merck 1.12588) als Nährlösung (Umweltbundesamt 1995). Pro Verdünnungsstufe (10<sup>-1</sup> bis

$10^{-4}$  in 0,85%iger NaCl-Lösung vor UV-Bestrahlung) wurden drei Kulturröhrchen mit je 5 ml Bouillon (1,2fach konzentriert) und einem Durham-Röhrchen versehen und mit 1 ml verdünntem Ablauf beimpft. Vom bestrahlten Ablauf wurden 1, 10 und 100 ml Probe untersucht. 1 ml Probe wurde zu 5 ml 1,2fach konzentrierter Bouillon (s.o.) und 10 ml Probe zu 3 ml 4,3fach konzentrierter Bouillon (mit Durham-Röhrchen) gegeben. Für 100 ml-Proben wurden mit 30 ml 4,3fach konzentrierter Bouillon gefüllte Vierkantflaschen (ohne Durham-Röhrchen) verwendet. Nach Bebrütung für  $(44 \pm 4)$  h bei  $(37 \pm 1)$  °C konnten die Röhrchen abgelesen werden. Kennzeichnend für Gesamtcoliforme Bakterien ist die Gasbildung. Positive Röhrchen (mit Gasbildung) wurden mit 0,5 ml (bei 1 ml Probenzugabe) bzw. 1 ml (bei 10 ml Probenzugabe) 1N NaOH versehen. Fluoreszieren diese Röhrchen im UV-Licht (360 nm), sind sie auch für Fäkalcoliforme Bakterien positiv. 100 ml-Proben wurden als für Gesamtcoliforme positiv gewertet, wenn die Nährlösung in den Vierkantflaschen bewachsen war. Fluoreszenz war in diesen Flaschen schwierig zu erkennen. Deshalb wurden je 5 ml Bakterienkultur in ein Reagenzröhrchen pipettiert und nach Zugabe von 0,5 ml 1N NaOH im UV-Licht ausgewertet. Die Berechnung der wahrscheinlichsten Keimzahl [MPN/ 100 ml] erfolgte mit Hilfe einer Tabelle nach de Man (Bast 1999).

Die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten [KBE/ 100 ml] von Fäkalstreptokokken wurde mit einem Membranfiltrationsverfahren nach DIN EN ISO 7899-2 (DIN 2000) bestimmt. Die zur Filtration eingesetzten Probenvolumina betragen in der Regel 1 ml unverdünnt und 1 ml der  $10^{-1}$ -Verdünnung bei unbestrahltem bzw. 100 ml bei UV-bestrahltem Kläranlagenablauf (jeweils zwei Parallelen). Die Filter wurden vor und nach Probenzugabe mit 0,85%iger NaCl-Lösung gespült, bei 1 ml-Probenvolumen wurde außerdem NaCl-Lösung vorgelegt. Nach der Filtration wurden die Filter auf Membranfilter-Enterokokken-Selektivagar-Platten (Durchmesser: 5,5 cm) nach Slanetz und Bartley (Merck 1.05285) gelegt und die Platten bei  $(37 \pm 1)$ °C für  $(44 \pm 4)$  h inkubiert. Anschließend wurden die Filter auf vorgewärmte (ca. 44°C) Galle-Äsculin-Azid-Agarplatten (Difco 0525-17) übertragen und für 2 h bei  $(44 \pm 1)$ °C bebrütet. Ausgezählt wurden die Kolonien, die eine gelbbraune bis schwarze Färbung im umgebenden Medium aufwiesen.

### 2.2.2 Nachweis von *Salmonella* spp.

Der Nachweis von Salmonellen erfolgte in Anlehnung an das MPN-Verfahren aus dem Norm-Entwurf ISO/DIS 19250 (ISO 2003a). 1, 10 und 100 ml (jeweils drei Parallelen) unbestrahlter Kläranlagenablauf bzw. 100 und 900 ml (keine Parallelen) bestrahlter Ablauf wurden filtriert (Spülung mit NaCl-Lösung, s. 2.2) und die Filter zur unspezifischen



Voranreicherung in 50 ml gepuffertem Peptonwasser (Merck 1.07228) bei  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  für  $(14 \pm 2)$  h bebrütet. Aus jeder dieser Voranreicherungskulturen wurden 0,1 ml in Röhrchen mit 10 ml RVS-Bouillon (Merck 1.07700) überführt. Nach  $(28 \pm 2)$  h bei  $(42,5 \pm 1)^\circ\text{C}$  wurden nach dieser selektiven Anreicherung XLD-Agarplatten (Merck 1.05287) und z.T. zusätzlich Rambach<sup>®</sup>-Agarplatten (Merck 1.07500) beimpft und 24 bis 48 h bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet. Ab 2003 wurde mit dieser Methode gearbeitet, da sie sich in Versuchen im Herbst 2002 als die effektivste erwiesen hatte. In diesen Versuchen waren Anreicherungs-schritte, Proben-volumina, Bebrütungszeiten und das Volumen der zu überimpfenden Voranreicherungskultur variiert worden. Zudem hatte eine Zugabe von Novobiocin zu RVS-Bouillon und/ oder XLD-Agar (Tate et al. 1990) die Effizienz des Verfahrens nicht erhöht (vgl. 3.1.1.3).

Durch Überimpfung von auf XLD- bzw. Rambach<sup>®</sup>-Agar verdächtigen Kolonien auf Harnstoff-Schrägagar (Merck 1.08492, Zugabe von 50 ml einer 40%igen Harnstoff-Lösung zu einem Liter Agarbasis) konnte nach 18 bis 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  entschieden werden, ob es sich um *Proteus* spp. (Harnstoffabbau) oder *Salmonella* spp. (kein Harnstoffabbau) handelte. Weiterhin erfolgte eine Bestätigung mit dem Wellcolex Colour Salmonella-Testkit (Genzyme Virotech HW/30858302) bzw. mit BBL<sup>™</sup>Enterotubes<sup>™</sup>II (BD 273176). Quantifiziert wurde mit Hilfe einer MPN-Tabelle (s. 2.2.1).

### 2.2.3 Nachweis von *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* spp. wurden mit einer MPN-Methode, die sich an ISO/DIS 17995 (ISO 2003b) anlehnt, bestimmt. Filtriert wurden 0,1; 1; 10 und 100 ml (jeweils drei Parallelen) nicht UV-bestrahlter Kläranlagenablauf bzw. 100 und 900 ml (keine Parallelen) UV-bestrahlter Ablauf. Die Filter wurden in Reagenzröhrchen (Durchmesser: 3 cm; Höhe: 20 cm) zu 90 ml Preston-Bouillon (Oxoid: Nährbouillon Nr. 2 CM0067B, Campylobacter-Anreicherungssupplement SR0084E, Preston-Selektiv-Suppl. SR0117E, lysiertes Pferdeblut (50 ml/ 1 Medium) SR0048C) gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  in  $\text{O}_2$ -reduzierter und  $\text{CO}_2$ -angereicherter Atmosphäre (Anaerocult<sup>®</sup> C, Merck 1.16275) im Anaerobentopf für  $(48 \pm 4)$  h bebrütet. Ausgestrichen wurde mit Hilfe steriler Wattestäbchen bzw. Impfösen auf mCCDA-Agar (Modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate-Agar, Oxoid: Campylobacter-Agar-Basis blutfrei CM0739B, CCDA-Selektiv-Suppl. SR0155E), bebrütet wurde wiederum in modifizierter Atmosphäre für  $(48 \pm 4)$  h bei  $(42,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Gewachsene Kolonien wurden auf einem Objektträger in Nährbouillon suspendiert und sofort mikroskopiert. *Campylobacter* spp. sind sehr bewegliche Kurzstäbchen, die sich häufig korkenzieherartig bewegen. Bezüglich ihrer Morphologie und Bewegung typische Zellen wurden als präsumtive

*Campylobacter* spp. gewertet. Ein Teil der präsumtiven *Campylobacter* spp.-Kolonien wurde mit dem „Dryspot-*Campylobacter*-Test“ (Oxoid DR150M) bestätigt.

#### 2.2.4 Nachweis von *Clostridium perfringens*

Für den Nachweis von *Clostridium perfringens* wurde der mCP (membrane *Clostridium perfringens*)-Agar (Oxoid: Basis CM0992B; Supplement SR0188E) verwendet, zu dem Phenolphthalein-Diphosphat (Sigma P0126)-, FeCl<sub>3</sub> (Sigma F2877)- und Indoxyl-β-D-Glucosid (Sigma I3750)-Lösungen, wie vom Hersteller angegeben, zugegeben wurden. Von nicht UV-bestrahltem Abwasser wurden meist 5 ml, 10 ml und 20 ml filtriert, vom bestrahlten Abwasser 10, 50 und 100 ml. Die Abwasserproben wurden in der Regel vor der Filtration nicht erhitzt, so dass vegetative Zellen und Sporen von *C. perfringens* isoliert wurden. Zweimal wurde zusätzlich die Sporenzahl separat bestimmt. Dafür wurde ein Teil der Wasserprobe für 15 min auf 60°C erhitzt, wobei das Erreichen der Temperatur in einem Gefäß mit gleichem Wasservolumen wie die Probe kontrolliert wurde. Die Filter wurden auf mCP-Agarplatten gelegt und (24 ± 3) h anaerob bei (44 ± 1) °C bebrütet. Nach Vorversuchen mit einem anaeroben Brutschrank wurde ein Anaerobentopf verwendet (Anaerocult® A, Merck 1.13829, zur Erzeugung eines anaeroben Milieus). Eine *Clostridium perfringens*-Kultur ist gelb auf mCP-Agar, verfärbt sich nach Bedampfung mit Ammoniak für ca. 30 s aber rot bzw. rosa. Zur Bedampfung wurden die geöffneten Platten zunächst neben ein Gefäß mit NH<sub>4</sub>OH-Lösung gestellt und mit Alufolie abgedeckt (vgl. 3.1.1). Für eine eindeutigere Farbreaktion erwies es sich jedoch als geeigneter, eine geöffnete Platte direkt über eine Flasche mit Ammoniaklösung zu halten. Durch Auszählen der rötlichen Kolonien erhält man die Anzahl Kolonie bildender Einheiten von *Clostridium perfringens*.

#### 2.2.5 Nachweis von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen und somatischen Coliphagen

##### 2.2.5.1 Nachweis nach DIN EN ISO 10705

Der Nachweis von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen und somatischen Coliphagen erfolgte nach DIN EN ISO 10705, Teil 1 und 2 (DIN 2001). Wirtsstämme waren *Salmonella* Typhimurium WG49 (ATCC 700730) bzw. *Escherichia coli* DSM 12242. Für somatische Coliphagen wird in der Norm der Nalidixinsäure-resistente *E. coli*-Stamm ATCC 700078 (WG5) als Wirtsstamm für Abwasserproben empfohlen. Um Kosten einzusparen, wurde der *E. coli*-Stamm DSM 12242 verwendet, der ebenfalls (bis zu einer Konzentration von 60 mg/l) gegen Nalidixinsäure resistent ist. Von unbestrahltem Ablauf wurden 0,1 bis 1 ml (je 2 parallelen) auf RNA-Bakteriophagen bzw. 0,1 und 0,2 ml auf somatische Coliphagen

untersucht. Das in der Norm beschriebene Verfahren für Proben mit geringer Phagenzahl wurde für UV-bestrahlten Ablauf und Flusswasser angewendet. Dabei kann pro 14-cm-Petrischale 5 ml Probe eingesetzt werden. Das Ergebnis wird in Plaque bildenden Einheiten pro 100 ml angegeben [PBE/ 100 ml].

#### 2.2.5.2 Konzentrierung von Bakteriophagen

Von UV-bestrahlten Abläufen mussten Volumina von bis zu 100 ml untersucht werden. Da die oben erwähnte Methode für Proben mit geringer Phagenzahl sehr material- und zeitaufwendig ist, wäre eine Konzentrierung der Bakteriophagen sinnvoll. Dazu wurde eine Membranfiltrations-/ Elutionsmethode erprobt (Sinton et al. 1996). Zu 100 ml Abwasserprobe wurde Magnesiumchlorid-Lösung (Endkonzentration in der Probe: 0,5 mol/ l) zugegeben und die Probe eine Minute stehen gelassen. Filtriert wurde durch einen Membranfilter mit 0,45 µm Porengröße. Eine Wasserstrahlpumpe wurde so eingestellt, dass der Filtrationsvorgang für 100 ml 3 min dauerte. Der Filter wurde dann mit der Oberseite nach unten in eine sterile Glas-Petrischale (ϕ 5,5 cm) mit 2 ml Eluens gelegt. Das Eluens enthielt je 3 % Fleischextrakt und Tween<sup>®</sup> 80 (Merck 8.22187) und wurde auf einen pH-Wert von 9 eingestellt. Für F-spezifische Bakteriophagen wurde noch 0,75 mol/ l NaCl zugegeben. Nach 6 min Rotation der Petrischale bei 60 Umdrehungen/ min wurde der Filter an einer Pinzette befestigt, um ihn über der Petrischale abtropfen zu lassen (5 min). Es wurden die in DIN EN ISO 10705 (Teil 1 und 2) angegebenen Nährmedien und die in 2.2.5.1 beschriebenen Wirtsstämme verwendet. Nur der halb feste Topagar wurde entsprechend Sinton verändert: Topagar mit 0,3 % Tween 80 bzw. 1,67fach konzentrierter Topagar. Das Eluat (2 ml anstatt 1 ml Probe bei ISO-Methode) wurde zum höher konzentrierten Topagar gegeben, dann wurde weiter wie bei der ISO-Methode verfahren. Für die Filter wurden Platten mit Tween 80-haltigem Topagar vorbereitet, der mit 1 ml sterilem Leitungswasser (Ersatz für 1 ml Probe) gemischt wurde. Auf diese Platten wurden die Filter mit der Oberseite nach unten gelegt. Zur Auswertung wurden die Filter entfernt, die Platten gefärbt (somatische Coliphagen: mit 0,02 %iger Methylenblau-Lösung für 1 min; F-spezifische Bakteriophagen: mit 0,04 %iger Methylrot-Lösung (pH 5) für 1 min, dann mit 0,1 %iger Methylenblau-Lösung für 1 min) und mit destilliertem Wasser gewaschen. Bei den Eluat-Platten wurden nur solche, die F-spezifische Bakteriophagen enthielten, gefärbt (mit 0,1 %iger Methylenblau-Lösung). Platten mit somatischen Coliphagen konnten ungefärbt ausgezählt werden.

### 2.2.6 Nachweis von humanpathogenen Viren

Je 10 Liter unbestrahlter und UV-bestrahlter Kläranlagenablauf aus Bad Tölz wurden in sterilen Plastik-Transportbehältern an das Landesgesundheitsamt Stuttgart (Referat Wasserhygiene) geschickt. Dort wurden die Proben aufkonzentriert und mit Hilfe einer PCR-Methode auf Entero-, Noro-, Adeno- und Rotaviren untersucht. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von Entero- und Adenoviren auch mit Zellkulturen. Für Enteroviren wurde ein Plaque-Assay mit BGM-Zellen (Buffalo-Green-Monkey Kidney-Cells) und für Adenoviren ein MPN-Assay mit A549-Zellen (Humane Lungenkrebszellen) durchgeführt. Zellkulturüberstände aus dem MPN-Assay wurden außerdem erneut in die Adenovirus-PCR eingesetzt.

### 2.2.7 Nachweis von *Cryptosporidium* spp. und *Giardia* spp.

Für den Nachweis von Cryptosporidien und Giardien in UV-bestrahltem und unbestrahltem (vor und nach Sandfilter) Ablauf aus Bad Tölz wurden 50 bis 100 Liter benötigt. Diese Wassermengen wurden mit einer Prominent® Motordosierpumpe Vario (max. 63 l/h; 6,3 bar) jeweils durch einen Genera Filtra Max™-Pressschwammfilter gepumpt. Die Filter wurden zum Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen geschickt, wo sie auf Cryptosporidien-Oozysten und Giardien-Zysten nach der englischen Standardmethode (Drinking Water Inspectorate: *Cryptosporidium* – Legal Requirements and Standard Operating Protocols, Part 2 and 3; <http://www.dwi.uk/regs/crypto/legalindex.htm>) untersucht wurden.

## 2.3 Korrelation

Um zu untersuchen, ob die Konzentrationen verschiedener Mikroorganismen im unbestrahlten bzw. im UV-bestrahlten Ablauf miteinander korrelieren, wurden die Korrelationskoeffizienten bestimmt. Von einer signifikanten Korrelation wird ausgegangen, wenn die Zufallswahrscheinlichkeit  $p$  unter 5 % liegt ( $< 1$  %: hoch signifikant,  $< 0,1$  %: höchst signifikant). Die Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet, die  $p$ -Werte wurden einer Tabelle entnommen (Sachs 1993).

## 2.4 Bestimmung suspendierter Feststoffe

Welchen Einfluss der Gehalt an suspendierten Feststoffen im Kläranlagenablauf auf die UV-Desinfektion hat, wurde anhand Proben aus der Kläranlage Lenggries, die ohne Sandfilter vor der Desinfektionsstufe arbeitet, überprüft. Bestimmt wurden Gesamt- und Fäkalcoliforme,

Fäkale Streptokokken und Salmonellen zum einen in den Gesamtproben (vor und nach UV-Bestrahlung), zum anderen im Filtrat der Proben (vor und nach UV). Filtriert wurde durch Glasfaserfilter (Schleicher und Schüll GF92) der gleichen Art, wie sie auch für die Nachweis suspendierter Feststoffe verwendet wurden. Der Anteil partikelgebundener Bakterien ergab sich aus der Differenz zwischen den Ergebnissen für die Gesamtprobe und denen für das Filtrat. Die UV-Transmission wurde in 1 cm-Küvetten aus Quarzglas bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Die Bestimmung suspendierter Feststoffe erfolgte gemäß DIN EN 872 (DIN 2005). Für eine effektive UV-Desinfektion sollte der Gehalt an suspendierten Feststoffen im Kläranlagenablauf unter 5 mg/ l und die UV-Transmission bei über 65 % liegen (empfohlene Werte im bayerischen Förderprogramm für Abwasserdesinfektion, Schleypen & Grägel 2000).

## **2.5 Untersuchung von Flussproben**

Um festzustellen, ob eine erhöhte Belastung mit F-spezifischen RNA-Bakteriophagen (relativ UV-resistente Organismen, s. 3.3.4.1) nach Einleitung der Kläranlage Benediktbeuern-Bichl im Kernbach messbar ist, wurden diese Organismen im Bach vor der Anlage, im Kläranlagenablauf (ggf. vor und nach UV-Bestrahlung), im Bach ca. 200 m nach der Anlage und im Bach an der Einmündung in die Loisach (ca. 1,5 km unterhalb der Kläranlage) bestimmt (s. 2.2.5). Daneben wurden diese Proben auch auf Fäkalindikatorbakterien untersucht (s. 2.2.1). Diese Nachweise wurden sowohl außerhalb als auch in der Betriebszeit der UV-Anlage durchgeführt.

Proben aus der Würm wurden im Sommer 2005 auf Salmonellen (s. 2.2.2) und auf Fäkalindikatoren untersucht.

