

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der  
Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. M. Hess)

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches  
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Martin Wagner)

**Zum Vorkommen von Pseudomonaden, Aeromonaden und Vibrionen und deren  
Phagen in ausgewählten Seen der Steiermark und Kärntens**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

**Sabrina-Lisa Rupitz**

Wien, Februar 2022

Betreuerin:

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert Dipl.ECVPH  
(Abteilung für Lebensmittelhygiene und -technologie)

Begutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dipl.ECVPH Dr.med.vet. Peter Paulsen

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des Erstellens dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Als allererstes gebührt mein Dank meiner Betreuerin Frau Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH für die Bereitstellung dieses Themas, sowie die Hilfe beim Schreiben dieser Diplomarbeit und die Bereitschaft mir bei Fragen stets freundlich und unterstützend zur Seite zu stehen.

Ein sehr großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Dmitri Sofka für die sehr große Hilfe beim Durchführen der Versuche und die nette Gesellschaft im Labor!

Ich bedanke mich vom Herzen bei meinen Eltern, ohne sie wäre das Studium ohnehin nicht möglich gewesen. Besonderer Dank kommt meinem Papa zu, der mich immer unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gebührt all meinen Freunden und Bekannten für die Unterstützung während meiner Studienzeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr.med.vet. Grubelnik, die mich stets ermutigt hat.

Ich bedanke mich außerdem beim Labor des Vereins zur Förderung der Veterinärmedizinischen Labordiagnostik (VFL), Schillerring 13, 3130 Herzogenburg, Österreich für die Identifikation der Proben mittels MALDI-TOF.

## INHALTSVERZEICHNIS

1	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b> .....	1
	EINLEITUNG.....	1
2	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	4
2.1	SEEN IN ÖSTERREICH.....	4
2.2	<i>AEROMONAS</i> .....	6
2.2.1	Eigenschaften, Vorkommen und Präferenzen.....	6
2.2.2	<i>Aeromonas</i> als Krankheitserreger: Mensch und Aquakultur.....	7
2.2.3	Pathogenität .....	8
2.2.4	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen.....	9
2.3	<i>PSEUDOMONAS</i> .....	11
2.3.1	Eigenschaften, Präferenzen.....	11
2.3.2	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen.....	11
2.3.3	Gesundheitsrisiken .....	12
2.3.4	Vorkommen .....	14
2.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.3.6	Pathogenität .....	15
2.4	<i>VIBRIO</i> .....	16
2.4.1	Eigenschaften, Vorkommen.....	16
2.4.2	Antibiotika und Antibiotikaresistenzen.....	17
2.4.3	<i>Vibrio cholerae</i> .....	18
2.4.4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> und <i>Vibrio vulnificus</i> .....	19
2.5	PHAGEN .....	20
2.5.1	<i>Pseudomonas</i> und Phagen.....	21
2.5.2	<i>Vibrio</i> und Phagen .....	22

2.5.3	<i>Aeromonas</i> und Phagen .....	23
3	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	24
3.1	MATERIAL .....	24
3.1.1	Probenmaterial .....	24
3.1.2	Geräte und sonstige Materialien .....	24
3.1.3	Nährmedien und Reagenzien .....	25
3.1.4	Bakterien .....	26
3.2	METHODEN .....	27
3.2.1	Proben und Probenentnahme .....	27
3.2.2	Nachweis Direktkultur .....	31
3.2.3	Anzüchten der Wirtsstämmen für einen Phagennachweis .....	31
3.2.4	Phagennachweis .....	33
3.2.5	Auswertung der Platten.....	34
3.2.6	Glucose Fermentationstest.....	34
3.2.7	Cytochrom-Oxidase-Test.....	35
3.2.8	Antibiogramm .....	36
4	<b>ERGEBNISSE</b> .....	37
4.1	AUSWERTUNG DER PLAQUES.....	40
4.2	TCBS PLATTEN AUSWERTUNG .....	40
4.3	GLUCOSE FERMENTATIONSTEST .....	42
4.4	CYTOCHROM-OXIDASE TEST .....	42
4.5	ANTIBIOGRAMME .....	43
5	<b>DISKUSSION</b> .....	47
6	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	51
7	<b>SUMMARY</b> .....	53
8	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	55

9	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	57
10	<b>ANHANG</b> .....	64
10.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	64
10.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	64
10.3	DATENQUELLEN MESSSTELLEN.....	65
10.3.1	Datenquelle Steiermark .....	65
10.3.2	Datenquelle Kärnten .....	65

# 1 Einleitung und Fragestellung

## Einleitung

*Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio*: was haben diese 3 Bakterien gemeinsam? Sie sind alle drei typischerweise in natürlichen Gewässern vorkommende Bakterien. Aber sind sie auch in ausgewählten Badeseen in Kärnten und der Steiermark vorhanden und gehören sie eventuell zur natürlichen Flora in österreichischen Badeseen? Und wie sieht es mit deren Begleitern, den Bakteriophagen, aus?

Natürlicherweise bieten Süßwasserseen Lebensräume für sämtliche Organismen, die für Süßwasserökosysteme von Bedeutung sind und außerdem gerne von Menschen für Erholungsmöglichkeiten genutzt werden (PURMALIS et al., 2019).

Die Qualität von österreichischen Badeseen wird jährlich in der Badegewässerdatenbank festgehalten. Unsere Badegewässer unterliegen einem regelmäßigen Badegewässer-Monitoring, indem sie europaweit standardisiert untersucht werden (AGES, 2020). Über die ausgezeichnete Wasserqualität wird zu Beginn der Badesaison jährlich in den Medien Bericht erstattet (AMT DER KÄRNTNER LANDESREGIERUNG ABT. 8 – UMWELT, ENERGIE UND NATURSCHUTZ, 2020; KÄRNTEN.ORF, 2021; STEIERMARK.ORF, 2019). Allerdings umfassen diese Kriterien nicht die in dieser Studie untersuchten Bakterien.

Im Jahr 2019 wurde im österreichischen Rundfunk von Krankenhauskeimen in österreichischen Badeseen berichtet. Unter anderem ist hier die Rede von *Pseudomonas aeruginosa* (ORF, 2019).

*Pseudomonas* besitzt eine hohe Artenvielfalt und ist eine häufige allgegenwärtige Bakteriengattung, deren Vorkommen von der Antarktis bis zu den Tropen reicht und in allen Nischen der Umgebung vorkommen kann (PEIX et al., 2009). Innerhalb dieser Gattung zählt *Pseudomonas aeruginosa* zu einem häufig für Infektionen verantwortlichen Erreger. Dieses Bakterium ist in vielen Lebensräumen zu finden und wird als allgegenwärtig in Böden und Wasser beschrieben, zeigt aber eine Tendenz an Orten vorzukommen, die mit menschlicher Aktivität verbunden sind. Besonders *Pseudomonas aeruginosa* sorgt auch bei gesunden Menschen für Ohrenerkrankungen und ist einer der Hauptverursacher von nosokomialen

Infektionen und zeigt sich verantwortlich für akute und chronische Infektionen (CRONE et al., 2020).

Gerade weil Wunden oder Verletzungen häufig in Gewässern wie See, Meer oder Flusswasser einem Bakterien-Milieu ausgesetzt sind und zu diesem Milieu häufig Bakteriengattungen wie *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio* zählen (NOONBURG, 2005), ist eine Untersuchung von Wasserproben aus heimischen Badeseen auf diese Bakteriengattungen von großem Interesse.

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführte Probenziehung erfolgte in den Sommermonaten, wo üblicherweise die Badeseen von Menschen für Freizeitaktivitäten genutzt werden. Vor allem die Bakteriengattung *Aeromonas* kommt häufig in warmen Perioden vor. Krankheitserreger überleben länger im Sediment, daher wurde das bei der Probenziehung berücksichtigt (DONG et al., 2019). *Aeromonas* gilt als autochthon in Gewässern und wird in den verschiedensten Gewässern vorgefunden. Das Bakterium *Aeromonas* wird häufig in Verbindung mit Infektionen sowohl beim Mensch als auch beim Tier gebracht und ist insbesondere für immungeschwächte Personen nicht zu unterschätzen (JANDA u. ABBOTT, 2010).

Auch Bakterien der Gattung *Vibrio* vermehren sich eher in der warmen Jahreszeit und werden immer häufiger isoliert. *Vibrio* können in entsprechenden Konzentrationen für zahlreiche Erkrankungen verantwortlich sein. Erkrankungen wie Gastroenteritis, Wundinfektionen, Septikämien oder die bekannte Durchfallerkrankung Cholera nehmen weltweit zu (VEZZULLI et al., 2013). In Österreich wurden ebenfalls einige Erkrankungsfälle verzeichnet (HUHULESCU et al., 2007). Demzufolge empfiehlt sich die Untersuchung und Beobachtung der heimischen Badeseen auf *Vibrio*.

Bakteriophagen sind ebenfalls allgegenwärtig in der Natur vorkommend und sind nahe metabolisch aktiven Bakterien in hoher Anzahl vorzufinden. Häufig können Phagen dort isoliert werden, wo auch ihre Wirtsbakterien ihre Lebensräume einnehmen (KUMARI et al., 2009). Phagen können die Dichte von Bakterienpopulationen in Gewässern regulieren, sind in der Lage, mit ihren Wirten zu interagieren (KOKJOHN u. SAYLER, 1991) und können zusätzlich zur Überwachung von Krankheitserregern dienen (JI et al., 2021).