## **2.6 Versuche zur Wiederverkeimung**

Um eine eventuelle Wiederverkeimung von UV-bestrahltem Kläranlagenablauf durch bakterielle Reparatursysteme zu erfassen, wurden Versuche auf den Kläranlagen Schäftlarn und Starnberg durchgeführt (Vorversuche in Bad Tölz, nicht dargestellt). In Schäftlarn wurden zwei Plastikwannen mit je ca. 20 l UV-bestrahltem Ablauf gefüllt. Eine der Wannan wurde mit einer Holzplatte abgedeckt und in beiden Wannan wurde das Wasser jeweils mit Hilfe einer Kühlschlange und einem Umlaufkühler temperiert und mit einer Aquariumpumpe durchmischt. Die Wassertemperatur wurde viertelstündlich überprüft, bei einer Veränderung zur Ausgangstemperatur wurde der Umlaufkühler entsprechend umgestellt. Bis drei Stunden nach Versuchsbeginn wurden halbstündlich Proben entnommen und diese auf Gesamt- und

Fäkalcoliforme (Untersuchungsvolumina: 1 ml der  $10^{-2}$ -Verdünnung bis 100 ml unverdünnt, s. 2.2.1), fäkale Streptokokken (100 ml, s. 2.2.1) und Salmonellen untersucht (1000 ml, s. 2.2.2). In Starnberg war der Versuchsaufbau ähnlich, allerdings wurde mit drei Wannen gearbeitet. Jede der drei Wannen enthielt ca. 20 l Würmwasser, zwei der Wannen wurden zusätzlich mit je 5 l (UV-bestrahltem) Kläranlagenablauf befüllt. Damit sollte ungefähr das Mischungsverhältnis von Kläranlagenablauf und Würmwasser im Fluss bei Trockenwetter simuliert werden. Eine dieser beiden Wannen wurde abgedeckt. In Schäftlarn erfolgte die Probenahme für den desinfizierten Kläranlagenablauf direkt am Ablauf der UV-Anlage, in Starnberg am Rohrende vor Einleitung in die Würm.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vorversuche und Methodenverbesserung**

#### 3.1.1 Salmonellen

Aufgrund der großen Menge an Begleitflora in Abwasser war zunächst unklar, ob die Methode nach ISO/DIS 19250 für den Nachweis von Salmonellen in Kläranlagenabläufen geeignet ist. Daher wurden verschiedene Faktoren variiert (s. 2.2.2).

##### 3.1.1.1 ohne unspezifische Anreicherung

Beim ersten Versuch ohne Anreicherung in Peptonwasser (unspezifische Anreicherung) wurden 1, 10 und 100 ml UV-bestrahltes und unbestrahltes Abwasser aus Bad Tölz filtriert und die Filter direkt auf XLD-Agarplatten gelegt. Außer bei 1 ml des UV-bestrahlten Abwassers (keine Kolonien) waren überall hauptsächlich gelbe Kolonien gewachsen. Es gab auch schwarze Bereiche ( $H_2S$ -Produktion, typisch u.a. für Salmonellen) im Bakterienrasen, eine Zählung der verdächtigen Kolonien war aber aufgrund der großen Menge an Begleitflora (gelbe Kolonien) nicht möglich. Beim zweiten und dritten Versuch (1, 10 und 100 ml des Ablaufs vom Biofilter der Kläranlage Starnberg bzw. 1, 10, 100 ml des unbestrahlten und 10, 100 und 200 ml des bestrahlten Ablaufs aus Bad Tölz) wurden die Filter in RVS-Bouillon überführt und daraus nach Bebrütung XLD-Platten beimpft. Nach 48 h Bebrütung waren auf dem größten Teil der Platten keine Kolonien zu finden. Bei 1 und 100 ml unbestrahltem Abwasser waren alle Kolonien gelb, bei 10 ml waren auch einige schwarze darunter. Von den schwarzen Bereichen wurden Reinigungsausstriche (wieder auf XLD) durchgeführt. Bestätigungstests erfolgten hier noch nicht.

##### 3.1.1.2 mit unspezifischer Anreicherung

Bei den folgenden sechs Versuchen mit dem Kläranlagenablauf aus Bad Tölz wurden die Filter zur unspezifischen Anreicherung der Bakterien zunächst in gepuffertem Peptonwasser bebrütet. Einmal wurde auch parallel dazu zum Vergleich nur in RVS-Bouillon angereichert (Bebrütungszeiten s. 2.2.2). Filtriert wurden 1, 10 und 100 ml von unbestrahltem und 1 bis 500 ml von UV-bestrahltem Abwasser. Variiert wurde das Volumen, welches von der ersten Anreicherungskultur zur RVS-Bouillon gegeben wurde: 0,1 und 1 ml wurden meistens parallel überimpft.

Bei UV-bestrahltem Abwasser waren bis zu einem Volumen von 250 ml auf XLD-Platten nur gelbe oder keine Kolonien zu finden. Bei einem Volumen von 500 ml gab es zum Teil auch

schwarze Kolonien auf XLD bzw. rote auf Rambach-Agar. Mit Hilfe des Wellcolex-Latextests (s. 2.2.2) konnten diese Kolonien aber nicht als Salmonellen bestätigt werden.

Häufiger wurden schwarze Kolonien auf XLD (bzw. rote auf Rambach-Agar) aus den unbestrahlten Proben isoliert. Dabei schien die größere Menge Anreicherungskultur aus Peptonwasser (1 ml) die Anzahl an Salmonellen-verdächtigen Kolonien zu erhöhen. Allerdings konnte nur eine Kolonie (aus 1 ml unbestrahltem Abwasser) aus den sechs Versuchen mit Hilfe des Wellcolex-Kits bestätigt werden (grüne Agglutination auf rosa Hintergrund, d.h. Serogruppe D). Die dem Kit beigegefügte Positivkontrollen (rote, grüne und blaue Agglutination) und eine Suspension aus *Salmonella choleraesuis choleraesuis* Typhimurium DSM 5569<sup>T</sup> in NaCl (rote Agglutination auf türkischem Hintergrund, d.h. Serogruppe B) zeigten jedoch die erwarteten Reaktionen. Die mit Enterotubes (s. 2.2.2) getesteten Salmonellen-verdächtigen Kolonien (negativ mit Wellcolex) waren nach dem zugehörigen Bestimmungsschlüssel *Proteus mirabilis*-Kolonien.

Die Zugabe von Novobiocin zur RVS-Bouillon bzw. zu XLD-Agar führte zu keiner verbesserten Isolierung von verdächtigen Kolonien.

### 3.1.1.3 Vergleich zwischen den Isolierungsmethoden

In Tab. 1 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt, in dem verschiedene Methoden des Salmonellennachweises parallel durchgeführt wurden. Die Proben stammten aus der Kläranlage Schäftlarn: Ablauf (1, 10 und 100 ml: A 1, A 10, A 100) und Überstand einer Probe aus dem Belebtschlammbecken (nach 1 h Absetzen in der Probenahmeflasche; 1, 10 und 100 ml: S 1, S 10, S 100). Unterschieden wurde zunächst zwischen einem Nachweis ohne (Filter direkt in RVS-Bouillon) und mit Voranreicherung (Filter zunächst in Peptonwasser). Bei letzterer Methode sollte geklärt werden, ob die Zugabe von Novobiocin zur RVS-Bouillon bzw. zum XLD-Agar und die Variation des Volumens (0,1 und 1 ml) der zu RVS zugegebenen Voranreicherungskultur das Ergebnis beeinflussen.



Tab. 1: Vergleich verschiedener Methoden zur Salmonellen-Isolierung

N.: Novobiocin;

0,1 bzw. 1 ml: Volumen der zugegebenen Voranreicherungskultur zu 10 ml RVS-Bouillon

+: Salmonellen isoliert; -: keine Salmonellen isoliert

	ohne Voranreicherung	mit Voranreicherung							
		ohne Novobiocin in XLD				mit Novobiocin in XLD			
		ohne N. in RVS		mit N. in RVS		ohne N. in RVS		mit N. in RVS	
		0,1 ml	1 ml	0,1 ml	1 ml	0,1 ml	1 ml	0,1 ml	1 ml
A 1	-	-	-	+	-				
A 10	-	+	-	+	-				
A 100	+	+	+	+	+				
S 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 10	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S 100	+	+	+	+	-	+	-	+	-

Ohne Voranreicherung konnten nur aus 100 ml des Ablaufs und des Schlamm-Überstandes (A 100 und S 100) Salmonellen isoliert werden. Mit Voranreicherung war lediglich das Ergebnis für 1 ml Überstand (S 1) einheitlich negativ. Die Zugabe von Novobiocin zum Nährmedium scheint bei 1 ml des Ablaufs (A 1) den Salmonellen-Nachweis zu begünstigen, bei 10 und 100 ml Schlammüberstand (S 10, S 100) ist die Wirkung eher negativ. Durch die Zugabe von 0,1 ml statt 1 ml Voranreicherungskultur zur RVS-Bouillon wird dagegen allgemein eine eindeutige Verbesserung der Ergebnisse erzielt (vgl. A 1, A 10, S 10 und S 100).

#### 3.1.1.4 Bestätigung

Dass die Proben, die in Tab. 1 mit „+“ gekennzeichnet wurden, auch wirklich Salmonellen enthielten, wurde mit verschiedenen Methoden bestätigt. Zum einen wurden auf XLD-Agar farblose Kolonien mit schwarzem Zentrum auf Harnstoff-Agar überimpft. Harnstoff-Schrägagarröhrchen mit *Salmonella* spp.-Kolonien verfärbten sich nicht, solche mit *Proteus mirabilis*-Kolonien wurden pink. Bei einigen Kolonien wurde der Nachweis zusätzlich mit Enterotubes (A 1, A 100, S 10, S 100) und dem Wellcolex-Latextest (A 10, S 10, S 100) bestätigt. Die mit dem Latextest überprüften Salmonellen gehörten alle zur Serogruppe C (blaue Agglutination auf orangem Hintergrund).

### 3.1.2 *Clostridium perfringens*

Proben vom 02.07. (Ablauf Biofilter Starnberg) und vom 08.07.02 (Bad Tölz vor und nach UV-Anlage) wurden nach der in 2.2.4 beschriebenen Methode untersucht, wobei die Bebrütung im anaeroben Brutschrank erfolgte. Begast wurden die gewachsenen Kolonien, indem die geöffneten Platten neben ein Gefäß mit Ammoniaklösung gestellt und mit Alufolie abgedeckt wurden. Auszählbare Kolonien ergaben sich bei einer filtrierten Wassermenge von 10 und 100 ml (Starnberg), von 1 ml (unbestrahltes Abwasser Bad Tölz) und von 10, 100 und 200 ml (UV-bestrahltes Abwasser Bad Tölz). Vor der Begasung waren die Kolonien gelb bis grünlich, danach waren einige violett bis blau. Da *Clostridium perfringens*-Kolonien zwar anfangs gelb, aber nach der Begasung rot oder rosa sein sollen, konnte hier keine Quantifizierung durchgeführt werden.

### 3.1.3 Bakteriophagen

#### 3.1.3.1 Wirtskulturen und Referenzkontrollen

Als Wirtskultur für somatische Coliphagen (s. 2.2.5) wurde jeweils eine nach DIN EN ISO 10705-2 hergestellte Arbeitskultur verwendet. Vorversuche ergaben, dass die in der Norm angegebene optimale Zelldichte von ca.  $10^8$  KBE/ ml bei einer optischen Dichte (1 cm Schichtdicke bei 546 nm) zwischen 0,5 und 0,9 (entspricht ca.  $1,1$  bis  $2,5 \times 10^8$  KBE/ ml) erreicht wird. Für jeden Nachweis von somatischen Coliphagen wurde ca. 3 h vor Beginn des Versuches ein Kolben mit MSB-Bouillon (s. o. g. Normvorschrift) mit 0,5 ml aufgetauter Arbeitskultur beimpft und bei 37 °C bebrütet. Wenn eine optische Dichte von 0,5 bis 0,9 erreicht war, wurde der Kolben auf Eis gekühlt. Zum Testen der Nachweismethode und zur Herstellung einer Referenzkontrolle mit definierter Anzahl von PBE (Plaque bildenden Einheiten) wurde eine Phagenkultur von  $\phi$ X174 (DSM 4497 = ATCC 13706-B1) verwendet. Zur Phagenvermehrung wurde das in Anhang C der Norm angegebene Standardverfahren angewandt. Nach der Vermehrung wurden Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  hergestellt. Die  $10^{-6}$ -Verdünnung ergab auszählbare Plaques (25 und 32 PBE/ ml Phagensuspension) und wurde deshalb (nach Zugabe von 5 % Volumenanteil Glycerin) in 1,2 ml-Aliquots als Referenzkontrolle eingefroren.

Für F-spezifische RNA-Bakteriophagen wurden ebenfalls Arbeitskulturen aus der entsprechenden Stammkultur (s. 2.2.5) hergestellt. Hierbei wurde zur Kalibrierung der Trübungsmessungen ähnlich wie oben verfahren (s. DIN EN ISO 10705-1). Bei einer optischen Dichte zwischen 0,3 und 0,55 (546 nm) lag die Zelldichte im optimalen Bereich ( $1 \times 10^8$  bis  $2 \times 10^8$  KBE/ ml). Nach Herstellung neuer Arbeitskulturen wurde die Qualität des

Wirtsstammes nach der Norm überprüft. Die Phagenvermehrung (Anhang C) und die Herstellung einer Referenzkontrolle von MS2 (DSM 13767) erfolgten ebenfalls nach der Normvorschrift (Wirtsstamm bei der Phagenvermehrung: *E. coli* DSM 5210). 1 ml der  $10^{-11}$ -Verdünnung enthielt im Mittel 45 PBE.

### 3.1.3.2 Konzentrierung

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der zwei Versuche zur Überprüfung der Konzentrierungsmethode für Bakteriophagen (vgl. 2.2.5.2). Für die Konzentrierung wurde das angegebene Probenvolumen mit sterilem Leitungswasser auf 100 ml aufgefüllt, um eine Probe mit geringer Phagenanzahl zu simulieren. Zum Vergleich wurde das Standardverfahren angewendet, bei dem normalerweise 1 ml (verdünnte) Probe untersucht wird. Wurden nur 0,1 bzw. 0,5 ml Probe eingesetzt, wurden hierbei (entsprechend DIN EN ISO 10705) 0,9 bzw. 0,5 ml Verdünnungslösung (0,1 % Pepton; 0,85 % NaCl) zugegeben. Für den Nachweis von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen am 09.12.03 wurden 14-cm-Petrischalen verwendet. Somit war die Untersuchung von 5 ml-Proben möglich (s. Norm). Die Plaques von somatischen Coliphagen waren sowohl auf den Filter- als auch auf den Eluat-Platten gut zu erkennen (sogar ohne Färbung). Es ergaben sich Wiederfindungsraten zwischen 60 und 71 % im Vergleich zur Standardmethode ohne Konzentrierung. Für F-spezifische Bakteriophagen wurde einmal eine Wiederfindungsrate von 39 % erzielt. Ansonsten konnten Plaques auf den Eluat-Platten und z.T. auch auf den Filter-Platten trotz Färbung nicht eindeutig identifiziert werden und waren somit nicht auszählbar.

Tab. 2: Mittelwerte der Anzahl Plaques bildender Einheiten im untersuchten Probenvolumen und Wiederfindungsrate (Ergebnis der konzentrierten Probe bezogen auf das Resultat der nicht konzentrierten Probe) (a, b: Parallelproben; n.a.: nicht auszählbar)

		mit Konzentrierung			ohne Konzentrierung (Mittelwerte)	Wiederfindungsrate
		Eluat-Platten	Filter-Platten	Summe		
<b>Somatische Coliphagen</b>						
12.11.03 KA Bad Tölz; 0,1 ml Probe	a	53	20	<b>73</b>	<b>121</b>	60 %
	b	68	18	<b>86</b>	<b>121</b>	71 %
09.12.03 KA Starnberg; 1 ml Probe		10	24	<b>34</b>	<b>52</b>	65 %
<b>F-spezifische Bakteriophagen</b>						
12.11.03 KA Bad Tölz; 0,5 ml Probe		n.a.	n.a.		<b>79</b>	-
09.12.03 KA Starnberg; 10 ml Probe	a	n.a.	13		<b>103</b>	-
	b	19	21	<b>40</b>	<b>103</b>	39 %

### 3.2 Reduktion von Mikroorganismen während der Abwasserreinigung

Außerhalb der Betriebszeit der UV-Anlage wurden Proben aus verschiedenen Stufen der Kläranlage Starnberg auf ausgewählte Mikroorganismen untersucht. Wie *Clostridium perfringens*, Salmonellen, somatische Coliphagen und die Fäkalindikatorbakterien während der Abwasserreinigung (ohne UV-Bestrahlung) reduziert werden, zeigt Tab. 3.

Tab. 3: Anzahl von Mikroorganismen in den verschiedenen Reinigungsstufen der Kläranlage Starnberg  
 1: Ablauf nach mechanischer Reinigungsstufe GC: Gesamtcoliforme Bakterien  
 2: Ablauf des Nachklärbeckens FC: Fäkalcoliforme Bakterien  
 3: Ablauf des Biofilters FS: Fäkale Streptokokken  
 (E+0x entspricht 10<sup>x</sup>)

		GC MPN/ 100 ml	FC MPN/ 100 ml	FS KBE/ 100 ml	som. Coliph. PBE/ 100 ml	<i>C. perfringens</i> KBE/ 100 ml	Salmonellen MPN/ 100 ml
11.11.02	1	4,60E+07	2,40E+07	6,50E+05	3,50E+05	1,20E+05	9,00E+01
	2	2,30E+05	9,00E+04	2,50E+04	5,50E+03	8,80E+02	9,00E+00
	3	2,40E+05	2,40E+04	6,80E+03	7,70E+03	3,00E+02	9,30E+01
25.11.02	1	2,10E+07	1,50E+07	9,80E+05	1,70E+06	5,20E+04	1,50E+01
	2	2,40E+05	9,30E+04	5,70E+03	6,40E+03	1,20E+03	0,00E+00
	3	1,50E+04	4,30E+03	1,20E+03	2,60E+03	2,00E+02	0,00E+00
24.02.03	1	1,50E+07	9,30E+06	1,50E+06	7,70E+05	8,00E+04	2,30E+01
	2	1,50E+05	1,50E+04	5,50E+03	1,00E+04	1,20E+03	0,00E+00
	3	9,30E+03	4,30E+03	3,70E+03	8,90E+03	1,30E+02	0,00E+00
17.03.03	1	1,50E+07	4,30E+06	1,00E+06	7,40E+05	6,60E+04	> 1,10E+03
	2	1,50E+05	4,30E+04	1,40E+04	1,60E+04	1,20E+03	3,00E-01
	3	1,10E+05	1,10E+05	8,50E+03	1,30E+04	4,40E+02	9,30E+00

Fäkalindikatorbakterien, somatische Coliphagen und *C. perfringens* wurden im Belebungsbecken und im Biofilter insgesamt durchschnittlich um zwei bis drei Zehnerpotenzen verringert. Der Biofilter hat dabei meist nur einen geringen Anteil an der Reduktion, im Mittel ca. eine halbe Zehnerpotenz bei Gesamtcoliformen (GC), Fäkalcoliformen (FC), Fäkalen Streptokokken (FS) und *C. perfringens*. Die Konzentration somatischer Coliphagen verändert sich im Biofilter kaum. Für Salmonellen ergibt sich kein eindeutiges Bild. An zwei Probenahmeterminen wurden Salmonellen nur im Ablauf der mechanischen Reinigungsstufe gefunden, an den anderen beiden Terminen erhöhte sich nach einer Reduktion in der Belebungsstufe die Konzentration im Biofilter wieder.

### 3.3 Reduktion von Mikroorganismen in UV-Anlagen

#### 3.3.1 Reduktion der Fäkalindikatorbakterien

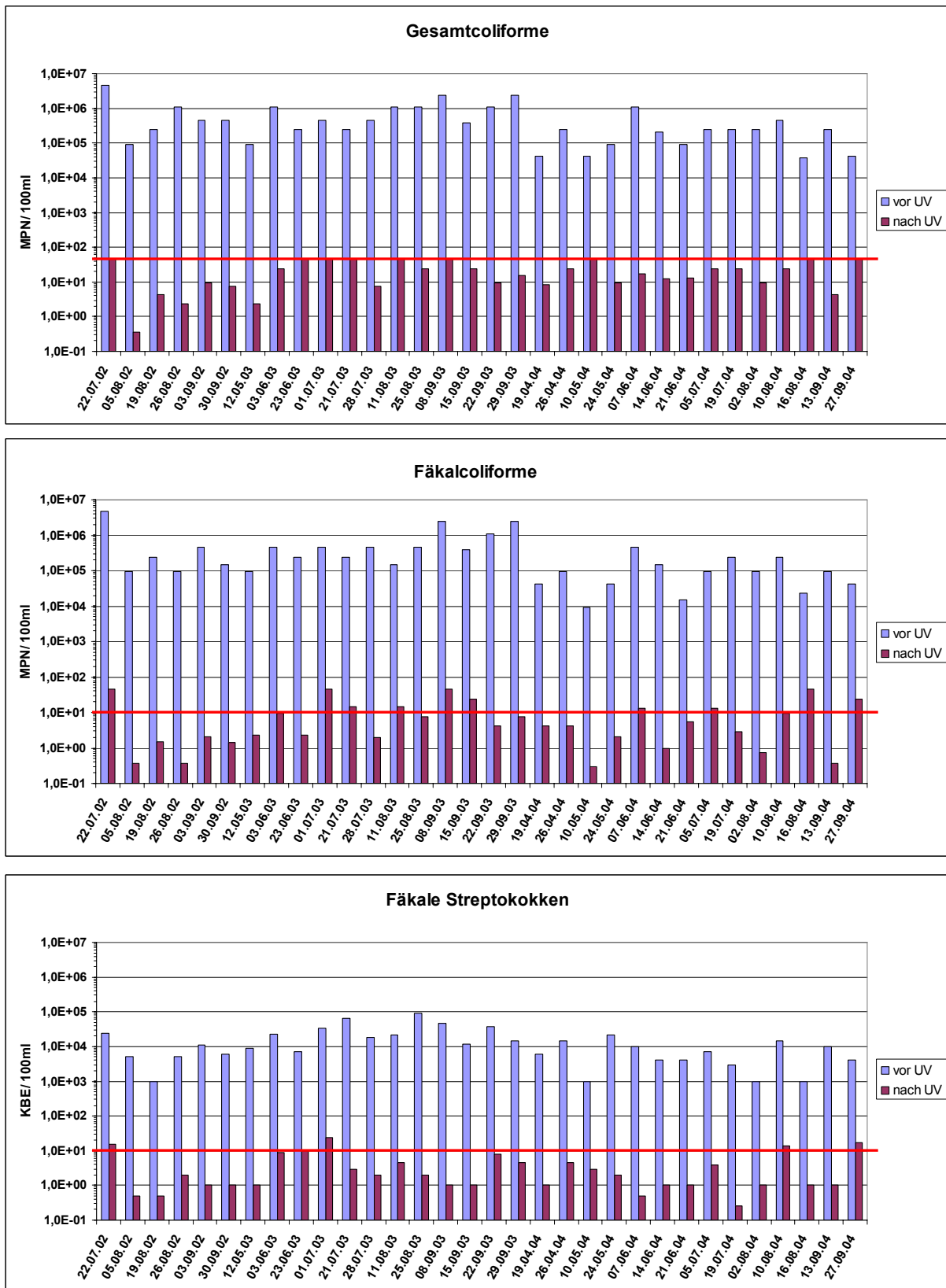


Abb. 2: Fäkalindikatorbakterien im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung (MPN: most probable number; KBE: Kolonie bildende Einheiten); rote Linie: Auflagewert

In Abb. 2 ist die Zahl der Gesamtcoliformen, der Fäkalcoliformen und der Fäkalstreptokokken in 100 ml Abwasser vor und nach UV-Bestrahlung (Anlage Bad Tölz) logarithmisch dargestellt (logarithmische Darstellung auch in Abb. 3 – 7). Der Nachweis erfolgte mit den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methoden.

Gesamtcoliforme Bakterien (Ausgangskonzentration: ca.  $10^5$ - $10^6$  MPN/ 100 ml) wurden in der UV-Anlage um  $4,3 \pm 0,7$  Zehnerpotenzen reduziert, was einer 100 %igen Einhaltung des Aufgabewertes (s. Einleitung) im Ablauf der UV-Anlage (50 MPN/ 100 ml, rote Linie in Abb. 2) entspricht. Obwohl die Fäkalcoliformen – ausgehend von  $10^4$ - $10^6$  MPN/ 100 ml – um  $4,6 \pm 0,7$  Zehnerpotenzen verringert wurden, wurde der Aufgabewert (10 MPN/ 100 ml) in 10 von 32 Fällen überschritten. Aufgrund der etwas geringeren Ausgangskonzentration ( $10^3$ - $10^4$  KBE/ 100 ml) genügte bei fäkalen Streptokokken eine Reduktion um  $3,6 \pm 0,6$  Zehnerpotenzen, um den Aufgabewert (10 KBE/ 100 ml) an fast 90 % der Probenahmeterminen einzuhalten.

### 3.3.2 Reduktion nicht-sporebildender Bakterien

#### 3.3.2.1 Salmonellen

Nach den Vorversuchen zur Methodenverbesserung (s. 3.1.1) wurde für den Salmonellennachweis in Proben aus der UV-Anlage Bad Tölz mit ISO/DIS 19250 gearbeitet. Salmonellen-verdächtige Kolonien wurden mit den in 2.2.2 beschriebenen Methoden bestätigt. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse.

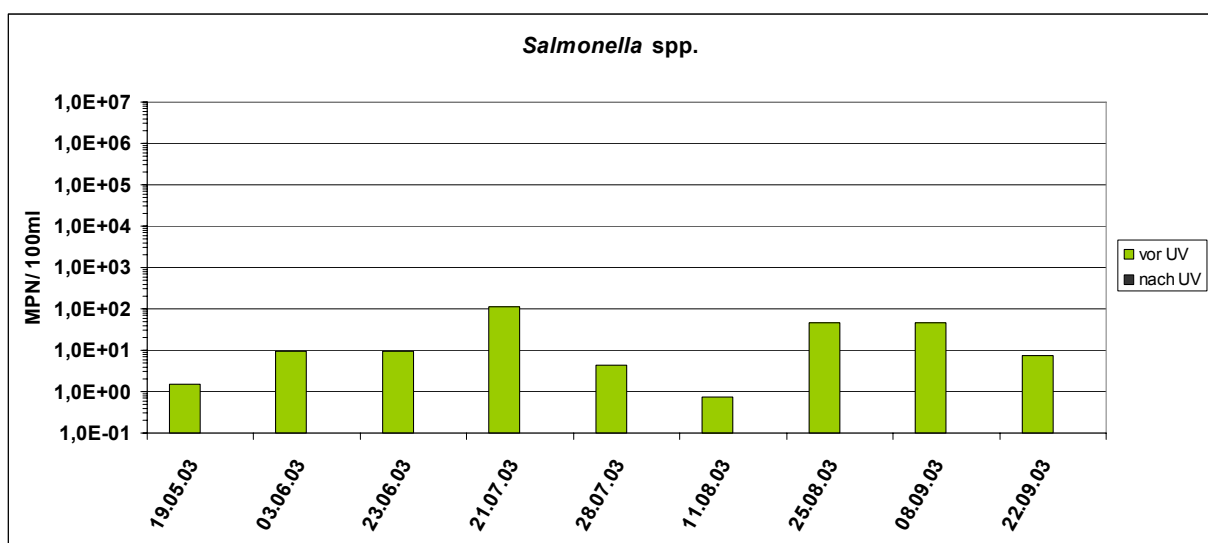


Abb. 3: *Salmonella* spp. im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

Im Zulauf der UV-Anlage wurden an allen neun Probenahmeterminen Salmonellen gefunden (Konzentration bis 110 MPN/ 100 ml). Dagegen wurden in den Ablaufproben niemals Salmonellen nachgewiesen, obwohl jeweils 1000 ml untersucht wurden.

### 3.3.2.2 *Campylobacter* spp.

In Vorversuchen (Ergebnisse nicht dargestellt) erwies sich eine MPN-Methode, die sich an ISO/DIS 17995 anlehnt (s. 2.2.3), als geeignet für Kläranlagenablauf-Proben. Auch für *Campylobacter* spp. wurden meist Proben aus der Kläranlage Bad Tölz untersucht (s. Abb. 4).

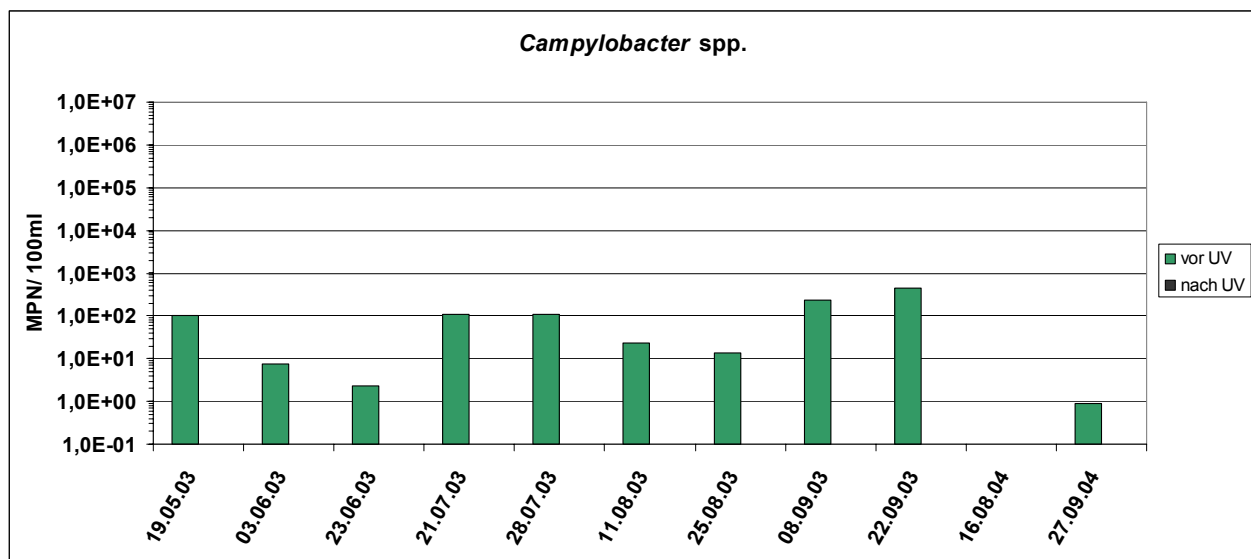


Abb. 4: *Campylobacter* spp. im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

Vor UV-Bestrahlung waren im Kläranlagenablauf 0 bis 460 MPN/ 100 ml präsumtive *Campylobacter* spp. vorhanden, nach UV-Bestrahlung konnten in einem Liter Probe keine *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Reduktion von *Clostridium perfringens*

Nach Umstellung der Methodik zur Ammoniakbedampfung (s. 2.2.4) traten beim *C. perfringens*-Nachweis keine weiteren Probleme auf. In den folgenden Abbildungen (4 und 5) setzen sich die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) aus Sporen und vegetativen Zellen zusammen, d.h. die Wasserproben wurden nicht erhitzt (s. 2.2.4). In der UV-Anlage Bad Tölz wurde *C. perfringens* (Ausgangskonzentration: ca.  $10^2$ - $10^3$  KBE/ 100 ml) nur um knapp eine ( $0,8 \pm 0,3$ ) Zehnerpotenz reduziert (s. Abb. 5).



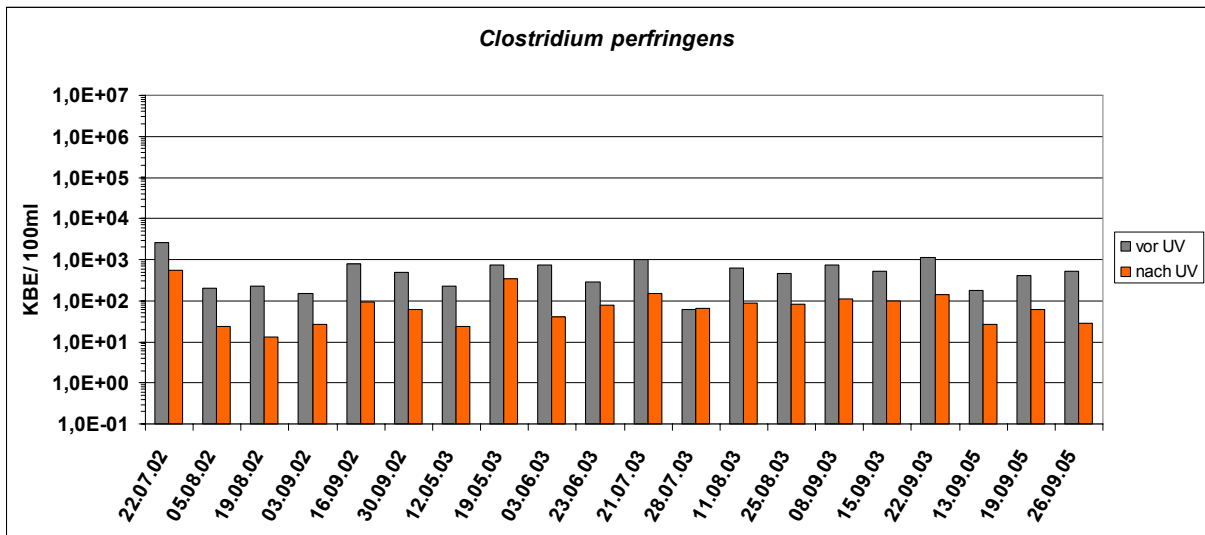


Abb. 5: *Clostridium perfringens* im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

Auch für die UV-Anlagen Benediktbeuern-Bichl, Schäftlarn und Starnberg ergaben sich für *C. perfringens* Reduktionsleistungen von ca. einer Zehnerpotenz (s. Abb. 6).

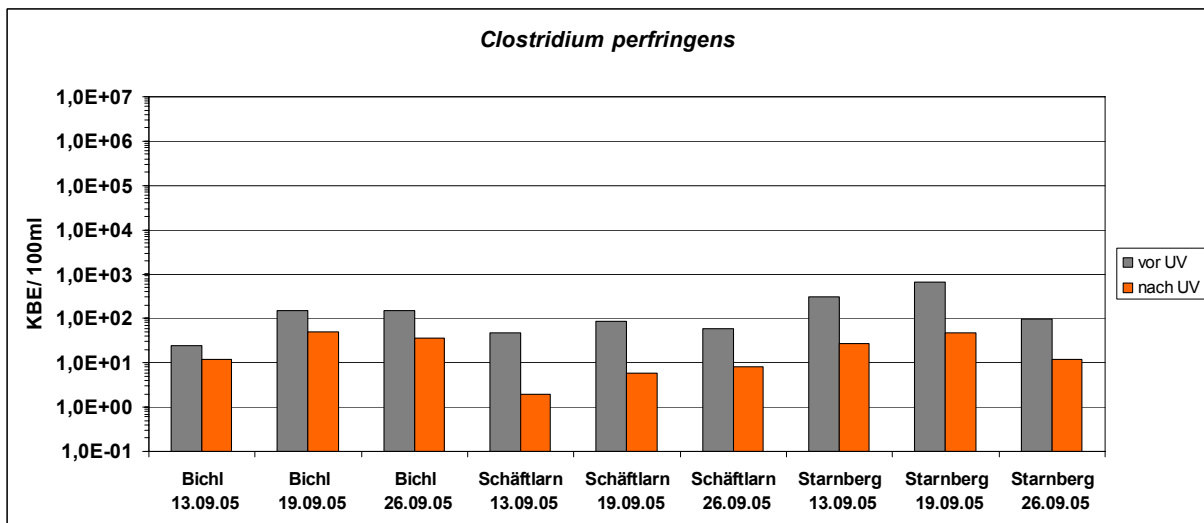


Abb. 6: *Clostridium perfringens* im Ablauf der Kläranlagen Benediktbeuern-Bichl, Schäftlarn und Starnberg vor und nach UV-Bestrahlung

Bei zwei Untersuchungen wurde zusätzlich durch Erhitzung einer Fraktion der Wasserproben (vgl. 2.2.4) auch die Sporenzahl bestimmt. Die Ergebnisse lagen etwa in der gleichen Größenordnung wie die Ergebnisse für Sporen und vegetative Zellen zusammen (s. Tab. 4).

Tab. 4: *C. perfringens* (veg. Zellen + Sporen) im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

		<b>Sporen + vegetative Zellen</b> [KBE/ 100 ml]	<b>Sporen</b> [KBE/ 100 ml]
03.09.02	vor UV	145	190
	nach UV	26	8
15.09.03	vor UV	530	470
	nach UV	100	60

### 3.3.4 Reduktion von Bakteriophagen

#### 3.3.4.1 F-spezifische RNA-Bakteriophagen

Die Anzahl F-spezifischer RNA-Bakteriophagen (Ausgangskonzentration: ca.  $10^3$ - $10^4$  PBE/ 100 ml) verringerte sich in der Kläranlage Bad Tölz durch UV-Bestrahlung um  $2,1 \pm 0,5$  Zehnerpotenzen (s. Abb. 7). Sowohl bei F-spezifischen RNA-Bakteriophagen als auch bei somatischen Coliphagen (s.u.) wurde neben dem Standardverfahren für unbestrahlte Proben auch für die Untersuchung UV-bestrahlter Proben DIN EN ISO 10705 (Verfahren für Proben mit geringer Phagenzahl, vgl. 2.2.5.1) herangezogen, nachdem sich die erprobte Konzentrierungsmethode als nicht effektiv erwiesen hatte (s. 3.1.3.2).

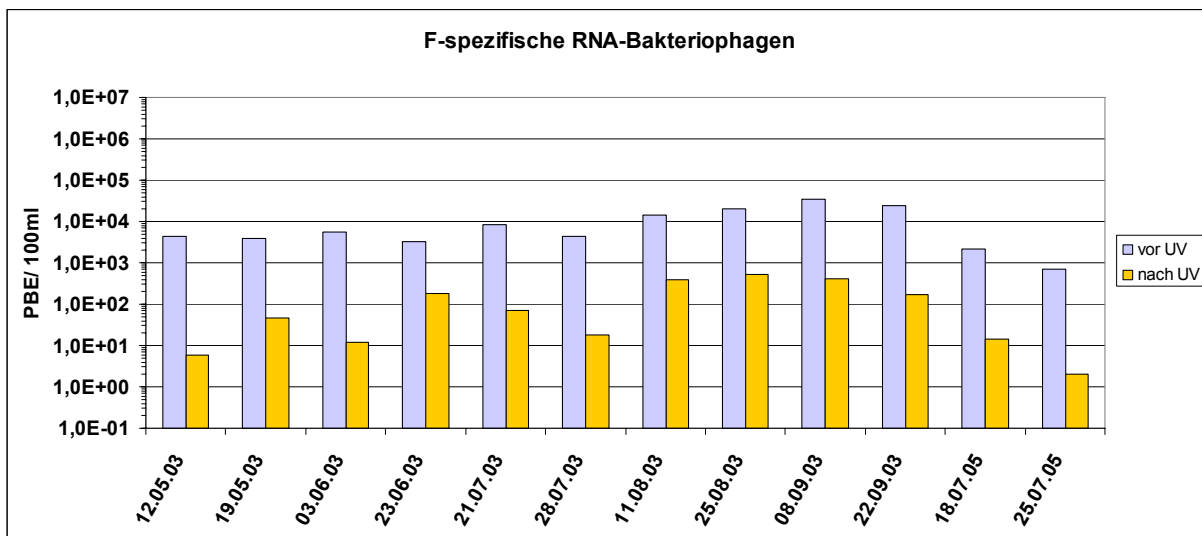


Abb. 7: F-spezifische RNA-Bakteriophagen im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

### 3.3.4.2 Somatische Coliphagen

An 9 von 14 Probenahmetagen wurden in den UV-bestrahlten Proben keine somatischen Coliphagen in 100 ml gefunden. Der Maximalwert lag bei 12 PBE/ 100 ml nach UV-Bestrahlung (s. Abb. 8). Da die Ausgangskonzentration stets zwischen  $10^4$  und  $10^5$  PBE/ 100 ml betrug, ergibt sich eine Reduktionsleistung von mindestens 4,5 Zehnerpotenzen.