In dieser Arbeit soll mithilfe von mikrobiologischen Tests der Fragestellung nachgegangen werden, ob und in welchem Ausmaß diese drei Bakterien in ausgewählten Badeseen in den

Sommermonaten vorhanden sind und es soll der Hypothese nachgegangen werden, ob Bakteriengattungen wie *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio* in den Sommermonaten in ausgewählten österreichischen Badeseen gemeinsam mit ihren Phagen zu detektieren sind.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Seen in Österreich

Österreichs Badegewässer schneiden im Jahr 2019 europaweit mit dem zweiten Platz ab und zeigen ausgezeichnete Qualität (EUROPÄISCHE UMWELTAGENTUR, 2020). Unter Einhaltung der Badegewässerrichtlinie werden jährlich in Europa über 22.000 Badegewässer überprüft. Dreißig europäische Länder melden ihre Informationen zum Badegewässermanagement sowie Überwachungsdaten an die Europäische Umweltagentur, die dann jährlich im Europäischen Badegewässerbericht dokumentiert werden. Bei dieser Überwachung ist das Führen eines vor der Badesaison erstellten Überwachungskalenders Voraussetzung. Dabei sind wichtige Kriterien wie die Entnahme einer Probe in der Vorsaison kurz vor Beginn jeder Badesaison, die Entnahme und das Analysieren von mindestens vier Proben während der Badesaison sowie die Einhaltung des Intervalls von maximal einem Monat zwischen den Probenentnahmen umzusetzen (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2021).

Badegewässer werden entsprechend der Badegewässerrichtlinien beurteilt. Diese Richtlinie, Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, umfasst zwei mikrobiologische Parameter: *Escherichia coli* und Darmenterokokken. Die Gewässer werden in ausgezeichnete, gute sowie ausreichende Qualität eingeteilt. Um eine ausgezeichnete Qualität in Badeseen zu erreichen, dürfen 200 koloniebildende Einheiten intestinale Enterokokken und 500 koloniebildende Einheiten *Escherichia coli* pro 100ml Seewasser nicht überschritten werden (RICHTLINIE 2006/7/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES, 2006). Im Jahr 2020 konnten in Österreich 97,7 Prozent der Binnenbadegewässer ausgezeichnete Wasserqualität erreichen. Von den 261 gemeldeten Badegewässern wurde keines als mangelhaft deklariert. Zudem verbessert sich die Wasserqualität seit dem Jahr 1997 (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2021).

Eine zusätzliche Quelle, um eine Übersicht über die einzelnen österreichischen Badegewässer zu erhalten, bietet die Österreichische Agentur für Ernährungssicherheit (AGES). In einer von der AGES geführten Badegewässerdatenbank ist es möglich, in jedem Bundesland die einzelnen Badestellen sowie die Anzahl von Enterokokken und *Escherichia coli*, die Sichttiefe, die Wassertemperatur und den Status der Badegewässerqualität einzusehen (AGES, 2020).

In einer Studie (LEPUSCHITZ et al., 2019) aus dem Jahr 2017 wurden 27 Badestellen in Österreich beprobt und auf antibiotikaresistente Bakterien untersucht. Davon wurden 23 negativ auf potenziell pathogene Bakterien beurteilt. Allerdings wurden in vier Badeseen antibiotikaresistente Bakterien gefunden: *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae*. Betroffen waren die Bundesländer und Badestellen Kärnten Ossiacher See, Burgenland Stausee Forchtenstein, Niederösterreich Donaualtarm Greifenstein und Vorarlberg Bregenz Wochehafen. Das aus dem Ossiacher See gefundene Isolat *Enterobacter mori* war resistent gegenüber Imipenem, Meropenem, Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Moxifloxacin. *Enterobacter cloacae* aus dem Donaualtarm Greifenstein zeigte Resistenzen gegenüber Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/ Tazobactam, Cefotaxime, Ceftazidime, Aztreonam sowie Fosfomycin. Das *Escherichia coli* Isolat aus dem Bregenzer Wochehafen war resistent gegenüber Cefuroxime-Axetil, Cefotaxime, Ampicillin und zeigte eine intermediäre Resistenz gegenüber Cefepime und Aztreonam. Das im Stausee Forchtenstein gefundene *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat zeigte eine intermediäre Resistenz gegenüber Aztreonam, hingegen war das Isolat sensibel gegenüber Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Cefepim, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin und Ciprofloxacin. Bei weiteren Laboruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass 2 von den 4 Isolaten Plasmide trugen: *Escherichia coli* trug ein Plasmid und das *Enterobacter cloacae* Isolat sogar drei (LEPUSCHITZ et al., 2019).

Die gefundenen antibiotikaresistenten Keime stellen kein gesundheitliches Risiko für gesunde Personen mit intaktem Immunsystem dar, wenn die EU-Badegewässerrichtlinie eingehalten wurde. Sie zeigen aber ein Risiko der Verbreitung multiresistenter Bakterien über die aquatische Umwelt. Diese Erkenntnis resultiert aus dem Vorfinden von Plasmiden in den antibiotikaresistenten Isolaten, welche auch an einer horizontalen Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in der aquatischen Umgebung beteiligt sein könnten (LEPUSCHITZ et al., 2019).

## 2.2 *Aeromonas*

### 2.2.1 Eigenschaften, Vorkommen und Präferenzen

*Aeromonas* sind gram-negative, stabförmige, nicht-sporenbildende, fakultativ anaerobe Bakterien, die ursprünglich zu den *Vibrionaceae* gezählt wurden, nun aber in ihre eigene Familie, die *Aeromonadaceae*, eingeordnet werden. Sie sind hauptsächlich aquatische Bewohner und können sowohl im Süßwasser als auch im Abwasser gefunden werden (COLWELL et al., 1986).

Häufig werden *Aeromonas* auch aus Flüssen, behandelten Abwässern (HARNISZ u. KORZENIEWSKA, 2018) und aus Trinkwasser (PABLOS et al., 2011) isoliert. Aus dem Trinkwasser wird häufig die Spezies *Aeromonas hydrophila* (RATHER et al., 2019) und aus Leitungswassersystemen die Spezies *Aeromonas jandaei* isoliert (SHUANG et al., 2020). Das Vorfinden von *Aeromonas* im Trinkwasser kann mit der Konzentration des Chlorgehaltes zusammenhängen. In zwei beschriebenen Studien von BRAVO (2019) aus Spanien liegt die Inzidenz von *Aeromonas* im Trinkwasser zwischen 6,9 Prozent und 8,9 Prozent. In allen positiven Proben war die Chlorkonzentration niedrig.

Auch die Temperatur kann Einfluss auf das Vorkommen von *Aeromonas* haben und kann laut HOLMES et al., 1996 bei höheren Temperaturen eine große Populationsdichte erreichen. Es scheint eine Präferenz für hohe Konzentrationen in den wärmeren Monaten sowohl für Süßwasserseen, als auch für chloriertes Trinkwasser zu geben (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005). In einer Studie von BARON et al., 2017 konnte *Aeromonas* spp. in allen untersuchten Flüssen sowohl im Winter als auch im Sommer nachgewiesen werden und in dieser Studie unterschied sich die Häufigkeit der Artenisolierung nicht zwischen Sommer und Winter.

Einige *Aeromonas*-Spezies weisen Temperaturpräferenzen auf, die wiederum auf unterschiedlichste aquatische Vorkommen zurückzuführen sind. Grob kann man diese aquatischen Umgebungen in Süßwasser, Meerwasser, Trinkwasser und Abwasser aufteilen. Im Meerwasser treten *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas sobria* am häufigsten in den Sommer- und Herbstmonaten auf, *Aeromonas caviae* hingegen wird in der Wintersaison in großer Zahl beobachtet. Auch in Abwasser und Gewässern mit zugeführtem Abwasser wird *Aeromonas* jahreszeitlich verschieden häufig nachgewiesen. Während die *Aeromonas* Populationen in den Teichen unabhängig von der Jahreszeit von *Aeromonas caviae* dominiert werden, sind diese im Abfluss nur in den Wintermonaten dominant. *Aeromonas*

*sobria* überwiegt hingegen von Frühling bis Herbst (HOLMES et al., 1996). Generell kann man sagen, dass *Aeromonas* in der Lage ist sich über einen breiten Temperaturbereich von ca. 4 bis 45 Grad Celsius zu vermehren, mit einem Temperatur Optimum von 22 bis 33 Grad Celsius (BRAVO, 2019).

In einer Studie (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005) zeigte sich eine Übereinstimmung im quantitativen Nachweis zwischen dem Vorkommen von *Aeromonas* und Fäkalcoliformen. Ein Zusammenhang zwischen mesophilen *Aeromonas* spp. in Gewässern und dem Verschmutzungsgrad wurde schon mehrmals von verschiedenen Autoren berichtet (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005). In Gewässern mit Fäkalienschmutzung dominierte *Aeromonas caviae*, was für ein Wachstum dieser Spezies unter nährstoffreichen Bedingungen schließen lässt (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005). Von *Aeromonas sobria* hingegen wird berichtet, dass diese Spezies eher in unverschmutzten Gewässern wie Brackwasser isoliert werden kann (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005).

### 2.2.2 *Aeromonas* als Krankheitserreger: Mensch und Aquakultur

*Aeromonas caviae* kann nicht nur mehrfach aus nährstoffreichen Gewässern isoliert werden, sondern häufig auch aus Fischteichen. Bei der Beprobung von Fischkiemen sind *Aeromonas veronii biovar sobria* und *Aeromonas hydrophila* die vorherrschenden Arten. Generell können *Aeromonas* häufig in Gewässern nachgewiesen werden, die mit Fischen besiedelt sind. In knapp 70 Prozent zeigten Wasserproben aus Fischteichen eine starke Verkeimung mit *Aeromonas* spp. (RATHER et al., 2019).

In einer Studie von HU et al., 2012 war *Aeromonas veronii* die am häufigsten isolierte Art und wurde sowohl in kranken (60 %) als auch in gesunden Fischen (75 %) gefunden. Im Vergleich dazu, war *Aeromonas hydrophila* signifikant häufiger in kranken (70 %) als in gesunden (20 %) Fischen nachzuweisen. Das im Wasser allgegenwärtige Bakterium *Aeromonas hydrophila* ist pathogen für poikilotherme Tiere wie Fische, Amphibien, Schildkröten und Schlangen. Dieses Bakterium ist für die hämorrhagische Septikämie bei Fischen verantwortlich und sorgt für große wirtschaftliche Schäden in der Aquakultur (LIU et al., 2020).

Von den momentan 36 beschriebenen *Aeromonas*-Arten sind 19 als neue Krankheitserreger bekannt, die als pathogen für den Menschen gelten. *Aeromonas* sind somit nicht nur für

Fische und Wassertiere relevante aquatische Krankheitserreger, sondern spielen auch beim Menschen, besonders bei immungeschwächten Personen, eine wesentliche Rolle. Sowohl gastrointestinale als auch extraintestinale Erkrankungen, Wundinfektionen, Septikämien, Gastroenteritiden und lebensbedrohliche nekrotisierende Fasziiitis können die Folgen einer Infektion sein (BRAVO, 2019).

### 2.2.3 Pathogenität

Zur Gattung *Aeromonas* zählen etwa 97 Serotypen, die aus Referenzstämmen von *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* und *Aeromonas sobria* serotypisiert wurden (BRAVO, 2019). Nur einige davon können mit der Virulenz von Fischen in Zusammenhang gebracht werden. Serotyp O11 ist beim Menschen für schwerwiegende Erkrankungen wie Meningitis, Peritonitis und Septikämie verantwortlich. Hingegen wird Serotyp O34 mit Wundinfektionen beim Menschen sowie Septikämien bei Fischen assoziiert (BRAVO, 2019). Es wurde festgestellt, dass die O-Antigenstruktur virulenter Stämme von *Aeromonas hydrophila* einige Ähnlichkeiten mit der O-Antigenstruktur von *Aeromonas salmonicida* aufweist (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005). In einer Studie von VINCENT et al., 2019 konnte erforscht werden, dass es zu einer Fehlidentifizierung mesophiler *Aeromonas salmonicida* Stämme und *Aeromonas hydrophila* kommen kann und eine Identifizierung mit molekularen Methoden essenziell ist, um Isolate taxonomisch korrekt identifizieren zu können.

*Aeromonas salmonicida* ist ein Fischpathogener, der Erkrankungen wie Furunkulose oder Septikämien verursachen kann und in der Fischindustrie zu enormen wirtschaftlichen Schäden führt (KHOR et al., 2015). *Aeromonas salmonicida* kann nicht nur mit Fischkrankheiten in Verbindung gebracht werden, sondern sorgt auch beim Menschen für Infektionen (VINCENT et al., 2019).

Die Pathogenese von *Aeromonas* wird durch eine Reihe von Virulenzfaktoren beeinflusst und diese sind verantwortlich Symptome verschiedener Fischkrankheiten auszulösen, wie Flossenfäule, äußere ulzerative Läsionen, Augengeschwüre, Anorexien, Septikämien, hämorrhagische Flossen sowie Nierentubulusnekrosen (ZDANOWICZ et al., 2020). Zu diesen genannten Virulenzfaktoren gehören hämolytische Toxine wie das Aerolysin- verwandte zytotoxische Enterotoxin, hitzestabile zytotonische Toxine, ein hitzelabiles zytotonisches Enterotoxin, Hämolysin und Aerolysin (SHUANG et al., 2020), sowie die

Synthese weiterer Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren wie Proteasen, Gelatinasen, Lipasen, Elastasen, Phospholipasen, Desoxyribonukleasen und Adhäsine (ZDANOWICZ et al., 2020).

Zudem sezernieren *Aeromonas* verschiedene Hämolsine, wovon Aerolysin als vorherrschendes Enterotoxin gilt. Dieses zytolytische Toxin ist in der Lage, durch die Bildung von Poren in der zytoplasmatischen Membran eine osmotische Lyse von Erythrozyten zu bewirken (BRAVO, 2019). Aerolysin ist ein Hauptfaktor für die Pathogenität von *Aeromonas hydrophila* (LAKSHMANAPERUMALSAMY et al., 2005).

Die aus gesunden und kranken Fischen sowie aus Wasserproben isolierten *Aeromonas* spp. weisen häufig nicht nur eine, sondern mehrere Virulenzgene auf (HU et al., 2012). Um die pathogenen Eigenschaften von *Aeromonas* wie das Anhaften an Wirtszellen, das Eindringen in diese um sie dann zu zerstören sind multifaktorielle Virulenzfaktoren nötig (FERNÁNDEZ-BRAVO u. FIGUERAS, 2020).

#### 2.2.4 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen

Die prophylaktische Verwendung von Antibiotika kommt in Entwicklungsländern mit wachsender Aquakulturindustrie häufig zum Einsatz. Durch Hinweise, dass antibiotikaresistente Bakterien von aquatischen in die terrestrische Umgebung übergehen können, kam es durch Richtlinien in vielen Ländern zur drastischen Einschränkung von Antibiotikaeinsätzen in der Aquakultur (CABELLO, 2006). Allerdings bleibt die unbeschränkte Verwendung von Antibiotika in Ländern wie Chile und China, welche zu der wachsenden Aquakulturindustrie gehören, weiterhin aufrecht (CABELLO, 2006).

Auch in Israel werden Antibiotika prophylaktisch in der Fischzucht eingesetzt. Damit sollen das Wachstum gefördert und sich die Sterblichkeit verringert werden. *Aeromonas*-Stämme haben die Fähigkeit, Antibiotikaresistenz-Gene zu erwerben und auszutauschen. Aufgrund dessen werden sie immer wieder zur Kontrolle von Antibiotikaresistenzen in Gewässern als Indikatorbakterien genutzt (PATIL et al., 2016).

Die Häufigkeit von Multiresistenzen und die Entwicklung resistenter Stämme resultiert aus dem Missbrauch von antimikrobiellen Wirkstoffen. Ein häufiges Auftreten mehrfacher Antibiotikaresistenzen bei *Aeromonas*-Arten konnten in den von RAWAL et al., 2016 untersuchten Seen festgestellt werden. Demzufolge könnten Seen als Reservoir für Resistenz-Determinanten dienen. Multiresistente *Aeromonas veronii* zeigten sich vor allem

resistent gegenüber Ampicillin, Penicillin und Vancomycin. *Aeromonas hydrophila*-Isolate erwiesen sich besonders häufig als resistent gegenüber Ampicillin, Penicillin, Vancomycin und Kanamycin. Keine Resistenzen wurden in dieser Studie gegenüber Gentamicin, Cefixim, Ciprofloxacin oder Chloramphenicol nachgewiesen (RAWAL et al., 2016).

Hingegen fand die Forschergruppe um CARNELLI et al., 2017 häufig Resistenzen gegenüber Cefazolin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Cefoxitin und Sulfamethoxazol. Allerdings konnten in dieser Studie keine *Aeromonas* Isolate mit Resistenzen gegenüber Meropenem, Polymyxin, Amikacin und Kanamycin gefunden werden.

## 2.3 *Pseudomonas*

### 2.3.1 Eigenschaften, Präferenzen

Die Gattung *Pseudomonas* umfasst mehr als 120 Arten, die ubiquitär vorkommen, also in Boden und Wasser allgegenwärtig sind. Sie kommen an den verschiedensten geografischen Lokalisationen, von den Tropen bis hin zur Antarktis und in den unterschiedlichsten Umgebungen wie auf Pflanzen, Pilzen, in Sedimenten, im Meer, aber auch in Wüstensand vor (PEIX et al., 2009). Die zu der Familie der *Pseudomonaceae* gehörenden *Pseudomonas* spp. sind gram-negative, aerobe, oxidase-positive, nicht-sporenbildende Stäbchen, die sich durch polare Geißeln fortbewegen können. Unterschiedliche *Pseudomonas* Spezies tolerieren unterschiedliche Temperaturbereiche. Einige Spezies wie *Pseudomonas fluorescens* und *putida* können bei unter 0 °C schon vermehrungsfähig sein, während *Pseudomonas aeruginosa* erst bei 10-15 °C ein Wachstum zeigt. Bei Kultivierungsmethoden ist eine Temperatur von 42 Grad Celsius für die Spezies *Pseudomonas aeruginosa* von Vorteil, um die Hintergrundflora zu unterdrücken (STANIER et al., 1966).

Neben der Eigenschaft über einen breiten Temperaturbereich zu wachsen, zeichnet sie außerdem die Fähigkeit zur Biofilmbildung aus. Das typische *Pseudomonas* Bakterium kann häufig in einem Biofilm an einer Oberfläche in der Natur gefunden werden. Sogar mehr als 90 Prozent sind in einem Biofilm eingebettet und nicht frei im Wasser vorhanden (TIANZHI et al., 2014).