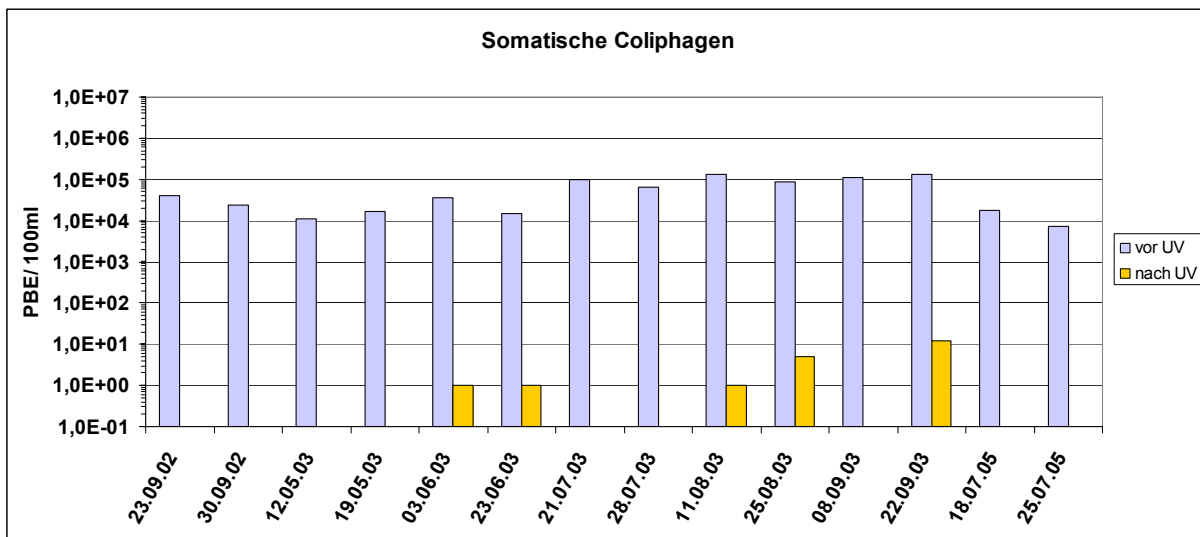


Abb. 8: somatische Coliphagen im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

### 3.3.5 Reduktion von humanpathogenen Viren

#### 3.3.5.1 PCR-Nachweis

Tabelle 5 zeigt, in welchen Proben aus dem Kläranlagenablauf Bad Tölz Viren-RNA bzw. -DNA mit Hilfe der PCR entdeckt wurde. Nach Angaben des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg, das diese Untersuchung durchführte, kann man bei einer positiven PCR rein rechnerisch von etwa 10 bis 20 Viruspartikeln in einem Liter Probe ausgehen. Weder Enteroviren- noch Noroviren-RNA wurde an einem der fünf Probenahmetage gefunden. Rotaviren-RNA wurde an einem Termin nachgewiesen – dann allerdings sowohl vor als auch nach UV-Bestrahlung. Für Adenoviren-DNA war die PCR bei vier für die unbestrahlte und bei drei Probenahmen für die UV-bestrahlte Probe positiv.

An allen fünf Probenahmeterminen wurden die Aufgabewerte für Fäkalindikatorbakterien sicher eingehalten (nicht dargestellt).

Tab. 5: PCR-Ergebnisse für humanpathogene Viren im Kläranlagenablauf Bad Tölz vor und nach UV-Bestrahlung

		<b>Enteroviren</b>	<b>Noroviren</b>	<b>Rotaviren</b>	<b>Adenoviren</b>
20.06.05	vor UV	-	-	+	+
	nach UV	-	-	+	+
04.07.05	vor UV	-	-	-	+
	nach UV	-	-	-	-
11.07.05	vor UV	-	-	-	+
	nach UV	-	-	-	+
18.07.05	vor UV	-	-	-	+
	nach UV	-	-	-	+
25.07.05	vor UV	-	-	-	-
	nach UV	-	-	-	-

### 3.3.5.2 Nachweis mit Hilfe von Zellkulturen

Der Plaque-Assay in BGM-Zellen für Enteroviren verlief durchweg negativ. Diese Ergebnisse decken sich mit den fehlenden Nachweisen in der direkten Enterovirus-PCR.

Der MPN-Assay für Adenoviren in A549-Zellen zeigte zwar Veränderungen in der Zellkultur, diese waren jedoch nicht eindeutig als cytopathische Effekte bzw. toxische Effekte abgrenzbar. Aus diesem Grund wurden die verdächtig erscheinenden Proben erneut in die Adenovirus-PCR eingesetzt. Die zweite Adenovirus-PCR aus Zellkulturüberständen zeigte nur in einer Probe (18.07. nach UV-Bestrahlung) ein positives Ergebnis, d.h. nur in diesem Fall waren die isolierten Viren eindeutig infektiös.

### 3.3.6 Reduktion von parasitischen Protozoen

Die parasitischen Protozoen *Cryptosporidien* und *Giardien* lagen schon vor UV-Bestrahlung in der Kläranlage Bad Tölz in einer Konzentration von unter 10 Oozysten bzw. Zysten pro Liter vor (s. Tab. 6). In der UV-Anlage kam es – außer an je einem Probenahmetermin (22.09.03 bzw. 26.08.02) – trotzdem zu einer weiteren Reduzierung. An jeweils zwei von sieben Terminen wurden keine Oozysten bzw. Zysten vor und nach UV-Bestrahlung nachgewiesen. Im Untersuchungsjahr 2003 wurden zusätzlich Ablaufproben vor dem Sandfilter genommen. Die je vier Ergebnisse zeigen eine deutliche Verringerung der Parasiten schon im Sandfilter.

Tab. 6: *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten im Ablauf der Kläranlage Bad Tölz vor Sandfilter, vor UV-Bestrahlung (=nach Sandfilter) und nach UV-Bestrahlung

<b><i>Cryptosporidium spp.</i></b>			
	vor Sandfilter (Oozysten/ l)	vor UV (Oozysten/ l)	nach UV (Oozysten/ l)
26.08.02		0	0
16.09.02		9,6	1,0
23.09.02		0,81	0,36
01.07.03	1,4	0	0
21.07.03	60	6,8	0,71
22.09.03	8,2	0,51	1,5
29.09.03	8,6	0,81	0,31
<b><i>Giardia spp.</i></b>			
	vor Sandfilter (Zysten/ l)	vor UV (Zysten/ l)	nach UV (Zysten/ l)
26.08.02		1,8	5,2
16.09.02		6,7	1,6
23.09.03		4,3	1,6
01.07.03	3,1	0	0
21.07.03	54	1,6	0,29
22.09.03	1,1	0	0
29.09.03	1,2	0,25	0,18

### 3.4 Korrelationsergebnisse

Im nicht bestrahlten Ablauf der Anlage Bad Tölz korrelierten die Konzentrationen Gesamtcoliformer (GC) und Fäkalcoliformer (FC) natürlich miteinander und daneben mit den Konzentrationen von *Clostridium perfringens* (C. p.) und F-spezifischen RNA-Bakteriophagen (F-sp. B.) höchst signifikant ( $p < 0,1 \%$ ; s. Tab. 7). Bei den Fäkalindikatoren wurden neben den in Abb. 2 dargestellten Ergebnissen auch noch einige weitere bei den Berechnungen berücksichtigt. Eine signifikante Korrelation ( $p < 5 \%$ ) ergab sich für Gesamtcoliforme mit Fäkalen Streptokokken (FS) und somatischen Coliphagen (som. C.) und für Fäkalcoliforme mit *Campylobacter* spp. (Camp.). Neben Gesamtcoliformen korrelieren FS signifikant sowohl mit Salmonellen (Salm.) als auch mit F-sp. B. und som. C.. Schließlich ist noch eine hoch signifikante ( $p < 1 \%$ ) Korrelation zwischen den beiden Bakteriophagen-Gruppen erkennbar.

Tab.7: Zufallswahrscheinlichkeiten p der Korrelation zwischen der Anzahl verschiedener Mikroorganismen im nicht UV-bestrahlten Ablauf der Kläranlage Bad Tölz (n: Zahl der verglichenen Ergebnisse)  
rot: höchst signifikant ( $p < 0,001$ ); grün: hoch signifikant ( $p < 0,01$ ); blau: signifikant ( $p < 0,05$ )

	GC	FC	FS	Salm.	Camp.	C. p.	F-sp. B.	som. C.
GC		p<0,001 n=37	p<0,05 n=37	p>0,05 n=8	p>0,05 n=10	p<0,001 n=18	p<0,001 n=11	p<0,05 n=12
FC	p<0,001 n=37		p>0,05 n=37	p>0,05 n=8	p<0,05 n=10	p<0,001 n=18	p<0,001 n=11	p>0,05 n=12
FS	p<0,05 n=37	p>0,05 n=37		p<0,05 n=8	p>0,05 n=10	p>0,05 n=18	p<0,05; n=11	p<0,05; n=12
Salm.	p>0,05 n=8	p>0,05 n=8	p<0,05 n=8		p>0,05 n=9	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9
Camp.	p>0,05 n=10	p<0,05 n=10	p>0,05 n=10	p>0,05 n=9		p>0,05 n=9	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9
C. p.	p<0,001 n=18	p<0,001 n=18	p>0,05 n=18	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9		p>0,05 n=10	p>0,05 n=11
F-sp. B.	p<0,001 n=11	p<0,001 n=11	p<0,05; n=11	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9	p>0,05 n=10		p<0,01 n=12
som. C.	p<0,05 n=12	p>0,05 n=12	p<0,05; n=12	p>0,05 n=9	p>0,05 n=9	p>0,05 n=11	p<0,01 n=12	

Wie im nicht bestrahlten Ablauf korrelieren auch im UV-bestrahlten Ablauf GC und FC miteinander und FC mit C. p. höchst signifikant. Zwischen GC und C. p. ist die Korrelation nur mehr signifikant. Allerdings ergab sich eine höchst signifikante Korrelation von FS mit GC, FC und C. p. (s. Tab. 8). Für Camp. und Salm. konnten keine Korrelationen berechnet werden, da diese beiden Gattungen in UV-bestrahlten Abläufen nicht nachgewiesen wurden.

Tab. 8: Zufallswahrscheinlichkeiten p der Korrelation zwischen der Anzahl verschiedener Mikroorganismen im UV-bestrahlten Ablauf der Kläranlage Bad Tölz

	GC	FC	FS	Salm.	Camp.	C. p.	F-sp. B.	som. C.
GC		p<0,001 n=37	p<0,001 n=37			p<0,05 n=18	p>0,05 n=11	p>0,05 n=12
FC	p<0,001 n=37		p<0,001 n=37			p<0,001 n=18	p>0,05 n=11	p>0,05 n=12
FS	p<0,001 n=37	p<0,001 n=37				p<0,001 n=18	p>0,05 n=11	p>0,05 n=12
Salm.								
Camp.								
C. p.	p<0,05 n=18	p<0,001 n=18	p<0,001 n=18				p>0,05 n=10	p>0,05 n=11
F-sp. B.	p>0,05 n=11	p>0,05 n=11	p>0,05 n=11			p>0,05 n=10		p>0,05 n=12
som. C.	p>0,05 n=12	p>0,05 n=12	p>0,05 n=12			p>0,05 n=11	p>0,05 n=12	

### 3.5 Suspendierte Feststoffe und UV-Desinfektion

Bei den Untersuchungen am 19.07.04 lag der Gehalt an suspendierten Feststoffen (s. 2.4) im Ablauf der Kläranlage Lenggries nur bei ca. 2 mg/ l, die UV-Transmission (Wellenlänge: 254 nm) bei fast 70 % (s. Tab. 9). Die Auflagewerte (vgl. 3.3.1) für die UV-Anlage wurden in der Gesamtprobe eingehalten, in der filtrierte Probe („Filtrat“) kam es bei FC zu einer Überschreitung. Die Werte für alle drei Fäkalindikatorgruppen (nach UV) waren im Filtrat höher als in der Gesamtprobe, so dass sich rechnerisch negative Werte für die partikelgebundenen Bakterien ergeben. An den beiden ersten Probenahmeterminen lagen zwar zwei Einzelergebnisse für suspendierte Feststoffe knapp über dem empfohlenen Wert von 5 mg/ l (s. 2.4), nimmt man aber jeweils den Mittelwert von vor UV und nach UV, wäre die Vorgabe eingehalten. Am 05.07. wurde eine UV-Transmission von knapp unter und am 13.07. über 65 % (empfohlener Wert, s. 2.4) gemessen. Die Ergebnisse für partikelgebundene und für in der Wasserphase vorliegende Bakterien (bei allen drei Fäkalindikatorgruppen) waren recht ähnlich, allerdings ist die Auflagewert-Überschreitung am 13.07. wohl ausschließlich auf partikelgebundene Fäkale Streptokokken zurückzuführen. Am 02.08. war sowohl der Gehalt an suspendierten Feststoffen zu hoch als auch die UV-Transmission zu niedrig. Die Auflagewerte wurden für GC, FC und FS nicht eingehalten. Dafür waren wiederum die partikelgebundenen Bakterien ausschlaggebend.

Salmonellen wurden an allen vier Probenahmeterminen nach UV in einem Liter und am 19.07. vor UV in 100 ml Ablauf nicht gefunden. Am 05.07., 13.07. und am 02.08. war vor UV-Bestrahlung der größte Teil der Salmonellen partikelgebunden.

Erwartungsgemäß waren die im Filtrat gemessenen UV-Transmissionswerte jeweils deutlich höher als die Werte in der Gesamtprobe.



Tab. 9: Suspendierte Feststoffe, UV-Transmission bei 254 nm, Gesamt- und Fäkalcoliforme Bakterien, Fäkale Streptokokken und Salmonellen im Ablauf der Kläranlage Lengries (Gesamtprobe und Filtrat) vor und nach UV-Bestrahlung (MW: Mittelwert; gelb: Überschreitung der Aufgabewerte; türkis: Nichteinhaltung der empfohlenen Werte (s. 2.4) für suspendierte Feststoffe und UV-Transmission)

		susp. Festst. [mg/ l]	Trans-mission [%]	GC [MPN/ 100 ml]	FC [MPN/ 100 ml]	FS [KBE/ 100 ml]	Salm. [MPN/ 100 ml]
<b>05.07.04</b>	<b>vor UV</b>						
	Gesamtprobe	5,2	63,8	4,6E+05	4,3E+04	4,4E+03	3,6E-01
	Filtrat		68,9	2,1E+05	2,0E+04	1,8E+03	0
	Partikelgebunden			2,5E+05	2,3E+04	2,6E+03	3,6E-01
	<b>nach UV</b>						
	Gesamtprobe	4,0	62,9	4,3E+00	4,3E+00	3,0E+00	0 in 1 l
	Filtrat		70,5	4,3E+00	0	0	0 in 1 l
	Partikelgebunden			0	4,3E+00	3,0E+00	0 in 1 l
	Gesamtprobe MW	4,6	63,4				
<b>13.07.04</b>	<b>vor UV</b>						
	Gesamtprobe	5,3	66,4	9,3E+04	9,3E+04	9,5E+03	9,0E-01
	Filtrat		71,1	4,6E+05	2,3E+04	3,2E+03	3,6E-01
	Partikelgebunden			(-3,7E+05)	7,0E+04	6,3E+03	5,4E-01
	<b>nach UV</b>						
	Gesamtprobe	3,3	n. b.	9,3E+00	4,3E+00	2,6E+01	0 in 1 l
	Filtrat		71,8	4,6E+01	9,3E+00	0	0 in 1 l
	Partikelgebunden			(-3,7E+01)	(-5,0E+00)	2,6E+01	0 in 1 l
	Gesamtprobe MW	4,3					
<b>19.07.04</b>	<b>vor UV</b>						
	Gesamtprobe	1,6	69,4	4,6E+05	9,3E+04	4,1E+03	0
	Filtrat		72,9	3,6E+03	3,6E+03	6,0E+02	0
	Partikelgebunden			4,6E+05	8,9E+04	3,5E+03	0
	<b>nach UV</b>						
	Gesamtprobe	2,0	69,7	2,4E+01	4,3E+00	0	0 in 1 l
	Filtrat		72,9	4,6E+01	4,6E+01	1,0E+00	0 in 1 l
	Partikelgebunden			(-2,2E+01)	(-4,2E+01)	(-1,0E+00)	0 in 1 l
	Gesamtprobe MW	1,8	69,6				
<b>02.08.04</b>	<b>vor UV</b>						
	Gesamtprobe	6,0	61,9	1,5E+05	9,3E+04	1,1E+04	9,3E+00
	Filtrat		68,9	9,3E+04	4,3E+04	1,0E+03	3,6E-01
	Partikelgebunden			5,7E+04	5,0E+04	1,0E+04	8,9E+00
	<b>nach UV</b>						
	Gesamtprobe	6,8	61,6	1,1E+02	1,1E+02	3,0E+01	0 in 1 l
	Filtrat		67,7	1,5E+01	9,3E+00	0	0 in 1 l
	Partikelgebunden			9,5E+01	1,0E+02	3,0E+01	0 in 1 l
	Gesamtprobe MW	6,4	61,8				

### 3.6 Nachweis bestimmter Mikroorganismen in Flussproben

#### 3.6.1. F-spezifische RNA-Bakteriophagen im Kernbach

Außerhalb der Betriebszeit der UV-Anlage wurden Proben aus dem Kernbach entnommen: vor Einleitung der Kläranlage (vor KA) und an zwei Stellen in unterschiedlicher Entfernung von der Kläranlageneinleitung (nach KA I und II, s. 2.5). Außerdem wurde der Kläranlagenablauf (KA-Ablauf) untersucht. Die Konzentrationen Gesamtcoliformer (nicht dargestellt), Fäkalcoliformer, Fäkaler Streptokokken (nicht dargestellt) und F-spezifischer RNA-Bakteriophagen wurden bestimmt. In Tab. 10 und 11 bedeuten rote Zahlen, dass der Grenzwert der EG-Badegewässer-Richtlinie für FC überschritten ist, grün bedeutet eine Überschreitung des Leitwerts und blau die Einhaltung von Leit- und Grenzwert (schwarz: nicht einteilbar). Vor der Kläranlage Benediktbeuern-Bichl wurden im Winter (s. Tab. 10) in der Hälfte der untersuchten Proben Leit- und Grenzwert für FC eingehalten, in der anderen Hälfte immerhin die Leitwerte. Wie zu erwarten war, wurde der Grenzwert im Kläranlagenablauf immer überschritten. Bis zur zweiten Probenahmestelle nach Einleitung der Kläranlage nahm die Belastung mit FC im Kernbach zwar etwas ab, aber nur am 19.01. und am 26.01.04 wurde der Grenzwert an der Stelle „nach KA II“ eingehalten. Parallel dazu wurden an diesen beiden Tagen auch die geringsten Konzentrationen von F-sp. RNA-Bakteriophagen an dieser Stelle gemessen.