Biofilme sind von Bakterien gebildete, hoch anpassungsfähige Gemeinschaften, die als Mikroorganismen in der Lage sind mit Hilfe von extrazellulären polymeren Substanzen an einer Oberfläche zu haften. Diese Biofilme können das Ökosystem positiv beeinflussen, andererseits können sich diese auch in Wasser- oder Rohrleitungen bilden und somit ein Hygieneproblem darstellen. Der Keim wird mit in Krankenhäusern entstandenen Infektionen (nosokomialen Infektionen) in Verbindung gebracht und stellt, wenn er in der klinisch relevanten Biofilmform wächst, eine beträchtliche Gefahr dar. Aufgrund dieser Fähigkeit kann es auch zu weitreichenden Resistenzbildungen kommen (BISHT et al., 2021).

### 2.3.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen

*Pseudomonas aeruginosa* lebt gerne in aquatischen Umgebungen und kann sogar in Wasserproben aus Krankenhäusern isoliert werden. Allgemein im Gewässer, aber

besonders im Krankenhaus spielen Antibiotikaresistenzen eine entscheidende Rolle, da Antibiotikaresistenz-Gene den Menschen auch über Gewässer erreichen. Wasserproben, die in, oder um Krankenhäuser untersucht wurden, sind oftmals mit multiresistenten Bakterien verunreinigt (KUSUMA et al., 2021).

Multiple Antibiotikaresistenzen kommen aber bei mehr als der Hälfte der isolierten *Pseudomonas* spp. vor. Multiple Antibiotikaresistenzen bedeutet, gegen drei oder mehr Klassen von Antibiotika resistent zu sein (VAZ-MOREIRA et al., 2012). Arten wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas chlororaphis* zeigten die höchste Multiresistenz gegen fünf oder mehr Klassen von Antibiotika (VAZ-MOREIRA et al., 2012). Die isolierten *Pseudomonas* spp. wiesen speziesbezogene und auch je nach untersuchter Wasserstelle (Wasseraufbereitungsanlage, Verteilungssystem, Haushaltshähne, Zahnarztstühle, Mineralwasserflaschen) unterschiedliche Antibiotikaresistenzen auf. Hauptsächlich wurden Resistenzen gegenüber Beta-Lactamantibiotika, wie Cefalotin (100 %), Ticarcillin (84 %) und Ticarcillin kombiniert mit einer Clavulansäure Resistenz (80 %) gefunden (VAZ-MOREIRA et al., 2012). Hingegen wurde gegenüber Piperacillin, Piperacillin plus Tazobactam, Imipenem und Meropenem keine Resistenzen beobachtet (VAZ-MOREIRA et al., 2012).

Im Gegensatz dazu wurden in der Studie von KITTINGER et al., 2016 die meisten Resistenzen gegen Meropenem, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim und Imipenem gefunden. Die am häufigsten isolierten Arten dieser Studie waren *Pseudomonas putida* und *fluorescens*.

### 2.3.3 Gesundheitsrisiken

Der fakultativ pathogene Erreger ist einer der Hauptursachen von nosokomialen Infektionen weltweit. Etwa 10 Prozent aller Infektionen in Krankenhäusern der Europäischen Union sind dem Erreger *Pseudomonas* zuzuschreiben. Eine Infektion wird insbesondere bei immungeschwächten Personen und bei dem Vorliegen einer Grunderkrankung wie Mukoviszidose begünstigt (DE BENTZMANN u. PLÉSIAT, 2011).

Erkrankungen wie Harnwegsinfektionen, beatmungsassoziierte Lungenentzündungen, Bakteriämie, oder Septikämie können durch *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst werden (KANAMORI et al., 2016). Auch Otitis externa kann mit *Pseudomonas aeruginosa* in Zusammenhang gebracht werden. In einer Fall-Kontroll Studie von VAN ASPEREN et al.,

1995 kam es bei Menschen, die sich zuvor in Süßwasserseen aufhielten, häufiger zu einer infektiös bedingten Otitis externa. Das Risiko einer Infektion stieg bei wiederkehrenden Ohrenentzündungen und der Anzahl der Schwimmtage an.

Ein erhöhtes Risiko für eine cutane Infektion entsteht auch bei Defekten an der Haut. Aus chronischen Wunden und venösen Beingeschwüren konnte häufig *Pseudomonas aeruginosa* isoliert werden. *Pseudomonas aeruginosa* war in allen vorhandenen Ulcera existent. Zusätzlich kann es durch diesen Keim zu einer Wundheilungsverzögerung kommen und damit kann eine Ulkusvergrößerung induziert werden (GJØDSBØL et al., 2006).

*Pseudomonas* ist auch ein häufiger Verursacher einer bakteriellen Keratitis bei Kontaktlinsenträgern. Während des Tragens kann *Pseudomonas aeruginosa* die Linsen besiedeln und hat die Fähigkeit als Biofilm auf Linsen und deren Aufbewahrungen zu wachsen. Da dieser Biofilm auch resistent gegenüber so manchen Desinfektionsmitteln sein kann, überlebt er in den Kontaktlinsenbehältern (DYAVAIAH, 2015).

Auch in der Aquakultur spielen *Pseudomonas* eine relevante Rolle. Der Keim kann mit einer Vielfältigkeit an unterschiedlichen Spezies im Wasser und sowohl in kranken als auch in gesunden Fischen gefunden werden. Die Spezies *Pseudomonas haemolytica* und *Pseudomonas lactis*, die häufig aus Rohmilch isoliert wurden, konnten in dieser Studie von DUMAN et al., 2021 auch von Fischen isoliert werden. *Pseudomonas* verursachen bei Zuchtfischen stressbedingte Krankheiten sowie eine hohe Mortalität und gelten als häufiger bakterieller Infektionserreger. Obwohl *Pseudomonas* als opportunistischer Erreger bekannt ist, kann er auch als primär pathogen für manche Fischkrankheiten angesehen werden (DUMAN et al., 2021).

In einem Versuch von ZHOU et al., 2016 konnte gezeigt werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* außerdem in der Lage ist, das Wachstum von *Microcystis aeruginosa*, eine Art aus der Abteilung der Blaualgen, zu hemmen und wird daher als algenlytisches Bakterium beschrieben. Cyanobakterienblüten häufen sich in Süßwasserseen weltweit. Besonders die Art *Microcystis aeruginosa* kann sich schnell vermehren (MOHAMED et al., 2014). Neben negativen Auswirkungen auf die aquatische Umwelt haben sie aufgrund der Produktion von Microcystin-Toxine Auswirkungen auf die öffentliche Gesundheit. Dieses Toxin wird mit Allergien, Reizreaktionen oder Gastroenteritiden assoziiert. Zur Bekämpfung von Blaualgenblüten und deren Cyanotoxinen könnten Viren, Bakterien, Cyanophagen, Pilze und heterotrophe Flagellen als biologisches Bekämpfungsmittel dienen (MOHAMED et al., 2014).

Nicht nur *Pseudomonas aeruginosa* weist algenlytische Eigenschaften auf. In einer Studie von LEE u. JEONG, 2018 konnte ebenfalls ein algenlytisches Bakterium identifiziert werden, *Pseudomonas* sp. JS-9. Laut dieser Studie könnte dieses Bakterium bei der Regulation und Entwicklung von Algenblüten in natürlichem Süßwassergewässer dienen, sowie für die Eutrophierung von Süßwasser Anwendung finden. Allerdings sollte eine geeignete biologische Bekämpfung von *Microcystis aeruginosa* nicht zu einer Sekundärverschmutzung durch die dafür eingesetzten Bakterien führen (LEE u. JEONG, 2018).

#### 2.3.4 Vorkommen

Aufgrund einer besonders variationsreichen Erbinformation und der damit einhergehenden physiologischen Anpassungsfähigkeit können die verschiedenen Arten dieser allgegenwärtigen Bakteriengattung aus unterschiedlichsten ökologischen Nischen isoliert werden. Wie zum Beispiel *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas fluorescens* als pathogene Keime für Fische. Aus Meeresökosystemen konnten *Pseudomonas maricola*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas gelidicola* isoliert werden und *Pseudomonas salomonii*, *Pseudomonas palleroniana* und *Pseudomonas syringae* sind Beispiele für phytopathogene Arten. Manche Spezies können auch das Pflanzenwachstum fördern, wie zum Beispiel *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas veronii* und *Pseudomonas fluorescens* (PEIX et al., 2009).

Wasserproben aus Wasseraufbereitungsanlagen/Verteilungssystemen, Zahnarztstühlen, Haushaltshähnen, Mineralwasserflaschen und Biofilme wurden auf Häufigkeit von *Pseudomonas* und deren Arten-Profil untersucht. In all diesen Wasserproben wurden *Pseudomonas* gefunden. Bevorzugt wurden gleiche Arten gehäuft in Wasserproben gleichen Ursprungs nachgewiesen. Jeder „Wassertyp“ zeigte ein eigenes *Pseudomonas*-Arten Profil. Vor der Trinkwasseraufbereitung, genauer im Oberflächenwasser, wurde die höchste Arten-Vielfalt an *Pseudomonas* spp. identifiziert. Die quantitativ höchste Anzahl an Pseudomonenzellen konnte aus Haushaltshähnen isoliert werden. Dabei unterschieden sich die *Pseudomonas* Arten der Wasserhähne von jenen des Quellwassers (Wasserursprung) (VAZ-MOREIRA et al., 2012).

### 2.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist in dieser Gattung der wohl häufigste für den Menschen relevante infektiöse Erreger. Der Nass- und Pfützenkeim stellt geringe Ansprüche an die Umgebung in der ein Wachstum erfolgen kann und zeigt eine große Anpassungsfähigkeit sowie einen minimalen Nährstoffbedarf. Er wächst optimal bei 37 Grad Celsius und kann typisch für seine Art bis bei 42 Grad Celsius wachsen. Dieser Keim ist tolerant gegenüber so manchen physikalischen Bedingungen, wie Temperatureinflüsse, zeigt Resistenzen gegenüber schwachen Antiseptika, hohen Salzkonzentrationen und mehreren Antibiotika (KENNETH, 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* wird im Allgemeinen als allgegenwärtig in Wasser und Boden beschrieben. Allerdings wurde eher eine Assoziation mit Fäkalien sowie Kohlenwasserstoff und Pestiziden in belasteten Umgebungen festgestellt, als in dekontaminierten Boden- und Wasserbereichen. So wurde *Pseudomonas aeruginosa* häufiger in der von Menschen affizierten Umwelt nachgewiesen. Dieser Keim kann in vielen Bereichen vorkommen, sehr häufig allerdings in Menschen und Tieren (CRONE et al., 2020).

*Pseudomonas aeruginosa* sezerniert Pigmente wie Pyoverdin und Pyocyanin, welche auf Agarnährböden charakteristische gelbgrün fluoreszierende bzw. blaugrüne Kolonien ausbilden. Pyoverdin fungiert als Siderophor und ist ebenso wie Pyocyanin ein Virulenzfaktor (STREETER et al., 2016).

### 2.3.6 Pathogenität

*Pseudomonas aeruginosa* gilt als opportunistischer Erreger. Die pathogene Natur ist multifaktoriell, denn diesem Erreger gelingt es mithilfe verschiedener Virulenzfaktoren wie Toxinen, Enzymen, Exopolysacchariden und Siderophoren in den Wirt einzudringen. Für eine Infektion ist eine frühe Adhäsion an das Epithel des Wirtes wesentlich, um eine Infektion zu verursachen (DE BENTZMANN u. PLÉSIAT, 2011).

Mithilfe von Fimbrien erfolgt die Adhäsion an Epithelzellen wie beispielsweise der oberen Atemwege, durch Freisetzung von Toxinen und Enzymen wie einer alkalischen Protease und einer Elastase werden Gewebe und Zellen geschädigt und respiratorisches Epithel zerstört (KENNETH, 2004).

Als Virulenzfaktoren spielen Toxine in der *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenese eine wichtige Rolle. Dabei ist ExoT der häufigste vorkommende Faktor, gefolgt von ExoY und ExoA (JAVANMARDI et al., 2019). In einer Studie von STREETER et al., 2016 werden zusätzlich zu den bereits genannten noch ExoS und ExoU zu den in *Pseudomonas aeruginosa* identifizierten Effektor-Toxinen gezählt. Die Proteine ExoS und ExoT sind bifunktionell und besitzen eine Aktivität als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) sowie eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, während ExoY eine Adenylatcyclase Aktivität besitzt. ExoS, ExoT und ExoY dienen dazu, zytolytische Aktivitäten zu erhalten, die Invasion von Epithelzellen zu hemmen und die Phagozytose zu verhindern. Außerdem werden diese Proteine mit der Zerstörung von Endothelzell-Verbindungen assoziiert, um das Zytoskelett zu verändern. ExoU zeigt eine zytolytische Aktivität auf Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen und kann eine Entzündung initiieren, die sich durch die Bildung von Prostaglandinen charakterisiert. Eine hohe Prävalenz weist ExoS in *Pseudomonas aeruginosa* auf, die Wund- und Harnwegsinfektionen verursachen. ExoU wurde vorwiegend mit durch *Pseudomonas* ausgelösten Lungenerkrankungen assoziiert (STREETER et al., 2016).

Laut KENNETH, 2004 stammt das Exoenzym S aus den Bakterien, die in verbranntem Gewebe wachsen und kann im Blut schneller als Bakterien nachgewiesen werden. Exotoxin A ist jenes Toxin, das die Proteinbiosynthese hemmt und eine Gewebenekrose verursacht (KENNETH, 2004). *Pseudomonas aeruginosa*, die ExoA produzieren, scheinen sowohl lokale als auch systemische Erkrankungen hervorzurufen. Diese toxogenen Stämme verursachen eine virulentere Form der Pneumonie als nicht toxogene Stämme. Dieses extrazelluläre Proteintoxin ist ein sehr starkes Zytotoxin und ist gefährlich für eine Vielzahl von Tieren, einschließlich Primaten (Kenneth, 2004).

## 2.4 *Vibrio*

### 2.4.1 Eigenschaften, Vorkommen

*Vibrio* sind in der Lage, sich an viele Umweltbelastungen rasch anzupassen, sodass unter anderem Brackwasser als Reservoir und als ökologische Nische dienen kann (MATTEUCCI et al., 2015). Sie kommen aber nicht nur im Brackwasser, sondern auch im Meerwasser

(CAVALLO u. STABILI, 2002) oder Flussmündungen vor (BARBIERI et al., 1999). In beiden Gewässern ist *Vibrio alginolyticus* die vorherrschende isolierbare Spezies. Vibrionen gehören zu den häufigsten Bakterien in Oberflächengewässern weltweit. Die von *Vibrio* ausgelösten Erkrankungen nehmen global stetig zu. Dies könnte mit der globalen Erwärmung und der steigenden Meeresoberflächentemperatur zusammenhängen. Humanpathogene Vibrionen bevorzugen hohe Wassertemperaturen und niedrige Salzgehalte (VEZZULLI et al., 2013).

Auch in Europa kommen *Vibrio* Infektionen ausgelöst durch *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae non-O1/non-O139* und *Vibrio vulnificus* häufiger vor, was auch mit dem Klimawandel und deren Folgen wie Hitzewellen zusammenhängen kann. In Europa treten diese *Vibrio* Ausbrüche bevorzugt bei warmen Wetterperioden auf. Betroffen von *Vibrio* bedingten Erkrankungen sind Menschen und Meerestiere, wie Fische, Muscheln oder Korallen (ROUX et al., 2015).

Die halophilen „salzliebenden“, gram-negativen, fakultativen, anaeroben Stäbchen lösen verschiedene Krankheiten aus wie Septikämie, Cellulitis, Fasziiitis, Gastroenteritis sowie Wundinfektionen. Die häufigsten *Vibrio*-Arten, die Weichteilinfektionen und Infektionen des Bewegungsapparates auslösen, sind *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* und *Vibrio damsela*. Therapeutisch wird empfohlen, betroffenes Gewebe zu entfernen und ein Débridement durchzuführen, sowie gegebenenfalls eine Antibiotikatherapie (NOONBURG, 2005).

#### 2.4.2 Antibiotika und Antibiotikaresistenzen

*Vibrio* Infektionen können selbstlimitierend sein, jedoch bedarf es bei schwereren Fällen den Einsatz von Antibiotika. Falsche oder unüberlegte Antibiotikatherapien fördern Resistenzen, die man in der Aquakultur immer häufiger beobachten kann. Bei aus Nahrungs- und Umweltquellen isolierten *Vibrio* spp. konnte eine Antibiotikaresistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Streptomycin, Kanamycin, Trimethoprim und Carbapenem festgestellt werden (LOO et al., 2020).

Die von HÅKONSHOLM et al., 2020 getesteten *Vibrio* spp. Isolate zeigten eine Antibiotikaresistenz gegenüber Ampicillin, Oxolinsäure, Imipenem, Aztreonam und manche Isolate gegenüber Tobramycin. Hingegen waren alle Isolate empfindlich gegenüber Tetracyclin, Ciprofloxacin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol. Zusätzlich waren die meisten Isolate sensibel gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation und Aminoglycosiden.

Die aus Oberflächengewässern isolierten *Vibrio metschnikovii* und *Vibrio cholerae* in der Studie von VALÁRIKOVÁ et al., 2020 waren alle sensibel gegenüber Tetracyclin, Chloramphenicol, Doxycyclin, Ciprofloxacin, Ofloxacin und Trimethoprim / Sulfamethoxazol. Resistenzen gegen Beta-Lactam-Antibiotika wie Penicillin und Ampicillin, aber auch gegenüber Aminoglycosiden wie Streptomycin sowie gegenüber Erythromycin, einem Marcolidantibiotikum, konnten beobachtet werden. Gegen Azithromycin zeigten drei *Vibrio cholerae* Isolate Resistenzen. Multiresistenzen konnten keine beobachtet werden.

#### 2.4.3 *Vibrio cholerae*

Von den über 100 bekannten *Vibrio* Spezies können etwa 12 Arten für den Menschen pathogen sein. *Vibrio cholerae*, der Auslöser von Cholera, ist die wahrscheinlich bekannteste Art und verursacht schwere Durchfallerkrankungen. Am häufigsten tritt die Krankheit bei Kindern in endemischen Ländern unter 5 Jahren auf. In Asien ist Cholera endemisch, die Ausbreitung auf andere Kontinente könnte durch menschliche Aktivitäten und schlechte Hygiene erfolgen (z. B. in Notunterkünften) (BAKER-AUSTIN et al., 2018).