Tab. 10: F-spezif. RNA-Bakteriophagen und Fäkalcoliforme im Kernbach und im Ablauf der Kläranlage Benediktbeuern-Bichl außerhalb der Betriebszeit der UV-Anlage (KA: Kläranlage)

	13.01.04	19.01.04	26.01.04	01.02.04	09.02.04	16.02.04	31.01.05	22.03.05	29.03.05	05.04.05
<b>F-spezifische RNA-Bakteriophagen (PBE/ 100ml)</b>										
vor KA	5,6E+00	0	0	1,3E+02	1,9E+00	8,0E-01	2,0E+01	3,5E+00	3,6E+01	3,6E+01
KA-Ablauf	1,7E+04	9,3E+03	8,3E+03	1,7E+05	4,0E+04	1,7E+04	2,6E+04	1,2E+04	8,7E+04	1,7E+05
nach KA I	9,0E+03	1,7E+03	3,8E+02	6,8E+04	1,1E+04	3,0E+03	1,7E+04	1,5E+03	1,8E+04	2,9E+04
nach KA II	5,8E+02	1,1E+02	1,8E+02	5,7E+03	8,5E+02	7,1E+02	5,9E+02	3,4E+02	2,1E+03	4,6E+03
<b>Fäkalcoliforme (MPN/ 100ml)</b>										
vor KA	9,0E+01	2,3E+01	9,0E+00	9,3E+02	2,1E+01	0	4,6E+02	4,3E+02	4,3E+02	2,4E+02
KA-Ablauf	2,4E+04	2,4E+04	1,5E+04	4,6E+05	7,5E+04	4,3E+04	9,3E+04	2,1E+05	1,1E+07	1,5E+06
nach KA I	1,1E+05	2,3E+03	4,3E+02	1,1E+05	2,4E+04	2,3E+03	4,6E+05	9,3E+04	7,5E+04	2,4E+05
nach KA II	2,4E+03	2,3E+02	2,4E+02	1,1E+04	4,3E+03	2,4E+03	2,4E+04	2,4E+04	4,6E+04	1,5E+04

In der Betriebszeit der UV-Anlage wurden ebenfalls Proben aus dem Kernbach (s. o.) entnommen, zusätzlich Proben aus dem Zulauf (vor UV) und dem Ablauf (nach UV) der UV-Anlage in Benediktbeuern-Bichl (s. Tab. 11). Im Kernbach vor der Kläranlage wurden Leit- und Grenzwert für FC bei vier von sieben Probenahmen eingehalten, an zwei Terminen wurde der Leitwert überschritten und an einem Regentag (11.07.05) sogar der Grenzwert. Die Auflagewerte der UV-Anlage für FC (10 MPN/ 100 ml) wurden immer eingehalten (Probe: „nach UV“). In der Kläranlage Bichl entspricht der Ablauf der UV-Anlage auch dem Gesamtablauf der Kläranlage, da auf den wenigen Metern zwischen dem Schacht (Probenahmestelle) und dem Kernbach keine Einleitungen mehr dazukommen können. Die Einleitung des UV-bestrahlten Ablaufs in den Kernbach führt sogar zu einer Verbesserung der Werte an der Probenahmestelle „nach KA I“ im Vergleich zur Stelle „vor KA“: Leit- und Grenzwert werden fünfmal eingehalten, zweimal wird der Leitwert überschritten. Auf der Fließstrecke bis „nach KA II“ kommt es aber wieder zu einer Verschlechterung (fünf Leitwertüberschreitungen). F-spezifische RNA-Bakteriophagen werden durch UV-Strahlung nicht so effektiv abgetötet wie Fäkalindikatorbakterien (vgl. 3.3.4.1). Dies führt dazu, dass an der Probenahmestelle „nach KA I“ die Konzentrationen der Bakteriophagen um ca. eine Zehnerpotenz höher liegen als vor der Kläranlage. Zwischen „nach KA I“ und „nach KA II“ kam es meist zu keiner großen Veränderung mehr.

Tab. 11: F-spezif. RNA-Bakteriophagen und Fäkalcoliforme im Kernbach und im Ablauf der Kläranlage Benediktbeuern-Bichl in der Betriebszeit der UV-Anlage (KA: Kläranlage)

	20.09.04	27.09.04	29.09.04	11.07.05	18.07.05	25.07.05	30.08.05
<b>F-spezifische RNA-Bakteriophagen (PBE/ 100ml)</b>							
vor KA	8,2E+01	1,6E+00	2,2E+00	3,8E+01	3,9E+00	1,5E+01	< 2,0E+00
vor UV	3,5E+04	1,2E+04	4,0E+04	1,9E+04	1,0E+05	6,4E+04	1,7E+04
nach UV	8,4E+01	2,6E+01	1,8E+01	2,9E+02	2,6E+02	7,3E+01	7,3E+00
nach KA I	3,2E+02	1,9E+01	2,9E+01	1,6E+02	9,6E+01	3,6E+01	< 3,3E+00
nach KA II	< 4,1E+00	1,1E+01	1,4E+01	2,4E+02	7,0E+01	3,0E+01	< 3,3E+00
<b>Fäkalcoliforme (MPN/ 100ml)</b>							
vor KA	9,3E+01	4,3E+02	4,3E+01	4,6E+03	4,3E+02	3,6E+01	2,3E+01
vor UV	4,3E+05	4,3E+04	< 3,0E+03	2,4E+04	2,1E+05	9,3E+04	< 3,0E+03
nach UV	2,0E+00	9,0E+00	2,3E+00	2,3E+00	4,3E+00	3,6E-01	3,8E+00
nach KA I	9,3E+01	9,3E+01	4,3E+01	4,3E+02	2,4E+02	9,0E+01	2,3E+01
nach KA II	9,3E+01	9,3E+02	9,3E+01	9,3E+02	7,5E+02	2,3E+02	2,4E+02

### 3.6.2 Salmonellen in der Würm

Weder in einem Liter Probe aus der Würm vor der Kläranlage Starnberg noch in einem Liter Gesamtablauf der Kläranlage wurden Salmonellen gefunden (s. Tab. 12). Allerdings gab es auf der weiteren Fließstrecke der Würm drei positive Nachweise (zweimal bei leichtem Regen, einmal bei Trockenwetter). In allen Proben wurden auch die Konzentrationen der Fäkalindikatorbakterien bestimmt (nicht dargestellt). Dabei war auffällig, dass mit einer Ausnahme Leit- und Grenzwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie eingehalten wurden. Nur am 27.06.05 wurden in der „Tandlerschlucht“ die Leitwerte für Gesamt- und Fäkalcoliforme überschritten.

Tab. 12: Salmonellennachweis in der Würm und im Ablauf der Kläranlage Starnberg (k. P.: keine Probenahme)

	25.04.05	09.05.05	06.06.05	27.06.05
Würm vor KA Starnberg	-	-	-	-
KA-Ablauf Starnberg (UV-bestrahlt)	-	-	-	-
Würm Leutstetten	-	+	k. P.	-
Würm Tandlerschlucht	-	-	+	+

## 3.7 Wiederverkeimungsversuche

### 3.7.1 Kläranlage Schäftlarn

Nach zwei Vorversuchen in Bad Tölz wurde der Versuch zur Wiederverkeimung (s. 2.6) neunmal auf der Kläranlage Schäftlarn durchgeführt (Badesaisons 2004 und 2005). An den einzelnen Versuchstagen herrschten unterschiedliche Witterungsbedingungen: Lufttemperaturen zwischen 12 und 27°C, leichter Regen bis wolkenloser Himmel. In Tabelle 13 ist die Konzentration der Fäkalindikatorbakterien in der nicht abgedeckten Wanne zu Beginn des Versuches ( $N_0$ ) und die im Versuch maximal erreichte Konzentration ( $N_{max}$ ) aufgetragen. Man kann erkennen, dass bei Gesamt- und Fäkalcoliformen der Unterschied zwischen  $N_0$  und  $N_{max}$  durchschnittlich weniger als eine ( $0,7 \pm 0,3$  bzw.  $0,8 \pm 0,8$ ) Zehnerpotenz beträgt. Zu welchem Zeitpunkt  $N_{max}$  erreicht wurde, variierte stark (zwischen  $t=0$  und  $t=150\text{min}$ ). Nur am 21.06.04 kam es zu einer Leitwertüberschreitung bei FC (nach EG-Badegewässer-Richtlinie, grüne Schrift in Tab. 13) im Versuchsverlauf. Ansonsten wurden Leit- und Grenzwerte immer eingehalten (blaue Schrift). In Tab. 13 sind außerdem die Überschreitungen der Auflagewerte (UV-Anlage) in der Ausgangsprobe ( $N_0$ ) gelb gekennzeichnet (GC am 14.06.04, GC und FC am 06.09.05). Fäkale Streptokokken wurden meist in 100 ml nicht nachgewiesen – häufig

weder zu Beginn des Versuchs noch in dessen Verlauf. Der höchste bestimmte Wert lag bei 5 KBE/ 100 ml (21.06.04). In sechs Versuchen wurden 1 l-Proben auf Salmonellen untersucht, alle Proben (Ausgangsproben und Proben aus dem Versuchsverlauf) waren negativ.

Tab. 13: Wiederverkeimungsversuche auf der Kläranlage Schäftlarn: Konzentration der Fäkalindikatorbakterien zu Beginn des Versuchs ( $N_0$ ) und maximale Konzentration ( $N_{max}$ ) in der **nicht abgedeckten** Wanne

	01.06.04	14.06.04	21.06.04	26.07.04	09.08.04	23.08.04	07.09.04	20.09.04	06.09.05
<b>Gesamtcoliforme [MPN/ 100 ml]</b>									
$N_0$	9,3	75	24	4,3	2,3	2,3	2,3	4,3	93
$N_{max}$	43	430	240	9,3	15	23	9,3	43	93
<b>Fäkalcoliforme [MPN/ 100 ml]</b>									
$N_0$	0,36	7,5	0	0	0,90	0	0,36	0,90	93
$N_{max}$	24	93	240	2,3	4,3	0,9	1,5	3,6	93
<b>Fäkale Streptokokken [KBE/ 100 ml]</b>									
$N_0$	0	1,0	0	1,0	1,0	0	0	0	0
$N_{max}$	0	3,0	5,0	2,0	0	0	0	0	0

Im Allgemeinen waren die Ergebnisse der Versuche recht uneinheitlich, oft waren auch die Unterschiede zwischen nicht abgedeckter („hell“) und abgedeckter Wanne („dunkel“) nicht besonders groß, was auf ein relativ geringes Reparaturpotential hinweisen könnte. Abb. 9 zeigt beispielhaft für alle Versuche das Ergebnis für GC und FC vom 20.09.04 (sonnig, Lufttemperatur 20°C zu Beginn und 25°C am Ende des Versuchs, Wassertemperatur: 18°C).

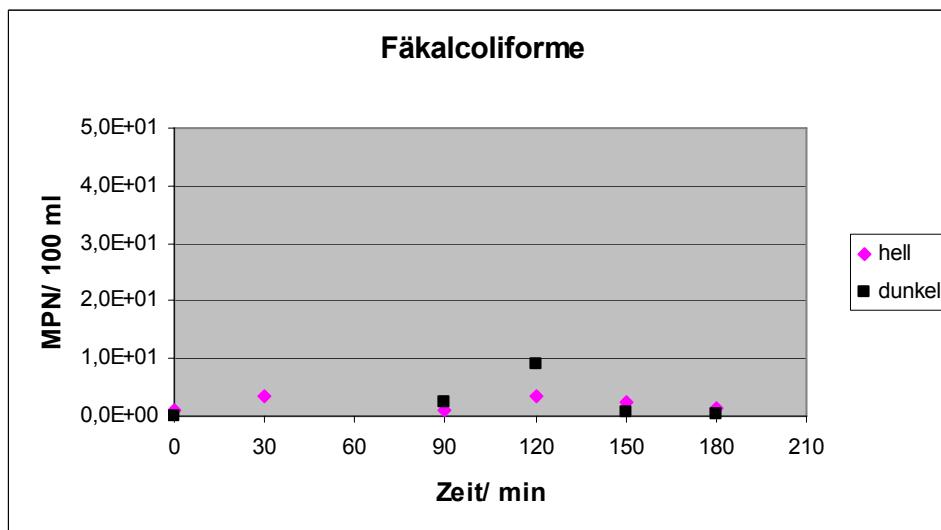
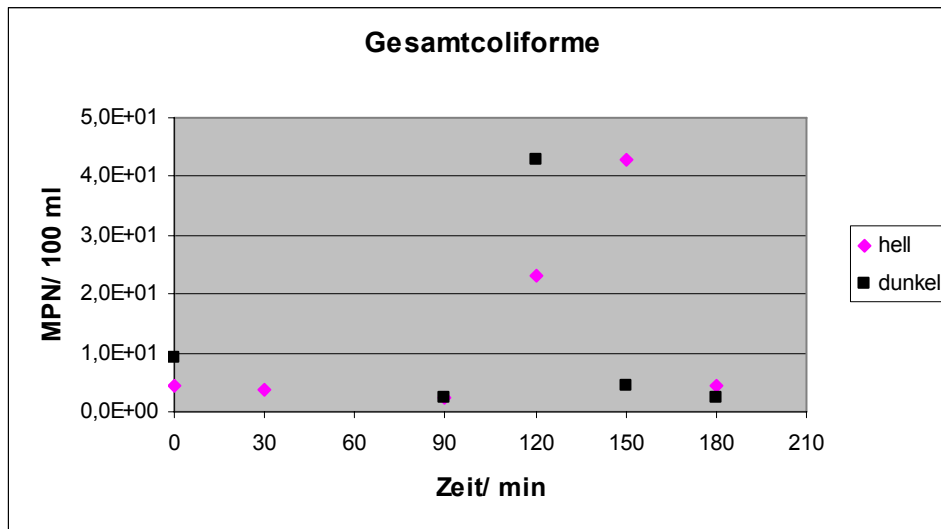


Abb. 9: Versuch zur Wiederverkeimung am 20.09.04: GC und FC in der nicht abgedeckten (hell) und der abgedeckten Wanne (dunkel) im Zeitverlauf

In Abb. 9 sieht man, dass die Gesamtcoliformen sowohl in der nicht abgedeckten (s. Tab. 13) als auch in der abgedeckten Wanne eine maximale Konzentration von 43 MPN/ 100 ml erreichen – allerdings zu anderen Zeitpunkten. Für FC ist der „dunkle Maximalwert“ sogar höher als der helle (9,0 bzw. 3,6 MPN/ 100 ml). Beim Nachweis von FS wurde in der abgedeckten Wanne nach 90 min 1 KBE/ 100 ml gefunden, ansonsten waren die Proben aus beiden Wannen immer negativ für FS (nicht dargestellt).

### 3.7.2 Kläranlage Starnberg

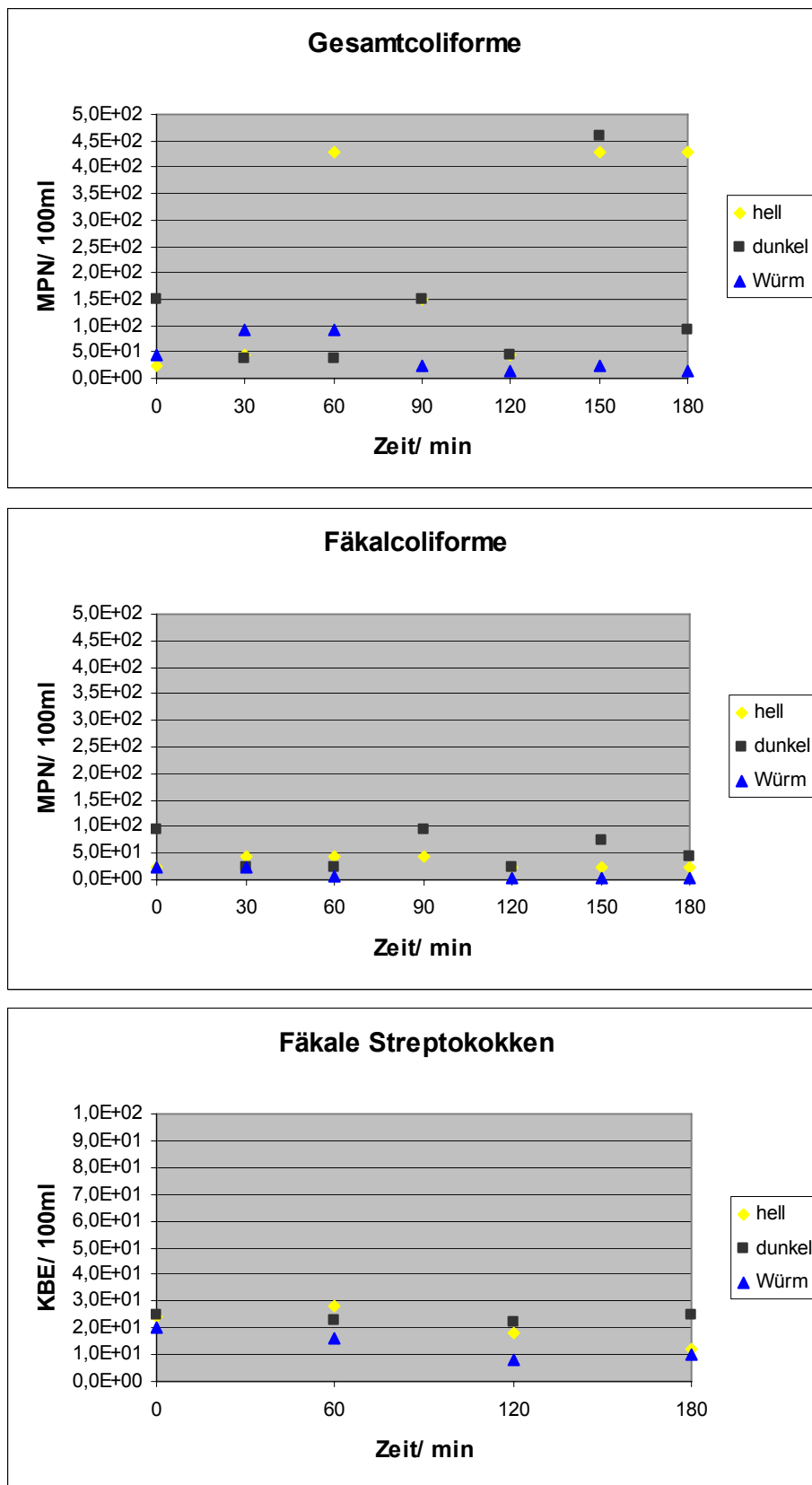


Abb. 10: Versuch zur Wiederverkeimung am 11.05.05: GC, FC und FS in der nicht abgedeckten (hell), der abgedeckten (dunkel) und der Wanne mit Würmwasser (nicht abgedeckt) im Zeitverlauf

Bei den zwei Versuchen auf der Kläranlage Starnberg wurde mit einem veränderten Versuchsprotokoll gearbeitet (s. 2.6). Die wesentlichen Unterschiede zu den Versuchen in Schäftlarn bestanden darin, dass zum UV-bestrahlten Ablauf Flusswasser zugemischt wurde und in einer dritten Wanne reines Flusswasser untersucht wurde. Beim Versuch vom 11.05.05 wurde das Wasser in den Wannen nicht gekühlt, aber durchmischt. In der nicht abgedeckten Wanne („hell“) kam es innerhalb der Versuchsdauer von 3 h zu einem Temperaturanstieg von 10 auf 16,5°C, in der abgedeckten Wanne („dunkel“) von 10 auf 12,5°C und in der nicht abgedeckten Wanne mit Würmwasser („Würm“) von 10 auf 15,5°C (Lufttemperatur: anfangs 10°C, zu Versuchsende 14°C; bewölkt mit sonnigen Abschnitten).

Zusätzlich zu den Proben aus den Wannen wurden in Proben vom unbestrahlten (nicht dargestellt) und vom UV-bestrahlten Ablauf der Kläranlage Starnberg die Konzentrationen der Fäkalindikatorbakterien bestimmt (UV-bestrahlter Ablauf: GC: 43 MPN/ 100 ml, FC: 43 MPN/ 100 ml, FS: 24 KBE/ 100 ml). Die Konzentrationen in der Würm waren sehr ähnlich (GC: 43 MPN/ 100 ml, FC: 24 MPN/ 100 ml, FS: 20 KBE/ 100 ml). Abb. 10 zeigt, dass die Konzentration fäkaler Streptokokken in allen drei Wannen recht konstant bei Werten zwischen ca. 10 und 25 KBE/ 100 ml blieb. In den Wannen „hell“ und „Würm“ war die Konzentration bis zum Versuchsende aber auf die Hälfte zurückgegangen. Die Konzentration von GC und FC in der Wanne mit Würmwasser war ebenfalls recht geringen Schwankungen unterworfen, tendenziell wurde sie ab 30 min (FC) bzw. ab 60 min (GC) eher geringer. In der „hellen Wanne“ lagen die Werte für FC zwischen ca. 20 und 40 MPN/ 100 ml („dunkle Wanne“: ca. 20 bis 90 MPN/ 100 ml). Den größten Schwankungen waren die Konzentrationen von GC unterworfen („hell“: 24 bis 430 MPN/ 100 ml, „dunkel“: 38 bis 460 MPN/ 100 ml), wobei für beide Wannen kein klarer Trend zur Ab- oder Zunahme, sondern ein Auf und Ab erkennbar ist.



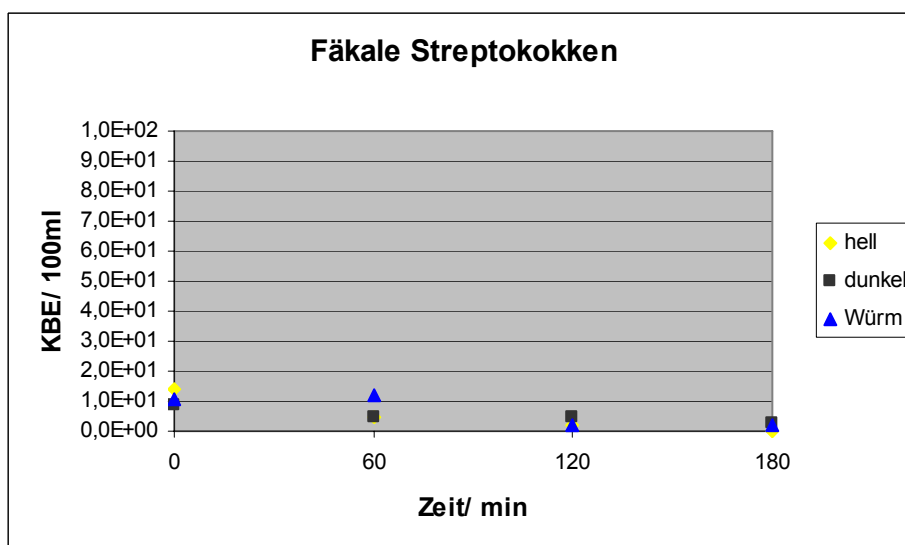
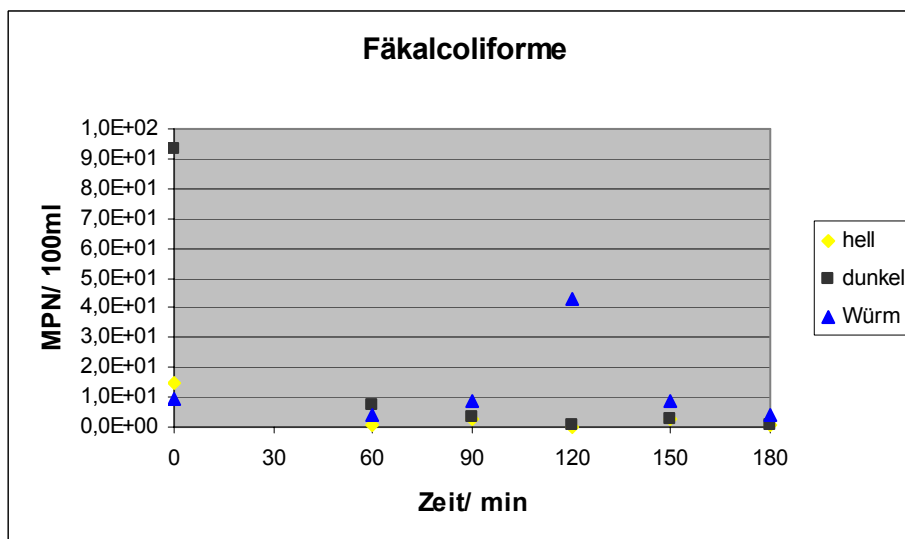
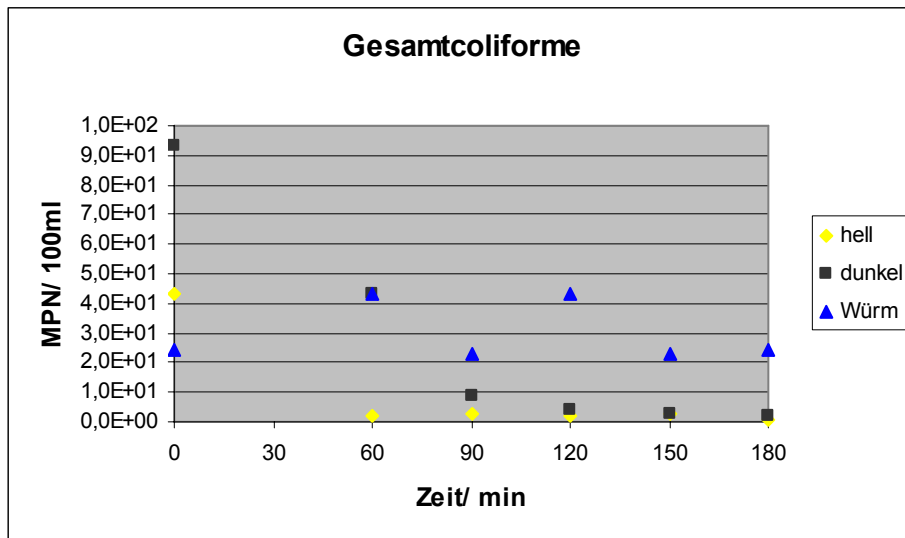


Abb. 11: Versuch zur Wiederverkeimung am 09.08.05: GC, FC und FS in der nicht abgedeckten (hell), der abgedeckten (dunkel) und der Wanne mit Würmwasser (nicht abgedeckt) im Zeitverlauf

Beim Versuch vom 09.08.05 wurde die Wanne mit Würmwasser nicht gekühlt (Temperaturanstieg von 19 auf 24°C), die beiden anderen Wannen wurden gekühlt (Wassertemperatur recht konstant bei 18°C). An diesem Tag war es leicht bewölkt und die Lufttemperatur lag bei 15 bis 17°C. Im UV-bestrahlten Ablauf waren die Konzentrationen der Fäkalindikatoren sehr gering (GC: 4,3 MPN/ 100 ml; FC: 0,9 MPN/ 100 ml; FS: 0 KBE/ 100 ml). Die Konzentrationen in der Würm waren um ca. eine Zehnerpotenz höher (GC: 24 MPN/ 100 ml; FC: 9,3 MPN/ 100 ml; FS: 11 KBE/ 100 ml). Wie beim vorherigen Versuch schwankten die Konzentrationen fäkaler Streptokokken in allen drei Wannen kaum (s. Abb. 11), bis zum Ende des Versuchs nahmen sie aber ab (auf 0 bis 3 KBE/ 100 ml). Die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen in den Wannen waren bei Fäkalcoliformen am Anfang des Versuchs zu erkennen. Danach lagen die Konzentrationen in allen drei Wannen – mit einer Ausnahme (Würm 120 min) – unter 10 MPN/ 100 ml. Trotz des „Ausreißers“ war der Unterschied zwischen Ausgangs- und Endkonzentration in der „Würm-Wanne“ am geringsten. Das Gleiche gilt für Gesamtcoliforme in dieser Wanne, obwohl die Konzentration im Verlauf des Versuchs schwankte. In der „dunklen Wanne“ nahm die Konzentration von GC kontinuierlich ab, in der „hellen Wanne“ hatte sie schon nach 60 min fast auf 0 abgenommen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methoden

Zunächst wurde versucht, Salmonellen ohne Anreicherung zu isolieren, indem Abwasser filtriert wurde und die Filter direkt auf XLD-Agar gelegt wurden (s. 3.1.1.1). Aufgrund der relativ geringen Selektivität des Agars war dies aber nicht möglich. Um die Begleitflora zu unterdrücken, musste eine spezifische Anreicherung in RVS-Bouillon erfolgen (s. 3.1.1.2). Die Zugabe von Novobiocin zur RVS-Bouillon führte nicht zu einer stärkeren Hemmung der Begleitflora (vgl. 3.1.1.3). Obwohl in ISO/DIS 19250 angegeben wird, dass ein Verzicht auf eine unspezifische Voranreicherung bei der Isolierung von Salmonellen aus Abwasser zu besseren Ergebnissen führt, hat sich dies in den Vergleichsversuchen (s. 3.1.1.3) nicht bestätigt. Wahrscheinlich ist die Voranreicherung in Peptonwasser nötig, um auch gestresste Salmonellen (u.a. durch die niedrige Temperatur des Abwassers) zu erfassen. Außerdem bringt das Überimpfen von 0,1 statt 1 ml Voranreichungskultur in 10 ml RVS-Bouillon bei der Isolierung Vorteile. Die Zugabe des größeren Volumens erniedrigt die Selektivität zum einen durch die Verdünnung der RVS-Bouillon und zum anderen durch die höhere Menge an Begleitflora. Die mit dem Wellcolex-Latexkit in den Vergleichsversuchen bestätigten Salmonellen-Kolonien gehörten zur Serogruppe C (s. 3.1.1.4), bei anderen Salmonellen-Nachweisen (vgl. z.B. 3.3.2.1 und 3.7.1) wurden auch Vertreter der Serogruppen B und D gefunden. Beispiele für in Abwasser vorkommende Serotypen der einzelnen Gruppen sind *Salmonella* Brandenburg und *S. Typhimurium* (Gruppe B), *S. Manhattan* und *S. Newport* (Gruppe C), sowie *S. Enteritidis* und *S. Panama* (Gruppe D) (Baudart et al. 2000; Koivunen et al. 2001).

Die Probleme bei der Identifizierung von *Clostridium perfringens* (s. 3.1.2) traten nach der Umstellung der Art der Ammoniak-Bedampfung und der Bebrütung (s. 2.2.4) nicht mehr auf. Vermutlich reicht die Konzentration der Ammoniakdämpfe in der Luft nicht aus, um die Kolonien zu verfärben, wenn die Platten nur neben ein Gefäß mit Ammoniaklösung gestellt werden. Es ist also effektiver, jede Platte einzeln direkt über das Gefäß zu halten. Ein Grund für die negativen Auswirkungen einer Bebrütung im anaeroben Brutschrank gegenüber dem Anaerobentopf könnte sein, dass der Sauerstoff im Schrank durch eine relativ schwache Vakuumpumpe und das anschließende Spülen mit Stickstoff nicht ausreichend entfernt wurde. Das zur Erzeugung eines anaeroben Milieus im Anaerobentopf verwendete Anaerocult® A ist dagegen direkt auf diesen Zweck abgestimmt.

Zum Nachweis von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen und somatischen Coliphagen wurde die Vorschrift nach DIN EN ISO 10705 verwendet (s. 3.1.3.1). Der Nachweis somatischer

Coliphagen war recht unkompliziert, die entstehenden Plaques waren deutlich sichtbar und somit gut auszählbar. Bei den F-spezifischen RNA-Bakteriophagen muss bei der Vermehrung des Wirtsstammes und der Herstellung der Arbeitskulturen besonders darauf geachtet werden, dass die Kultur nach dem Erreichen der optimalen Zelldichte sofort auf Eis gelagert werden muss. Ansonsten können die Zellen das F-Plasmid verlieren und wären nicht mehr als Wirtszellen geeignet. Es wurden nur solche Arbeitskulturen verwendet, die das in der Norm angegebenen Verfahren zur Qualitätskontrolle des Wirtsstammes durchlaufen hatten. Die von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen verursachten Plaques hoben sich weniger gut vom Hintergrund ab als die oben beschriebenen und waren meist auch kleiner. Um trotzdem gut auszählbare Plaques zu erhalten, muss sichergestellt werden, dass der ssTYG-Agar (vgl. Norm), der mit der Probe vermischt wird, noch vollkommen flüssig ist, wenn er auf die Oberfläche der TYG-Agarplatte gegossen wird.

Die Methode zur Konzentrierung von Bakteriophagen wurde außer in zwei Versuchen (s. 3.1.3.2) nicht weiter angewendet. Für somatische Coliphagen ergaben sich zwar Wiederfindungsraten von 60 bis 70 %, die Plaques von F-spezif. RNA-Bakteriophagen waren jedoch meist nicht auszählbar. Hinzu kam noch, dass sich die Methode als zeitaufwändig erwies. So wurden keine weiteren Versuche durchgeführt. Für Proben mit geringer Phagenzahl wurde daher das in der Norm angegebene Verfahren mit 14 cm-Petrischalen und 5 ml Probeneinsatz herangezogen, das im Vergleich zur Methode mit Konzentrierung sogar weniger zeitaufwändig war. Der einzige Nachteil bestand in der Produktion von großen Mengen an Plastik- und Agarmüll.

#### **4.2 Konzentrationen von Mikroorganismen in den Abwasserreinigungsstufen**

Die Konzentrationen im (mechanisch gereinigten) Rohabwasser der Kläranlage Starnberg lagen mit etwa  $10^7$  MPN/ 100 ml für Coliforme und ca.  $10^6$  KBE bzw. PBE/ 100 ml für fäkale Streptokokken und somatische Coliphagen im in der Literatur beschriebenen Bereich (z.B. Baggi et al. 2001, Contreras-Coll et al. 2002). Für den größten Teil der Reduktion von Fäkalindikatorbakterien, *C. perfringens* und somatischen Coliphagen (jeweils um ca. zwei bis drei Zehnerpotenzen) bis zum Ablauf des Biofilters ist die Belebungsstufe verantwortlich (s. 3.2). Im Biofilter kommt es bei den beiden ersten Gruppen zu einer weiteren Verringerung um durchschnittlich eine halbe Zehnerpotenz. Die Konzentration somatischer Coliphagen verändert sich durch den Biofilter kaum. Dies lässt sich mit der geringen Größe von Phagen erklären. An drei Probenahmeterminen betrug die Salmonellen-Konzentration schon im Ablauf der mechanischen Reinigungsstufe weniger als 100 MPN/ 100 ml. Zweimal waren die

Nachweise aus den anderen Stufen (Belebung und Biofilter) dann negativ. Dass nicht immer Salmonellen in Kläranlagen-Endabläufen zu finden sind, wird von verschiedenen Autoren beschrieben (Baron 1997, Koivunen et al. 2001). Im dritten Fall lag die Konzentration im Ablauf des Biofilters wieder im Bereich der Ausgangskonzentration. Hier war auffällig, dass der Wert für den Ablauf des Belebungsbeckens niedriger war als der für den Ablauf des Biofilters. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich an Partikel im Biofilter angelagerte Salmonellen gelöst haben. Allerdings könnte auch die hohe Schwankungsbreite der MPN-Quantifizierungsergebnisse bei diesen niedrigen Konzentrationen in der Nähe der Nachweisgrenze eine Rolle spielen. Auch am vierten Probenahmetermin war im Biofilter eine Zunahme festzustellen. Die Reduktion (zwischen Rohabwasser und Endablauf) betrug insgesamt – ausgehend von über 1000 MPN/ 100 ml – trotzdem mehr als zwei Zehnerpotenzen.

Insgesamt ist noch anzumerken, dass jede einzelne Probe nur eine „Momentaufnahme“ der jeweiligen Reinigungsstufe darstellt. Es ist nicht möglich dieselbe Wasserprobe „mit der fließenden Welle“ in den verschiedenen Stufen zu untersuchen. Bei geringen Konzentrationsunterschieden zwischen den Stufen und allgemein bei niedrigen Konzentrationen (z.B. bei Salmonellen) kann dies zu Problemen bei der Interpretation der Ergebnisse führen.

### **4.3 Reduktion von Mikroorganismen in UV-Desinfektionsanlagen**

Gesamt- und Fäkalcoliforme Bakterien und Fäkale Streptokokken (Ausgangskonzentrationen:  $10^3$ - $10^6$  MPN bzw. KBE/ 100 ml) wurden in der UV-Anlage Bad Tölz um drei bis fünf Zehnerpotenzen reduziert (s. Abb. 2). Obwohl die Aufgabewerte der UV-Anlage in einigen Fällen nicht eingehalten wurden, wurde ein Wert von 50 MPN bzw. KBE/ 100 ml im Ablauf der UV-Anlage in keinem der 32 Fälle überschritten (s. 3.3.1). Dies bedeutet, dass die Leit- und Grenzwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie immer eingehalten und meist deutlich unterschritten wurden. Ausgehend von Konzentrationen von bis zu 500 MPN/ 100 ml wurden *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. in einem Liter UV-bestrahlten Ablauf nie nachgewiesen (s. 3.3.2). Erklären lässt sich dies außer mit der geringen Ausgangskonzentration mit der Tatsache, dass diese beiden Gattungen zu den nicht-sporenbildenden Bakterien gehören und so wie die Fäkalindikatorbakterien recht sensibel auf UV-Strahlung reagieren.

Im Gegensatz dazu wird *C. perfringens* (Ausgangskonzentrationen:  $10^2$ - $10^3$  KBE/ 100 ml) nur um ca. eine Zehnerpotenz verringert (s. 3.3.3), sowohl in der UV-Anlage Bad Tölz als auch in

den Anlagen Benediktbeuern-Bichl, Schäftlarn und Starnberg. Als Sporenbilder ist diese Spezies weitaus weniger empfindlich gegen ultraviolette Strahlung. Die höhere Widerstandskraft von Sporen (meist von *Bacillus subtilis*) im Vergleich zu vegetativen Zellen wurde schon in zahlreichen Studien mit Labor-UV-Bestrahlungsanlagen belegt (z.B. Sommer et al. 1989, Chang et al. 1985). Im Projekt wurden nur in zwei Fällen neben dem normalen Nachweis, bei dem Sporen und vegetative Zellen von *C. perfringens* gemeinsam bestimmt werden, zusätzlich die Sporenzahlen bestimmt (s. Tab. 4). Für eine gesicherte Aussage sind das zu wenig Daten. Die Tatsache, dass die Ergebnisse für Sporen in der gleichen Größenordnung liegen wie die für Sporen und vegetative Zellen zusammen, lässt jedoch darauf schließen, dass im Abwasser die meisten *C. perfringens*-Zellen als Sporen vorliegen. Dies dürfte mit den schlechten Lebensbedingungen für Clostridien in der Kläranlage zusammenhängen, da sie Anaerobier sind und bei mindestens 37°C optimal wachsen.