Als Reservoir und Vektoren von *Vibrio cholerae* und damit als mögliche Ursache einer Verbreitung könnten manche Fischarten dienen (SENDEROVICH et al., 2010). Für einige Fische wie Tilapia oder Karpfen konnte *Vibrio cholerae* als Teil der normalen Flora isoliert werden (HALPERN u. IZHAKI, 2017). So wäre es möglich, dass Fische die Verbreitung dieses Bakteriums zwischen Gewässern fördern, wenn sie sich natürlich zwischen Fluss und See bzw. Fluss und Meer bewegen oder von wandernden Wasservögeln verteilt und verzehrt werden. Aus Fischendärmen verschiedenster Fischarten und Lebensräumen wie Süßwasser- und Meeresumgebungen kann *Vibrio cholerae* isoliert werden (SENDEROVICH et al., 2010). Es liegt nahe, dass Fische ein Reservoir für dieses Bakterium sein können (SENDEROVICH et al., 2010). Diese Bakterienspezies können aus gesunden und kranken Fischen isoliert werden und bewirken scheinbar auch positive Effekte: *Vibrio cholerae* Isolate sind in der Lage Chitin abzubauen und sind somit im Verdauungstrakt vorteilhaft. Dies gelingt ihnen mithilfe von extrazellulären Enzymen wie Chitinasen und Proteasen. Diese Enzyme können Makromoleküle verdauen, die sonst von den Fischen nicht verstoffwechselt werden könnten. Da Chitin ein Hauptbestandteil der Exoskelette von Insekten und Krebstieren ist, gelingt es diese Beute mithilfe von *Vibrio cholerae* im Fischdarm

unterstützend aufzuschließen. Auch kann *Vibrio cholerae non-O1/O139* aus dem Darm von verschiedenen Süßwasser-Fischarten isoliert werden (SENDEROVICH et al., 2010).

Unter den vielen bekannten Serogruppen von *Vibrio cholerae* sind die Serotypen O1 und O139 mit der epidemischen Cholera assoziiert. Diese Serotypen O1 und O139 produzieren das Cholera-toxin CT, welches für die Erkrankungssymptome verantwortlich ist (CHAKRABORTY et al., 2000).

Nicht toxinbildend sind *Vibrio cholerae non-O1/non-O139*. In Österreich wurden in den Jahren 2000 bis 2005 mehrere Infektionen beschrieben, die Menschen von 8 bis 65 Jahren betrafen. Erkrankungen wie Durchfall, Ohrenentzündung und sogar ein Todesfall, aufgrund einer Septikämie, wurden protokolliert (HUHULESCU et al., 2007). Auch im österreichischen Neusiedler See konnten *Vibrio cholerae non-O1/non-O139* nachgewiesen werden, welche als Auslöser für Erkrankungen nach Freizeitaktivitäten im See verantwortlich gemacht wurden. Der Anamnese zufolge waren fünf Personen am Neusiedler See und zeigten danach eine Otitis Symptomatik, im Gegensatz zu den protokollierten Durchfallerkrankungen, die laut Anamnese auf einen Auslandsaufenthalt zurückzuführen waren (HUHULESCU et al., 2007).

#### 2.4.4 *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus*

*Vibrio parahaemolyticus* ist bekannt als Verursacher von Durchfallerkrankungen und Gastroenteritis. Aufgrund dessen wurden von GUIN et al., 2019 Stuhlproben, Proben von Brack- und Süßwasserfischen von Märkten und verschiedenen Wasserproben gezogen. Das von dem Bakterium für die Pathogenese verantwortliche, thermostabile Toxin mit hämolytischer Aktivität Tdh wurde hauptsächlich in Fischen und Gewässern, aber weniger häufig bei Durchfallerkrankungen nachgewiesen. Im Süßwasser konnten keine *Vibrio parahaemolyticus* ausfindig gemacht werden. Demnach wurde in der Studie von GUIN et al., 2019 beobachtet, dass Brackwasserfische und Gewässer als Reservoir für pathogene *Vibrio parahaemolyticus* dienen können.

In der Studie von HÅKONSHOLM et al., 2020 wurden Wasserproben an der norwegischen Westküste gezogen und aus der Nordsee gefangene Fische sowie Muscheln beprobt, welche auf *Vibrio* spp. untersucht wurden. Die höchste Anzahl an *Vibrio* Bakterien war in der Wasserprobe mit der höchsten gemessenen Temperatur und dem niedrigsten Salzgehalt zu finden. Aus den Fischproben war *Vibrio metschnikovii* die bestimmende Art, aus Muscheln

war es *Vibrio anguillarum*. Die vorherrschende Art allgemein war *Vibrio alginolyticus*, welche häufig aus der marinen Umwelt isoliert wird.

Lebensmittelbedingte Infektionen können durch *Vibrio* spp. verursacht werden. Oft kommt es nach dem Verzehr von kontaminierten Meeresfrüchten oder mit kontaminiertem Trinkwasser gewaschenen Lebensmitteln zur Infektion. Zu diesen *Vibrio* spp. gehören unter anderen humanpathogene Arten wie *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus*. Diese beiden zählen zu den häufigsten *Vibrio*-Arten, die für lebensmittelassoziierte Infektionen verantwortlich gemacht werden. Laut Berichten zufolge konsumierten Betroffene zuvor Meeresfrüchte, vor allem Austern und die Erkrankungen waren in den wärmeren Monaten präsenter (IWAMOTO et al., 2010).

Diese beiden Arten konnten aber auch im Fischdarm, in Sediment und in Wasserproben nachgewiesen werden. So scheint es, dass der Fischdarmtrakt eine bedeutende Quelle pathogener Vibrionen ist (GIVENS et al., 2014).

## 2.5 Phagen

In der Prä-antibiotischen Ära wurden Bakteriophagen, kurz Phagen genannt, als medizinisches Mittel gegen bakterielle Infektionen von Tier und Mensch verwendet. Mit dem Durchbruch von Antibiotika stellte man die Phagentherapie in den Hintergrund, allerdings werden Phagen anlässlich ansteigender Antibiotikaresistenzen in bakteriellen Pathogenen wieder präsenter. Phagen sind Viren, die Bakterien abtöten oder lysieren können. Sie wurden Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt und werden gegen bakterielle Erkrankungen bei Mensch und Tier eingesetzt (DUCKWORTH u. GULIG, 2002).

Phagen gelten als die am häufigsten vorkommenden Organismen in der Biosphäre. In nahezu jeder Nische in der Umwelt sind Phagen verteilt, wahrscheinlich angepasst an ihre Wirtsorganismen. Ihre Wirte, die Bakterien, kommen am häufigsten im Boden, im offenen Ozean oder in Meeressedimenten vor und so auch die Phagen (CLOKIE et al., 2011).

Bakterielle Wirte sind essenziell für Phagen und ihren Lebenszyklus. Zwei Varianten der Infektion durch Phagen können unterschieden werden: Lytische oder virulente und lysogene oder temperente Phagen. Beim lytischen Zyklus kommt es durch Infektion mit der Virus DNA (RNA) zur Vervielfältigung des Virus und dann zur Lyse des Wirtsbakteriums. Die Nachkommen-Phagen werden freigesetzt und der Zyklus wiederholt sich, indem

benachbarte Bakterien infiziert werden. Beim lysogenen Zyklus wird die Phagen DNA (RNA) in das Bakteriengenom integriert und das Phagengenom repliziert sich kooperativ mit dem Wirtsbakterium, ohne dieses zu zerstören. Dieser Zyklus kann dann in den lytischen Zyklus übergehen (JAMAL et al., 2019).

Die größte Anzahl bekannter Phagen sind sogenannte „Schwanzphagen“, die eine doppelsträngige DNA als Genom besitzen und aus einem ikosaedrischen Kopf und Schwanz bestehen. Diese Schwanzphagen können wiederum in drei Familien unterteilt werden: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* und gehören in die Gattung *Caudovirales*. Der kleinere Anteil der Phagen sind die filamentösen, pleomorphen oder kubischen, welche einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA als Genom enthalten. Die am häufigsten zur Therapie eingesetzten Phagen sind rein lytische „Schwanzphagen“. Phagen haben die Fähigkeit, an bestimmte Bakterienarten oder Bakterienstämme anzudocken, dadurch kann die Phagentherapie Zielbakterien ausrotten, die normale Flora bleibt jedoch erhalten (MATSUZAKI et al., 2005).

Die parenterale Verabreichung der Phagen ist eine der effektivsten Methoden zur Behandlung von systemischen Infektionen, da Phagen sich im systemischen Kreislauf unmittelbar verteilen können. Allerdings ist insbesondere bei parenteraler Applikation eine Zerstörung der Phagen durch körpereigene Abwehrzellen möglich, wodurch eine effektive Therapie verhindert wird (SULAKVELIDZE et al., 2001). Zur Behandlung von Magen-Darm Erkrankungen können Bakteriophagen auch oral verabreicht werden und gelangen manchmal auch in den systemischen Kreislauf. Eine topische Anwendung, wie bei Wundinfektionen, ist ebenfalls möglich (RYAN et al., 2011).

### 2.5.1 *Pseudomonas* und Phagen

NAKAI u. PARK (2002) erzielten mit einer weiteren Applikationsmethode Erfolge, indem er mit Phagen versetztem Fischfutter gegen *Pseudomonas plecoglossicida* vorging. Die Fische wurden resistenter und die Sterblichkeit ging signifikant zurück.

*Pseudomonas aeruginosa* assoziierte Biofilme können als Reservoir die Verbreitung von Krankheiten fördern. Diese Biofilme haften an Oberflächen, deren Beseitigung oft schwierig erscheint. Die auf Oberflächen haftenden Biofilme können schwer von antimikrobiellen Mitteln durchdrungen werden. Als Alternative könnten wirtsspezifische Bakteriophagen Verwendung finden. In einer Studie von MAGIN et al., 2019 dienten Bakteriophagen als

Biokontrollmittel von Plankton und Biofilmrückständen von *Pseudomonas aeruginosa*. Planktongewebe bestehend aus Bakterienisolaten konnte von Phagen lysiert werden und damit wurde auch die Biofilmausbreitung verringert.

LATZ et al., 2016 zeigten in ihrer Studie, dass Phagen mit lytischer Aktivität gegen nosokomiale Erreger in der Umgebung ungleichmäßig verteilt sind. Sechzehn Wasserproben aus verschiedensten Umgebungen wie Seen, Teiche, Abwässer, Leitungswasser sowie Wasseraufbereitungsanlagen wurden auf Phagen mit lytischer Aktivität gegen unter anderem *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Phagen gegen *Pseudomonas aeruginosa* waren leicht in See- und Teichproben und vor allem sehr einfach in Abwasserproben zu finden. *Pseudomonas aeruginosa* war für die höchste Anzahl an Lysezonen auf Bakterienrasen verantwortlich. Das Abwasser des Universitätsklinikums und die Wasseraufbereitungsanlage wiesen die höchste Anzahl an Phagen auf. Die Hauptquelle für Phagen gegen nosokomiale Pathogene scheint in der Nähe von Krankenhäusern zu sein (LATZ et al., 2016).

In einer Doppelblindstudie wurden Menschen, die sich mit chronischer Otitis, ausgelöst durch *Pseudomonas aeruginosa* plagten, topisch mit Phagen behandelt. Die zuerst geringe applizierte Dosis an Phagen vermehrte sich, das heißt die Anzahl an Bakteriophagen vergrößerte sich während der Behandlung. In beiden Fällen konnte eine deutliche Verbesserung erzielt werden und ohne dass es zu schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen kam. Auch bei chronischen Otitiden von Hunden, welche von antibiotikaresistenten *Pseudomonas aeruginosa* verursacht wurden, stieg die Anzahl der Bakteriophagen an und die der Bakterienzahl sank ab. Obwohl die Tiere nur einmal mit Bakteriophagen behandelt wurden, verbesserten sich die Symptome längerfristig (SAUSSEREAU u. DEBARBIEUX, 2012).

### 2.5.2 *Vibrio* und Phagen

Vibrionen kommen weltweit in Meeres-, Brack- und Süßwasserumgebungen vor und sind als Krankheitserreger relevant für Menschen und Meerestiere. Die Phagentherapie von *Vibrio*-Infektionen nimmt an Bedeutung zu. Nicht nur zur Behandlung, sondern auch zur Vorbeugung stellt diese Therapie eine Alternative in der Aquakultur dar (KALATZIS et al., 2018). In einem Übersichtsartikel von KALATZIS et al., 2018 werden zwei Erfolge einer Phagentherapie näher erläutert. Es wurden gegen *Vibrio harveyi*, die Garnelen infizierten, Phagen appliziert und gegen pathogene *Vibrio splendidus* Stämme wurden lytische

Bakteriophagen *in vitro* eingesetzt. In beiden Fällen lebten die Tiere länger als mit einer vergleichbaren Antibiotikatherapie (KALATZIS et al., 2018).

### 2.5.3 *Aeromonas* und Phagen

Auch für *Aeromonas hydrophila* gibt es spezifische Bakteriophagen. In der Studie von LIU et al., 2020 wurden solche spezifischen *Aeromonas hydrophila* Phagen isoliert und charakterisiert. In diesem Versuch wurden Mäuse in Gruppen eingeteilt und verschiedene *Aeromonas hydrophila* Stämme intraperitoneal injiziert. Zusätzlich wurden, abgesehen von der Kontrollgruppe, intraperitoneal spezifische Phagen injiziert. Zeitversetzt wurden jeweils 5 Mäuse aus jeder Gruppen euthanisiert und Milz, Niere, Leber, Herz und Lunge auf die Bakterienbelastung untersucht. Die mit Phagen behandelten Gruppen zeigten in allen Geweben eine signifikante Abnahme der Bakterienbelastung. Folglich sind Phagen in der Lage, *in vivo* Pathogene zu eliminieren und die Bakterienproliferation zu verhindern (LIU et al., 2020).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Probenmaterial

- 500 ml Seewasser pro Entnahmestelle mit 0,5-3 g Sediment

##### 3.1.2 Geräte und sonstige Materialien

- Inkubatoren
  - Microaerophiler Inkubator (Revco Ultima)
  - Aerober Inkubator (Mettler)
- Sterile Einmalpipetten (Greiner BioOne)
  - 100-1000µl (686290)
  - 10-100µl (772288)
  - 0,5-10µl (765288)
- Automatische Pipettierhilfe (Greiner BioOne)
- Pipetten
  - Eppendorf Research Plus Pipette 10 µl (Eppendorf; 3120 000.020)
  - Eppendorf Research Plus Pipette 100 µl (Eppendorf; 3120 000.046)
  - Eppendorf Research Plus Pipette 1000 µl (Eppendorf; 3120 000.062)
- Reaktionsgefäß (Greiner BioOne)
  - 2ml (623201)
  - 1,5ml (616201)
- Vortexer (IKA MS2 Minishaker)
- Petri Schalen (LabXperts, STM 101VR20)
- Magnetrührer (IKA KMO 2 electronic; Janke & Kunkel)
- Probeentnahmeflaschen 500 ml steril ( Lot Nr. 643575)
- Glaseprouvetten
- pH-Messgerät FE20 FiveEasy(Mettler Toledo;51302916)
- Autoklav (Dampfsterilisator Multicentral BE)

- Impfösen (Becker)
- Erlenmeyerkolben
  - 250 ml
  - 500 ml
- Wärmeplatte
- Glasflasche
- Sterile Petrischale (LabXperts; STM 101VR20)
- Zentrifuge (Sigma; 3K30)
- Zentrifuge (Eppendorf; 5417C)
- Zentrifugenröhrchen 50ml (Greiner Bio-One; 210261)
- Thermoschüttler (Eppendorf; New Brunswick <sup>™</sup> Innova 40/40R Incubator Shaker 40)
- Mikroskop
- Sterile Spateln
- Heatblock (Henry Troemner; 460-3201)
- Bunsenbrenner (Schütt)
- Spritzen (Braun)
  - 2ml (4606027V)
- 0,2 µm PES-Spritzenvorsatzfilter (VWR International; 514-0073)
- Wattestäbchen (Heinz Herenz; 1030419)
- Rundfilter (Schleicher und Schüll; 589)
- Paraffinöl (Biomerieux; 70100)

### 3.1.3 Nährmedien und Reagenzien

- Agar (Alfa Aesar, Bacteriological, Ultrapure, Thermo Scientific<sup>™</sup>; J10906)
- Bi-destilliertes Wasser
- GKZ - Agar (1.05463.0500; Merck)
- LB Agar Miller (Thermo Scientific<sup>™</sup> Oxoid; 10081163)
- LB Broth Miller (Fisher BioReagents<sup>™</sup>, BP; 1426-500)
- MH - Broth (Oxoid; CM 0405)
- Pepton (Oxoid; LP 0034“)
- TCBS Agar (VWR BDH Chemicals<sup>™</sup>; 84641.0500)
- Calciumchlorid (Sigma-Aldrich; C3881)

- D-(+)-Glucose Monohydrat (Merck; 49159)
- Fleischextrakt (Oxoid; LP0029)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Merck 5833.0250)
- Magnesiumsulfat (VWR; 1.058.861.000)
- Natriumchlorid (Merck; 1.06404.1000)
- Oxidase-Reagenz (Biomerieux; 55635)
- Phenolrot (Roth; T127.1)
- Tris-base (Sigma-Aldrich; T1503-500G)
- ssLB-Agar (Semi-solid LB Agar 0,8% Agar)
- PI-Buffer (Prophage Induction Buffer):
  - 10mM CaCl<sub>2</sub>
  - 10mM MgCl<sub>2</sub>
  - 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - Mueller Hinton Broth (CM0405; Oxoid) 21g in 1 Liter Bidestillierten Wasser
- SM Buffer (Prophagen Induktionsbuffer):
  - 100mM NaCl,
  - 10mM MgSO<sub>4</sub>
  - 50mM TrisHCl (pH 7,5)

#### 3.1.4 Bakterien

- Pseudomonaden aus der Stammsammlung der Abteilung für Lebensmittelhygiene und -technologie, Lebensmittelisolate und tierische Isolate und Standardstämme aus Stammsammlungen:
  - PAO 1 *Pseudomonas aeruginosa*
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Proben und Probenentnahme

Für die Untersuchung auf *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio* in Badeseen in Kärnten und der Steiermark wurden jeweils 5 Seen beliebig ausgewählt.

Die Probenziehung erfolgte im August 2020.

In Kärnten wurden folgende Seen für die Probenziehung ausgesucht:

- Wörthersee (WÖ1-WÖ5)
- Faaker See (F1-F5)
- Ossiacher See (O1-O5)
- Weissensee (WE1-WE4)
- Millstätter See (M1-M5)

In der Steiermark wurden diese Seen für die Probenziehung ausgewählt:

- Toplitzsee (TO1-TO5)
- Altaussee (AL1-AL5)
- Ödensee (ÖD1-ÖD5)
- Teichalmsee (TAS 1-TAS5)
- Grundlsee (GR1-GR5)

Von jedem See, außer dem Weissensee, wurden je 5 mal 500 ml Seewasser einschließlich 0,5-3 g Sediment vom Seerandgebiet entnommen. Vom Weißensee wurden 4 mal 500 ml Wasser einschließlich 0,5-3g Sediment entnommen. Insgesamt aus 49 verschiedensten Stellen, vorwiegend Seebäder sowie öffentlich zugängliche Seebereiche, wurden jeweils in Ufernähe, etwa 30cm unterhalb der Oberfläche, Seeproben inklusive Sediment mit sterilen Weithalsflaschen entnommen.