Die UV-Anlage Bad Tölz war sehr gut dazu geeignet, somatische Coliphagen abzutöten (s. 3.3.4.2). Nach der Bestrahlung waren sogar an den meisten Probenahmeterminen keine Coliphagen in 100 ml Abwasser mehr zu finden, obwohl vorher über  $10^4$  PBE/ 100 ml nachgewiesen wurden. Somatische Coliphagen wurden als Modellorganismen für relativ UV-sensible humanpathogene Viren verwendet. Da es aber auch Viren gibt, die gegen UV-Strahlung widerstandsfähiger sind (Havelaar et al. 1991), wurden ab dem zweiten Untersuchungsjahr zusätzlich die resistenteren F-spezifischen RNA-Bakteriophagen untersucht. Diese Bakteriophagen wurden tatsächlich nur um ungefähr zwei Zehnerpotenzen verringert (s. 3.3.4.1), im Vergleich zu somatischen Coliphagen waren die Ausgangskonzentrationen jedoch etwas geringer. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Jahr 2005 einige Proben aus der Anlage Bad Tölz auf verschiedene Viren untersucht. Alle Proben aus Zu- und Ablauf der UV-Anlage Bad Tölz waren in der PCR für Entero- und Noroviren negativ (s. 3.3.5.1). Auch Pusch und Mitarbeiter (2005) fanden mit Hilfe der PCR in vielen Kläranlagenabläufen keine Entero- und Noroviren-Genome. Die Proben in Bad Tölz wurden im Juni und Juli genommen, Enteroviren kommen jedoch normalerweise häufiger im Spätsommer und Herbst, Noroviren (früher: Norwalk-like viruses) im Winter („winter vomiting disease“) vor (Mounts et al. 2000 zitiert in Pusch 2005). Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass kürzlich entdeckte genetische Varianten von Norovirus auch zu Erkrankungsspeaks im Frühling und Sommer führen können (Lopman et al. 2004). Aufgrund fehlender positiver Ergebnisse kann hier keine Aussage über die UV-Resistenz der beiden Virengruppen gemacht werden. Tree et al. (1997) und de Roda Husman et al. (2004) gehen allerdings davon aus, dass Enteroviren und Noroviren sensibler auf UV-Strahlung reagieren

als F-spezifische Bakteriophagen. Rotaviren-Erbmaterial wurde an einem der fünf Probenahmeterminale, dann aber vor und nach UV-Bestrahlung gefunden. In der Literatur werden Rotaviren als UV-resistenter als Polioviren (zu Enteroviren) und bestimmte Bakteriophagen beschrieben (Sommer et al. 1989). Adenoviren sind unter den humanpathogenen Viren die einzigen DNA-Viren in der Familie der enterischen Viren, sie sind daher auch am stabilsten gegen Umwelteinflüsse (He & Jiang 2005). Für Adenoviren war die PCR viermal in Proben vor und dreimal nach UV-Bestrahlung (Anlage Bad Tölz) positiv. Parallel zur negativen Enteroviren-PCR war auch der Plaque-Assay mit BGM-Zellen für Enteroviren negativ. Beim MPN-Assay mit A549-Zellen auf Adenoviren waren die Ergebnisse nicht ganz eindeutig. Deshalb wurden die Zellkulturüberstände wiederum in die PCR eingesetzt. Von den je 5 Proben vor und nach UV-Bestrahlung war nur eine Probe positiv, und zwar eine Probe aus dem Ablauf der UV-Anlage. Hier waren also noch infektiöse Adenoviren nach UV-Bestrahlung zu finden, was man mit der Struktur des Erbmaterials der Adenoviren und ihrer damit verbundenen hohen Stabilität gegenüber UV-Strahlung und anderen Umwelteinflüssen (s.o.) erklären könnte.

Bei der Reduzierung von parasitischen Protozoen (s. 3.3.6) spielt meist schon der Sandfilter vor der UV-Anlage Bad Tölz eine größere Rolle als die UV-Bestrahlung. Cryptosporidien-Oozysten und Giardien-Zysten sind größer als Bakterienzellen und Viruspartikel und werden deshalb im Sandfilter besser zurückgehalten (vgl. 3.2). Eine weitere Reduktion erfolgte in den meisten Fällen in der UV-Anlage. Ob die im UV-bestrahlten Ablauf gefundenen Oozysten bzw. Zysten noch lebensfähig und infektiös waren, kann mit der hier verwendeten Nachweismethode (s. 2.2.7) nicht entschieden werden. Cryptosporidien verlieren durch UV-Bestrahlung häufig ihre Infektiosität, auch wenn sie zum Teil lebensfähig bleiben (Morita et al. 2002).

In allen Abbildungen in 3.3 wurden Ergebnisse der Untersuchungen von Proben vor und nach UV-Bestrahlung gegenübergestellt. Die Proben wurden zwar immer kurz nacheinander genommen, man kann aber nicht davon ausgehen, dass für eine bestimmte UV-bestrahlte Probe genau die Ausgangskonzentration galt, die in der „vor UV-Probe“ bestimmt wurde. Wenn die Proben nicht vertauscht wurden, könnte dies ein Grund dafür sein, dass bei Cryptosporidien und Giardien (s. Tab. 6) je einmal nach UV eine höhere Konzentration vorlag als vor UV. Normalerweise sollte diese Art der Probenahme aber keine negativen Auswirkungen auf die Güte der Ergebnisse haben – besonders nicht bei großen Unterschieden zwischen Ausgangs- und Endkonzentration, da sich die Konzentrationen der

Mikroorganismen im gereinigten Abwassers (vor UV) nicht sehr schnell ändern und nicht sehr stark schwanken sollten.

Allgemein gilt außerdem, dass die UV-Reduktionsrate von der Höhe der Konzentration der Mikroorganismen vor der UV-Bestrahlung in direkter Korrelation abhängig ist. Eine Reduktion um eine Zehnerpotenz ist beispielsweise bei einer Ausgangskonzentration von  $10^5$  leichter zu erzielen als bei einer Ausgangskonzentration von  $10^2$  Mikroorganismen/ 100 ml. Der Grund dafür ist, dass für eine bestimmte Zelle die Wahrscheinlichkeit, von den UV-Strahlen getroffen zu werden, bei hoher Konzentration größer ist. Dieser Effekt könnte z.B. dafür verantwortlich sein, dass die Reduktionsraten bei Fäkalen Streptokokken geringer sind als bei Gesamt- und Fäkalcoliformen Bakterien (s. 3.3.1).

#### **4.4 Korrelation der Konzentrationen verschiedener Mikroorganismen**

Vor und nach UV korrelierten die Konzentrationen Gesamt- und Fäkalcoliformer höchst signifikant miteinander, da die Fäkalcoliformen (FC) eine Teilmenge der Gesamtcoliformen (GC) sind (s. 3.4). GC korrelierten vor UV außerdem noch mit allen anderen untersuchten Organismen (Fäkalen Streptokokken (FS), *Clostridium perfringens* (C. p.), F-spezifischen RNA-Bakteriophagen (F-sp. B.) und somatischen Coliphagen (som. C.)) außer *Campylobacter* spp. und Salmonellen, FC dagegen nicht mit FS und somatischen Coliphagen, aber mit *Campylobacter* spp.. Hinzu kamen noch Korrelationen von FS mit Salmonellen und den beiden Phagengruppen und den beiden Phagengruppen untereinander.

Nach UV ergab sich neu eine Korrelation zwischen FC und FS und zwischen C. p. und FS, so dass alle Fäkalindikatoren untereinander und mit C. p. korrelierten. Keiner der Fäkalindikatoren korrelierte jedoch noch mit einer der Phagengruppen und auch zwischen F-sp. B. und som. C. wurde keine Korrelation festgestellt.

Obwohl C. p. als Sporenbildner durch UV-Bestrahlung weniger stark verringert wird als die Indikatorbakterien, korrelieren die Konzentrationen auch nach UV-Bestrahlung miteinander. Eine Korrelation bedeutet hier z.B.: Ist an einem bestimmten Tag die Konzentration von Fäkalcoliformen nach UV relativ gering, ist auch die Konzentration von C. p. recht gering, allerdings nicht als absolute Zahl, sondern nur im Vergleich mit C. p.- Konzentrationen an anderen Tagen. Im Gegensatz dazu ist nach UV kein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Fäkalindikatoren und Bakteriophagen mehr erkennbar.



#### **4.5 Einfluss suspendierter Feststoffe auf die UV-Desinfektion**

Eigentlich sollten sich der Gehalt an suspendierten Feststoffen und die UV-Transmissionswerte der Proben vor und nach UV (Gesamtproben) nicht wesentlich unterscheiden. Grund für die teilweise relativ großen Unterschiede (05.07. und 13.07.04, s. 3.5) bei den suspendierten Feststoffen könnten Ungenauigkeiten bei der Bestimmung gewesen sein, die sich bei den hier vorliegenden geringen Werten im Bereich von wenigen mg stark auswirken können. Die Filter mussten laut DIN-Norm vor der Wägung mit der Luft ins Feuchtigkeitsgleichgewicht gebracht werden. Vermutlich war im Laborraum, in dem die Waage steht, die Luftfeuchtigkeit zu hoch.

Das eindeutigste Ergebnis wurde am 02.08.04 erzielt. Der Gehalt an suspendierten Feststoffen im Ablauf der Kläranlage Lenggries war mit über 6 mg/ l hoch und die UV-Transmission sehr niedrig (knapp 62 %). An diesem Tag wurden die UV-Anlagen-Auflagewerte bei allen drei Fäkalindikatorgruppen nicht eingehalten, bei Fäkalcoliformen wurde sogar der Leitwert der EG-Badegewässer-Richtlinie überschritten. Es zeigte sich, dass fast alle für die Überschreitung des Auflagewertes verantwortlichen Bakterien an Partikel gebunden waren und so vor der UV-Strahlung geschützt waren.

Am 19.07.04 wurden die empfohlenen Werte (s. 2.4) für suspendierte Stoffe und die UV-Transmission ganz sicher eingehalten. In der Gesamtprobe nach UV wurden auch die UV-Auflagewerte unterschritten, aber im Filtrat wurden 46 MPN/ 100 ml Fäkalcoliforme bestimmt, was einer Überschreitung des Auflagewertes entspräche. Die Konzentrationen aller drei Fäkalindikator-Gruppen waren im Filtrat höher als in der Gesamtprobe, was ein Hinweis auf eine Probenverwechslung sein könnte. Andererseits könnten auch durch Filtration und Spülen Flocken zerschlagen worden sein, was zur Trennung von Bakterien-Konglomeraten und somit zu höheren MPN- bzw. KBE-Werten geführt haben könnte. Die große Schwankungsbreite von MPN-Ergebnissen wäre eine andere Erklärung für höhere Werte im Filtrat. Diese drei Erklärungsmöglichkeiten gelten auch für andere Probenahmetermine, an denen sich rechnerisch negative Ergebnisse für die partikelgebundenen Bakterien ergaben (s. Tab. 9), weil die Konzentrationen in der Gesamtprobe niedriger waren als im Filtrat.

Am 05.07.04 und am 13.07.05 lag der Gehalt an suspendierten Feststoffen in der gleichen Größenordnung (Mittelwerte knapp unter 5 mg/ l). Die UV-Anlagen-Auflagewerte wurden am 05.07.04 eingehalten, obwohl die UV-Transmission relativ schlecht war (ca. 63 %). Dagegen wurde am 13.07.05 der Auflagewert für FS bei besseren Transmissionswerten

überschritten. Hier waren wie oben die für die Überschreitung verantwortlichen Bakterien partikelgebunden.

Salmonellen wurden im UV-bestrahlten Ablauf der Anlage Lenggries nicht nachgewiesen. Im nicht bestrahlten Ablauf war der größere Teil der Salmonellen und der Fäkalindikatorbakterien meist an Partikel gebunden. Auch hier muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse der große Schwankungsbereich der MPN-Ergebnisse berücksichtigt werden.

Insgesamt kann man sagen, dass in der Regel an Partikel angelagerte Bakterien Überschreitungen der UV-Anlagen-Auflagewerte verursachen. Man kann jedoch nicht automatisch von hohen Gehalten an suspendierten Feststoffen oder einer UV-Transmission von unter 65 % auf eine Nichteinhaltung der Auflagewerte schließen. Sogar mit einer weitaus größeren Datenmenge (Schöler 2002) ist es relativ schwierig, Aussagen über den Einfluss suspendierter Stoffe auf die Abwasserdesinfektion mit UV-Strahlung zu machen. Für eine effektive UV-Bestrahlung scheint die Größe der Partikel wichtiger zu sein als der Gehalt an suspendierten Stoffen. Entscheidend ist die Anzahl der in Partikel eingelagerten Bakterienzellen, die nicht von der UV-Strahlung getroffen werden. Meist sind Partikel, die eine desinfektionsmindernde Wirkung verursachen über 20 µm groß, jedoch gibt es anlagenspezifische Unterschiede (Schöler 2002).

#### **4.6 Untersuchungen von Kernbach und Würm**

Während der Betriebszeit der UV-Anlage Benediktbeuern-Bichl war die Konzentration Fäkalcoliformer Bakterien im Kernbach nach Einleitung der Kläranlage deutlich geringer als im Winterhalbjahr, der Grenzwert der EG-Badegewässer-Richtlinie wurde an allen Probenahmeterminen eingehalten (s. 3.6.1). Die Werte an der zweiten Probenahmestelle nach der Kläranlage (nach KA II) waren jedoch wieder etwas höher als die an der ersten Stelle (nach KA I). Für diesen Anstieg ist also ein Eintrag aus diffusen Quellen verantwortlich, vermutlich aus den umliegenden beweideten Wiesen. F-spezifische RNA-Bakteriophagen werden durch UV-Strahlung weniger effektiv reduziert als Fäkalindikatorbakterien (vgl. 3.3.4.1). Trotzdem waren die Konzentrationen der Bakteriophagen im Kernbach (nach KA I und II) innerhalb der Betriebszeit der UV-Anlage wesentlich niedriger (bis zu 320 PBE/ 100 ml verglichen mit bis zu 68000 PBE/ 100 ml im Winter). Zwischen den beiden Probenahmestellen nach der Kläranlage kam es im Gegensatz zu FC zu keiner erneuten Zunahme von Bakteriophagen durch diffuse Quellen. Insgesamt waren die Werte für

Bakteriophagen in der Betriebszeit der UV-Anlage nach der Kläranlage um bis zu eine Zehnerpotenz höher als vor der Kläranlage.

In der Würm nach Einleitung der Kläranlage Starnberg wurden innerhalb der Betriebszeit der UV-Anlage bei drei der vier Probenahmen Salmonellen gefunden. Da aber im Ablauf der Kläranlage und auch bei allen anderen Untersuchungen während des Projekts in Liter-Proben von UV-bestrahlten Abläufen keine Salmonellen nachgewiesen wurden, ist ein Eintrag aus diffusen Quellen (z.B. Vogelkot) wahrscheinlich. Nur bei einem positiven Salmonellen-Nachweis wurde parallel dazu der Leitwert (nicht der Grenzwert) der EG-Badegewässer für GC und FC überschritten. Bei den beiden anderen Nachweisen wurden Leit- und Grenzwerte eingehalten.

#### **4.7 Wiederverkeimung von UV-bestrahlten Kläranlagenabläufen**

Die Ergebnisse der Wiederverkeimungsversuche sind schwer zu interpretieren, da sie keinen einheitlichen Trend beinhalten. Die Versuche in Schäftlarn (s. 3.7.1) zeigten, dass Gesamt- und Fäkalcoliforme ein Wiederverkeimungspotential haben, Fäkale Streptokokken und Salmonellen jedoch nicht. Dies deckt sich auch mit Literaturangaben (z. B. Baron 1997).

Man konnte weder einen klaren Einfluss der Witterung (Bewölkungsdichte) noch anderer Versuchsbedingungen wie der Wassertemperatur erkennen. Die Zunahme der Konzentration von GC und FC vom Ausgangswert bis zur maximal erreichten Konzentration betrug durchschnittlich weniger als eine Zehnerpotenz in der nicht abgedeckten Wanne. Zu welchem Zeitpunkt im Versuchsverlauf dieser Maximalwert erreicht wurde, war in den einzelnen Versuchen unterschiedlich. Hinzu kommt noch, dass auch in der abgeschatteten Wanne häufig (vorübergehende) Konzentrationszunahmen beobachtet wurden.

Nach den wenig aussagekräftigen Ergebnissen in Schäftlarn sollte bei den Versuchen auf der Kläranlage Starnberg die natürliche Situation in der Würm nach Kläranlageneinleitung simuliert werden. Dafür wurde UV-bestrahlter Kläranlagenablauf in Wannen mit Würmwasser gemischt. Ein Problem bei diesem Versuchsaufbau kann sein, dass die natürlichen Konzentrationen von Fäkalindikatorbakterien im Flusswasser oft höher sind als die Konzentrationen im UV-desinfizierten Ablauf. Es kann also wegen der Hintergrundflora evtl. schwierig sein, die Bakterien zu erfassen, die nach der Reparatur ihrer UV-Schäden wieder kultivierbar sind. Beim ersten Versuch in Starnberg (s. 3.7.2) ist bei Gesamtcoliformen in der nicht abgedeckten Wanne der Maximalwert um über eine Zehnerpotenz höher als der Ausgangswert, während des Versuchs ist jedoch eine zwischenzeitliche Abnahme festzustellen. In der abgedeckten Wanne war allerdings – zumindest bei einem Wert – eine

ähnlich starke Zunahme zu verzeichnen. Die Konzentration Fäkalcoliformer war im gesamten Versuchsverlauf sowohl in der „hellen“ als auch in der „dunklen Wanne“ recht gering und nur kleinen Schwankungen unterworfen. Bei Fäkalen Streptokokken waren keine Hinweise auf Reparaturvorgänge zu entdecken. Die Konzentrationen von GC und FC waren in der Wanne, die nur mit Würmwasser gefüllt war, recht konstant. Die Werte für Fäkale Streptokokken schwankten nicht, nahmen aber in der „hellen Wanne“ und in der „Wurm-Wanne“ tendenziell eher ab. Das Gleiche gilt für FS beim zweiten Versuch in Starnberg, eine leichte Abnahme konnte man hier auch in der abgedeckten Wanne erkennen. Beim zweiten Versuch schwankten die Konzentrationen von GC und FC zwar in der Wanne mit Würmwasser etwas, Ausgangs- und Endkonzentration waren jedoch nahezu identisch. Sowohl in der nicht abgedeckten als auch in der abgedeckten Wanne sanken die Werte für GC und FC recht schnell ab und stiegen anschließend nicht mehr an. Die bestimmten Ausgangskonzentrationen in der „dunklen Wanne“ waren weitaus höher, als sich rechnerisch aus den Werten für Wurm und Kläranlagenablauf ergeben würde.

Zum Teil kann man die uneinheitlichen Ergebnisse der Wiederverkeimungsversuche sicherlich mit der Nachweismethode für Gesamt- und Fäkalcoliforme begründen. Die mit dem verwendeten MPN-Verfahren (s. 2.2.1) erzielten Ergebnisse haben eine große Schwankungsbreite. Mit diesem Verfahren wird allerdings ebenfalls überprüft, ob die Aufgabewerte der UV-Anlagen eingehalten werden und es wird vom Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit bei der routinemäßigen Überwachung der Badegewässer in Bayern eingesetzt. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse wäre es evtl. trotzdem sinnvoller, für Wiederverkeimungsversuche auf ein anderes Verfahren (z.B. eine Membranfiltrationsmethode) zurückzugreifen. Allerdings wird es vermutlich auch mit einer anderen Nachweismethode schwierig sein, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, weil sehr viele Faktoren (Bewölkung, Sonneneinstrahlung, Luft- und Wassertemperatur, Wasserinhaltsstoffe, Ausgangskonzentrationen der Bakterien im Fluss und im Kläranlagenablauf, Durchflussmenge in der UV-Anlage etc.) eine Rolle bei der Wiederverkeimung spielen. Bezüglich der Wassertemperatur in den Wannen waren die Verhältnisse nicht immer ideal, weil das Wasser zum Teil nicht gekühlt wurde. Durch eine Erhöhung der Wassertemperatur in den Wannen könnten sich Bakterien entweder schneller vermehren oder schneller absterben. Bei den suboptimalen Bedingungen (wenig Nährstoffe und geringe Temperatur) für Fäkalindikatorbakterien im Flusswasser und Kläranlagenablauf ist ein schnelleres Absterben bei Temperaturerhöhung wahrscheinlicher, da die Bakterien „aus ihrer Ruhephase gerissen“ werden und somit weniger widerstandsfähig werden könnten. Bei

den Versuchen in Starnberg wurde die Wanne mit Würmwasser nicht gekühlt. Von einem starken Effekt der Temperaturerhöhung ist hier aber nicht auszugehen, da sich die Konzentrationen von GC, FC und FS meist nicht besonders stark veränderten. Oft war zwar eine leichte Abnahme zu verzeichnen, die jedoch sicher auch von der UV-Strahlung der Sonne verursacht wird. Alle Versuche ließen keinen Hinweis auf eine Reparatur von UV-Schäden bei Fäkalen Streptokokken erkennen. Ansonsten sind gesicherte Aussagen über FS schwierig, da die Konzentrationen stets sehr gering waren. Bei den Versuchen in Starnberg deutete sich eine Reduzierung im Versuchsverlauf an, die durch die UV-Strahlung der Sonne, durch Erhöhung der Wassertemperatur und natürliche Absterbevorgänge (abgedeckte Wanne) verursacht wird. Auf der anderen Seite sind die relativ konstanten Werte von FS (in der abgedeckten und in der nicht abgedeckten Wanne) und von GC, FC und FS in der Würm ein starker Hinweis darauf, dass es bei GC und FC im UV-bestrahlten Ablauf Reparaturmechanismen gibt. Die starken Schwankungen und geringen Unterschiede zwischen Ausgangs- und Endkonzentrationen könnten dort – neben den methodischen Schwächen – dadurch bedingt sein, dass sich Zunahme durch Reparatur und Abnahme durch natürliche UV-Strahlung und andere Einflüsse in etwa die Waage halten.

Kam es zu einer Zunahme Coliformer Bakterien in den Wiederverkeimungsversuchen, war der Unterschied zwischen Ausgangs- und Maximalwert in der Regel nicht größer als eine Zehnerpotenz. Für die in Praxis-UV-Anlagen übliche UV-Bestrahlungsdosis von ca. 40 mWs/cm<sup>2</sup> wurden ähnliche Ergebnisse von verschiedenen Autoren beschrieben (z.B. Chrtek & Popp 1991, Hassen et al. 2000). Meist handelt es sich bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten jedoch um Laborversuche, in denen Proben nach UV-Bestrahlung künstlichem Licht ohne UV-Anteile ausgesetzt wurden. Dies führt zu Ergebnissen, die weniger stark schwanken und häufig eine Wiederverkeimung deutlicher erkennen lassen als die hier vorgestellten Ergebnisse.

#### **4.8 Fazit**

Die im Forschungsvorhaben „Pathogene“ erzielten Ergebnisse machen deutlich, dass mit Hilfe einer UV-Bestrahlung von Kläranlagenabläufen der Eintrag von potentiell pathogenen Mikroorganismen in Gewässer wesentlich reduziert werden kann. Nicht-sporenbildende bakterielle Krankheitserreger wie Salmonellen und *Campylobacter* spp. werden in den UV-Bestrahlungsanlagen vollständig eliminiert. Sporenbildende Bakterien (z.B. *Clostridium perfringens*) sind widerstandsfähiger gegen UV-Strahlung, spielen aber als Infektionsquellen in Badegewässern – wenn überhaupt – nur eine untergeordnete Rolle. Parasitische Protozoen

können durch UV-Strahlung ihre Infektiosität verlieren, zu einer zahlenmäßigen Reduktion trägt jedoch auch eine Sandfiltration bei. Bezüglich der UV-Sensibilität humanpathogener Viren gibt es große Unterschiede. Die Ergebnisse für somatische Coliphagen legen den Schluss nahe, dass UV-sensiblere Viren wie Noro- und Enteroviren in UV-Anlagen effektiv zerstört werden können. Resistenteren Gruppen wie Rota- und vor allem Adenoviren, die beide bei Kleinkindern bedeutende Durchfallerreger sind, können allerdings die UV-Bestrahlung überstehen und noch infektiös sein.

Wie gut die Konzentration von Fäkalindikatorbakterien in einem Gewässer die Gesundheitsgefährdung von Badenden vorhersagt, ist seit Jahrzehnten ein strittiges Thema (Wiedenmann et al. 2004). Dies zeigte sich auch in den letzten Jahren in der Diskussion um die Novellierung der EG-Badegewässer-Richtlinie. Neben Diskussionen über die Höhe der Leit- und Grenzwerte stellte sich die Frage, ob zusätzliche Parameter, wie z.B. bestimmte Viren, in die neue Richtlinie aufgenommen werden sollten. Durch die Desinfektion von Kläranlagenabläufen können sich aufgrund unterschiedlicher UV-Sensibilität der verschiedenen Organismen Korrelationen zwischen den Konzentrationen von Fäkalindikatoren und Krankheitserregern verschieben. Dies könnte den Wert der Fäkalindikatoren als Anzeiger einer Gesundheitsgefährdung abschwächen.

Hinweise darauf, dass es zu einer bedeutenden Wiederverkeimung der UV-Anlagenabläufe aufgrund von Reparaturen der UV-Schäden durch Mikroorganismen kommt, wurden in neun Versuchen nicht gefunden.

Die UV-Bestrahlung von Kläranlagenabläufen trägt sicherlich dazu bei, die Gesundheitsgefährdung von Menschen, die in abwasserbelasteten Gewässern baden, zu verringern. Die Badenden sollten aber darauf aufmerksam gemacht werden, dass ein Infektionsrisiko bestehen bleibt, sei es durch nicht abgetötete Krankheitserreger aus den Kläranlagen oder durch Krankheitserreger aus diffusen Quellen und Regenüberläufen, die besonders bei Fließgewässern eine große Rolle spielen. An der Oberen Isar wurden entsprechende Hinweisschilder aufgestellt.

## 5 Zusammenfassung

Sowohl nicht UV-bestrahlte als auch UV-bestrahlte Kläranlagenabläufe stellen relativ schwierige Matrices für den Nachweis bestimmter Mikroorganismen dar, erstere aufgrund der großen Menge an Begleitflora, letztere aufgrund der geringen Konzentration der Zielorganismen. Die Vorversuche zur Methodenverbesserung zeigten jedoch, dass sich trotzdem Standardmethoden – ggf. mit leichten Modifikationen – einsetzen lassen.

Die Konzentrationen bestimmter Mikroorganismen können zwar in den „normalen Stufen“ (Mechanische Stufe, Belebung und ggf. Sandfiltration) einer Kläranlage um zwei bis drei Zehnerpotenzen verringert werden, sollen aber die Leit- und Grenzwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie für Fäkalindikatorbakterien eingehalten werden, ist eine Desinfektionsstufe unerlässlich. Zur Desinfektion von Kläranlagenabläufen erweist sich die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht als gut geeignet, besonders in Hinblick auf Umweltverträglichkeit und Wirtschaftlichkeit.

Die UV-Bestrahlung von gereinigtem Abwasser führt dazu, dass im Ablauf von UV-Anlagen die Leit- und Grenzwerte der EG-Badegewässer-Richtlinie für Gesamt- und Fäkalcoliforme Bakterien und für Fäkale Streptokokken eingehalten und meist weit unterschritten werden. Die Konzentrationen der Fäkalindikatorbakterien wurden mit Hilfe der UV-Bestrahlung um drei bis fünf Zehnerpotenzen im Vergleich zum nicht desinfizierten Ablauf reduziert.

Da die Abtötungsraten von pathogenen Mikroorganismen bei UV-Bestrahlung nicht unbedingt denen der Fäkalindikatorbakterien entsprechen, wurden in dieser Arbeit ausgewählte potentielle Krankheitserreger in den Kläranlagenabläufen vor und nach UV-Bestrahlung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nicht-sporenbildende bakterielle Krankheitserreger wie Salmonellen und *Campylobacter* spp. ebenfalls effektiv eliminiert wurden, so dass diese beiden Gattungen im Laufe des Projektzeitraums im UV-bestrahlten Ablauf (1 Liter-Proben) nie nachgewiesen werden konnten. Ähnlich hohe Abtötungsraten ergaben sich für somatische Coliphagen (mehr als vier Zehnerpotenzen), die sich vermutlich auf relativ UV-sensible humanpathogene Viren (z.B. Noro- und Enteroviren) übertragen lassen. Die Konzentrationen der parasitischen Protozoen Cryptosporidien und Giardien wurden zwar in der UV-Anlage verringert, Ergebnisse aus der Kläranlage Bad Tölz geben jedoch einen Hinweis darauf, dass der Sandfilter, der der UV-Anlage vorgeschaltet ist, den größeren Anteil an der Entfernung der Parasiten haben könnte. Der bakterielle Sporenbildner *Clostridium perfringens* erwies sich mit einer Reduktionsleistung von nur einer Zehnerpotenz erwartungsgemäß als recht UV-resistent. F-spezifische RNA-Bakteriophagen, die als Modellorganismen für UV-resistente humanpathogene Viren wie Rota- und vor allem

Adenoviren fungieren, wurden nur um ca. zwei Zehnerpotenzen reduziert. Die positiven PCR-Ergebnisse für Rota- und Adenoviren nach UV-Bestrahlung lassen zwar keinen Schluss darauf zu, ob noch infektiöse Viruspartikel vorhanden waren, dies ist jedoch durchaus möglich. Durch zusätzliche Untersuchungen mit Hilfe von Zellkulturen gelang auch in einem Fall der Nachweis infektiöser Adenoviren im Ablauf der UV-Anlage.

Bezüglich der Korrelationen zwischen Konzentrationen von Fäkalindikatoren und anderen Mikroorganismen sind gewisse Verschiebungen zu erkennen, wenn man die Ergebnisse vor und nach UV-Bestrahlung miteinander vergleicht. So war in UV-bestrahlten Proben keine Korrelation zwischen den Konzentrationen der Fäkalindikatorbakterien und der Bakteriophagen mehr erkennbar.

Der Gehalt an suspendierten Feststoffen und der Wert für die UV-Transmission bei 254 nm lassen nicht unbedingt einen Schluss darüber zu, wie effektiv die UV-Bestrahlung auf Mikroorganismen wirkt. Es gibt anlagenspezifische Unterschiede und die Größe der Feststoffpartikel scheint eine bedeutende Rolle zu spielen.

Bestimmte Mikroorganismen sind in der Lage, UV-Schäden zu reparieren. Dies könnte eine Wiederverkeimung UV-bestrahlter Kläranlagenabläufe nach sich ziehen. Die Versuche zu dieser Fragestellung weisen auf eine geringe Bedeutung dieses Mechanismus hin, u.a. vermutlich auch deshalb, weil sich reparierte Schäden und durch die natürliche Sonneneinstrahlung neu auftretende Schäden in etwa die Waage halten.

Obwohl sich die hohen Reduktionsleistungen von UV-Abwasserdesinfektionsanlagen für Fäkalindikatorbakterien nicht ohne Weiteres auf alle Krankheitserreger übertragen lassen, ist die Abwasserdesinfektion eine wichtige Maßnahme zum Schutz der Gesundheit von in abwasserbelasteten Fließgewässern badenden Menschen. Trotzdem bleibt ein Infektionsrisiko bestehen, zum einen durch bei der Desinfektion evtl. nicht abgetötete Krankheitserreger aus den Kläranlagen, zum anderen aus Regenüberläufen und diffusen Eintragsquellen wie Abschwemmungen von landwirtschaftlich genutzten Flächen. Sogar an der Oberen Isar, die u.a. aufgrund der geringen diffusen Einträge für das Pilotvorhaben zur Abwasserdesinfektion ausgewählt wurde, zeigte sich, dass die diffusen Quellen nicht zu vernachlässigen sind und besonders Starkregenereignisse zu Leit- und Grenzwertüberschreitungen der EG-Badegewässer-Richtlinie führen können. Tausende Menschen baden jeden Sommer in der Oberen Isar, auch vor dem Bau der UV-Anlagen war das so. Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, Maßnahmen zum Gesundheitsschutz der Badenden zu ergreifen. Wegen der Unwägbarkeiten der diffusen Belastungen reicht eine Abwasserdesinfektion jedoch nicht aus, um aus einem zum Baden genutzten Fließgewässer ein offizielles EG-Badegewässer zu machen.



## 6 Literaturverzeichnis

- Baggi, F., Demarta, A. & Peduzzi, R. (2001): "Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria." *Research in Microbiology* 152(8): 743-751.
- Baron, J. (1997): "Repair of wastewater microorganisms after ultraviolet disinfection under seminatural conditions." *Water Environment Research* 69: 992-998.
- Bast, E. (1999): "Mikrobiologische Methoden." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A. & Lebaron, P. (2000): "Diversity of Salmonella Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions." *Applied and Environmental Microbiology* 66(4): 1544-1552.
- Chang, J.C., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G. & Johnson, J.D. (1985): "UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms." *Applied and Environmental Microbiology* 49(6): 1361-1365.
- Chrtek, S. & Popp, W. (1991): "UV disinfection of secondary effluents from sewage treatment plants." *Water Science and Technology* 24(2): 343-346.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Höller, C., Lambiri, M., Mirolo, G., Moreno, B., Niemi, N., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V. & Jofre, J. (2002): "Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe." *Water Research* 36(20): 4963-4974.
- de Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., van den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R. & Duizer, E. (2004): "Calicivirus Inactivation by Nonionizing (253.7-Nanometer-Wavelength [UV]) and Ionizing (Gamma) Radiation." *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5089-5093.
- EG (1976): "Richtlinie des Rates vom 08.12.1975 über die Qualität der Badegewässer (76/160/EWG)." *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 31: 1-7.
- Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A. & Damelinourt, J.J. (2000): "UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device." *Bioresource Technology* 74(2): 141-150.
- Havelaar, A.H., Nieuwstad, T.J., Meulemans, C.C.E. & van Olphen, M. (1991): "F-specific RNA bacteriophages as model viruses in UV disinfection of wastewater." *Water Science and Technology* 24(2): 347-352.
- He, J.-W. & Jiang, S. (2005): "Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 71(5): 2250-2255.
- Koivunen, J., Lanki, E., Rajala, R.L., Siitonen, A. & Heinonen-Tanski, H. (2001): "Determination of salmonellae from municipal wastewaters." *Water Science and Technology* 43(12): 221-4.
- Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negrodo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.O., Torven, M., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szucs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duynhoven, Y. & Koopmans, M. (2004): "Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant." *Lancet* 363(9410): 682-8.
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N. & Fujiwara, M. (2002): "Efficacy of UV Irradiation in Inactivating *Cryptosporidium parvum* Oocysts." *Applied and Environmental Microbiology* 68(11): 5387-5393.

- Popp, W., Huber, S. & Kexel, S. (2004): "Abwasserdesinfektion zur Verbesserung der Badegewässerqualität an der Oberen Isar." Wasser und Abfall 5: 15-18.
- Popp, W., Roth, D. & Schindler, P.R.G. (2000): "Bakteriologisch-hygienische Wasserqualität an der Oberen Isar - Zustand und Maßnahmen zur Verbesserung." gwf Wasser-Abwasser 141(12): 843-848.
- Pusch, D., Oh, D.Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I. & Schreier, E. (2005): "Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters." Archives of Virology 150: 929-947.
- Sachs, L. (1993): "Statistische Methoden." 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Schleypen, P. & Grägel, W. (2000): „Abwasserdesinfektion auf der Kläranlage der Stadt Bad Tölz.“ gwf Wasser-Abwasser 141(12): 849-853.
- Schöler, A. (2002): "UV-Desinfektion von Kläranlagenabläufen unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der suspendierten Stoffe." Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft Band 170.
- Sinton, L.W., Finlay, R.K. & Reid, A.J. (1996): "A simple membrane filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100-ml water samples." Journal of Microbiological Methods 25(3): 257-269.
- Sommer, R., Weber, G., Cabaj, A., Wekerle, J., Keck, G. & Schaubberger, G. (1989): "UV-inactivation of microorganisms in water." Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 189(3): 214-24.
- Tate, C.R., Miller, R.G., Mallinson, E.T., Douglass, L.W. & Johnston, R.W. (1990): "The isolation of salmonellae from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin." Poultry Science 69(5): 721-726.
- Tree, J.A., Adams, M.R. & Lees, D.N. (1997): "Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a 'viral indicator'." Water Science and Technology 35(11-12): 227-232.
- Umweltbundesamt (1995): "Mikrobiologische Untersuchungsverfahren von Badegewässern nach Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG." Bundesgesundheitsblatt 10/95: 385-396.
- Wiedenmann, A., Krüger, P., Gommel, S., Eissler, M., Hirlinger, M., Paul, A., Jüngst, K. & Dietz, K. (2004): "Epidemiological determination of disease risks from bathing." Abschlussbericht zu einem F- und E-Vorhaben (FKZ 298 61 503) im Auftrag des Umweltbundesamtes, Berlin.

## **Normvorschriften**

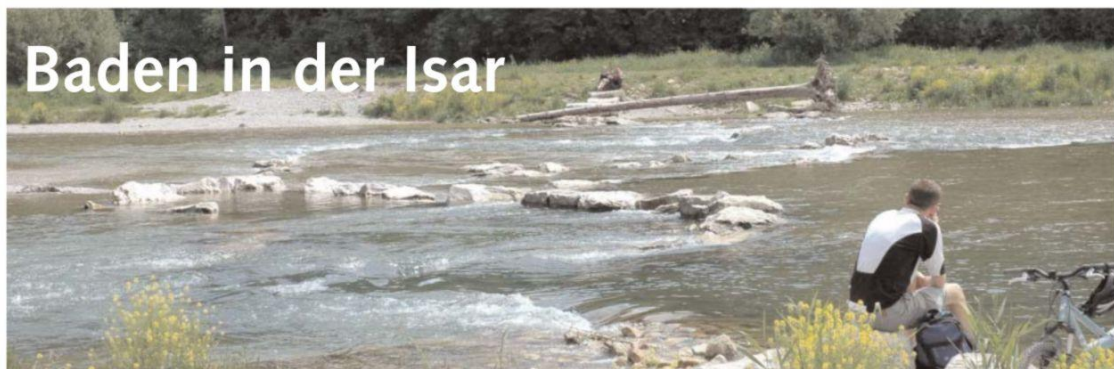
- DIN (2000): „DIN EN ISO 7899-2: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken, Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration (ISO 7899-2: 2000): Deutsche Fassung EN ISO 7899-2“
- DIN (2001): „DIN EN ISO 10705: Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Bakteriophagen  
Teil 1: Zählung von F-spezifischen RNA-Bakteriophagen (ISO 10705-1: 1995): Deutsche Fassung EN ISO 10705-1  
Teil 2: Zählung von somatischen Coliphagen (ISO 10705-2: 2000): Deutsche Fassung EN ISO 10705-2“
- DIN (2005): „DIN EN 872: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung suspendierter Stoffe – Verfahren durch Abtrennung mittels Glasfaserfilter: Deutsche Fassung EN 872“
- ISO (2003a): „ISO/DIS 19250: Water quality – Determination of Salmonella species [revision of ISO 6340: 1995]“
- ISO (2003b): „ISO/DIS 17995: Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant campylobacters“

## Danksagung

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz danken wir für die Förderung des Vorhabens.

Weiterhin gilt unser Dank den Kolleginnen und Kollegen im Mikrobiologie-Labor des LfU für die Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Unser Dank richtet sich auch an das Personal der beteiligten Kläranlagen für die Möglichkeit, die Versuche durchzuführen und für die Auskünfte über Messdaten der Anlagen.



Die Behandlung der Kläranlagenabläufe mit ultraviolettem Licht vermindert den Eintrag von Keimen in die Isar im Zeitraum vom 15. April bis 30. September. Damit leisten der Freistaat Bayern und die zuständigen Kommunen einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der hygienischen Wasserqualität. Insbesondere bei Starkregen kann es dennoch zu Einträgen von Krankheitserregern in die Isar und dadurch zu

einem vorübergehenden Infektionsrisiko für Badende kommen. Die Isar ist ein Wildfluss, in dem **keine konstante Badegewässerqualität** garantiert werden kann. Seien Sie sich deshalb bewusst, dass Sie in eigener Verantwortung baden. Dies betrifft auch Unfallgefahren. Bewahren Sie die Schönheit der Natur und nehmen Sie Müll, Flaschen usw. wieder mit. Damit schützen Sie sich und auch andere vor möglichen Unfällen.



Weitere Informationen unter [www.wasser.bayern.de](http://www.wasser.bayern.de) und [www.muenchen.de/wasser](http://www.muenchen.de/wasser)

Hinweistafel an der Isar