Nach der Probenziehung wurden die Proben gekühlt. Die Untersuchungen wurden im September 2020 vorgenommen. Die Entnahmestellen wurden genau dokumentiert (Abb. 1-3).

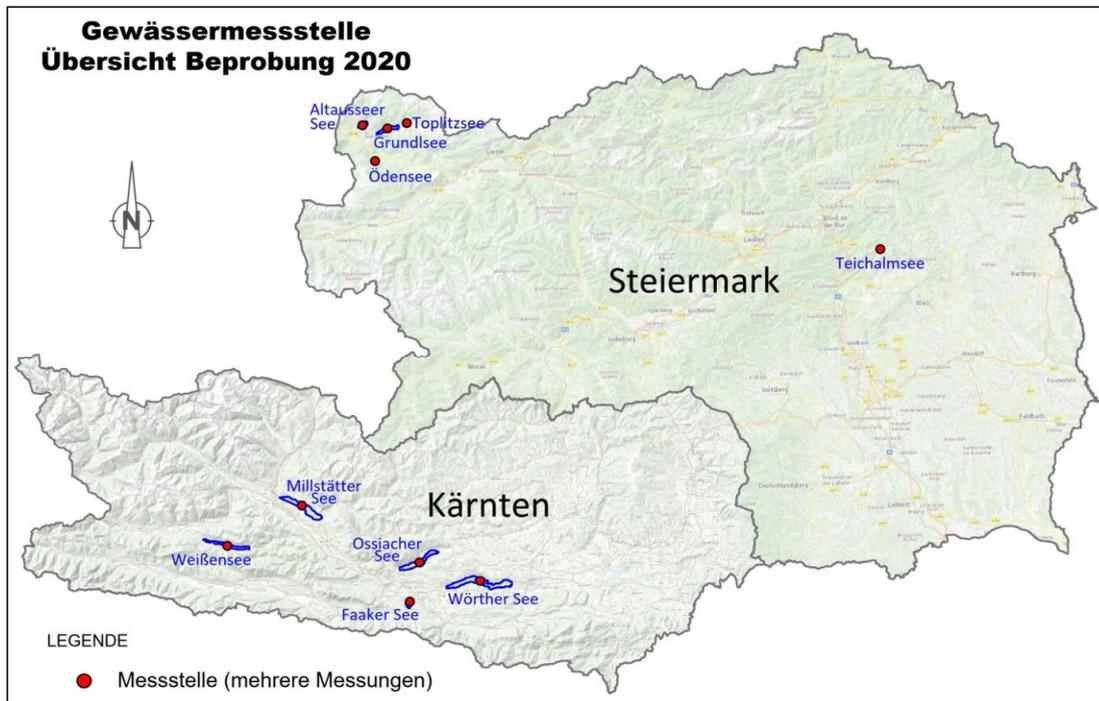


Abbildung 1 Beprobte Seen aus der Steiermark und Kärnten

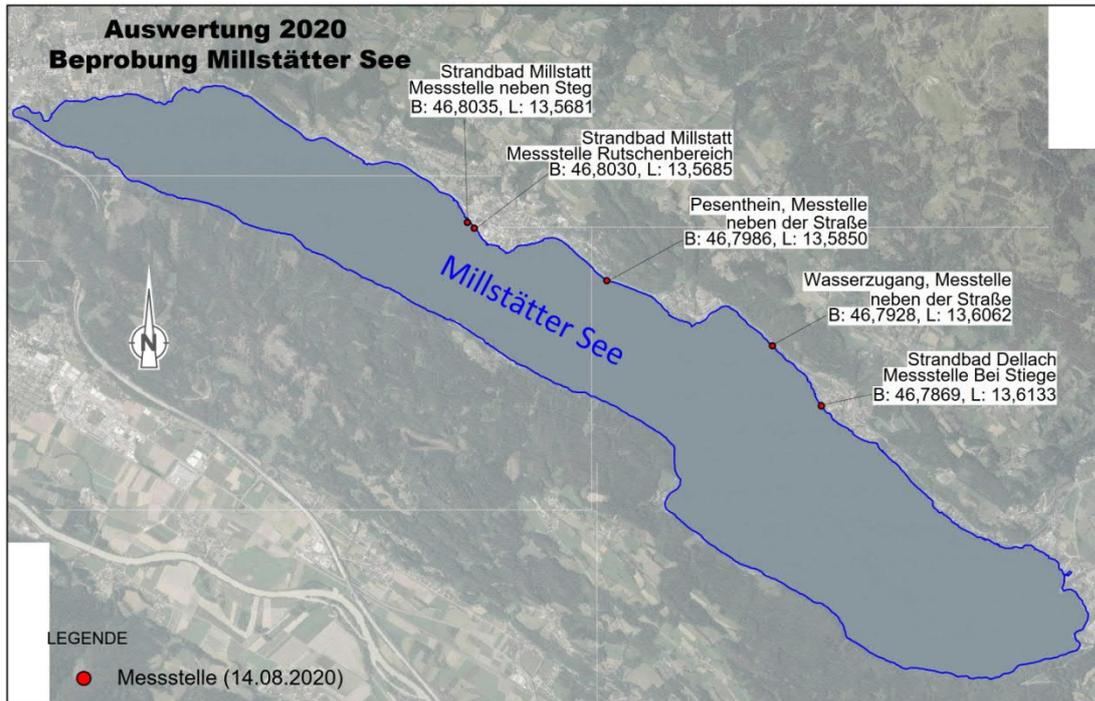


Abbildung 2 Übersicht Messstellen Millstätter See

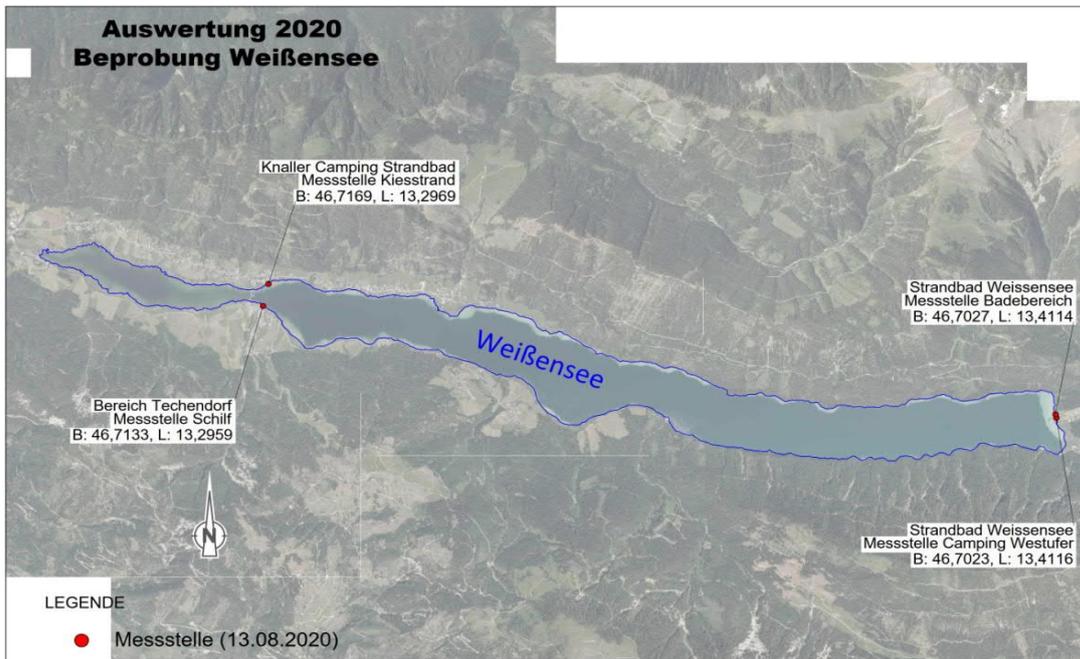


Abbildung 3 Übersicht Messstellen Weißensee

## Herstellung der Medien

### 3.2.1.1 LB-Agarplatten

Für die Herstellung der LB-Agarplatten wurde 7,5 g LB-Agar und 12,5 g LB Broth eingewogen und bis auf 500 ml H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Daraufhin erfolgte die Homogenisierung der Suspension mittels eines Magnetrührers.

Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 20 ml dieses LB-Agars in eine sterile Petrischale gegossen.

Durch das Schwenken der Platten wurde das Medium verteilt, zum Abkühlen stehen gelassen und nach Verfestigen der Platten zur weiteren Verwendung bereit gestellt.

### 3.2.1.2 semisolider Agar (ss-Agar)

Um Bakteriophagen in *Pseudomonaden* Stämmen nachzuweisen wurde ssLB Agar verwendet. Dazu wurden 5 g LB Broth und 1,6 g Agar in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren wurden je 4 ml semisolid Agar in sterile Glasröhrchen gefüllt. Diese wurden anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und bis auf weiteres im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.1.3 TCBS Agarplatten

Um die TCSB Agarplatten herzustellen wurde 44 g TCBS Agar eingewogen und auf 500 ml H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Danach wurde die Suspension mittels eines Magnetrührers homogenisiert.

Nach dem Aufkochen wurden jeweils 20 ml von diesem TCSB Agar in eine sterile Petrischale gegossen.

Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

### 3.2.2 Nachweis Direktkultur

#### 3.2.2.1 Pseudomonaden und Aeromonaden Nachweis in Wasserproben

Von der gesamten Menge von 500 ml der Wasserproben werden 100 Mikroliter von jeder Wasserprobe auf eine GPS Kielweinplatte ausplattiert. Diese wurden anschließend bei Raumtemperatur für 16-18 Stunden inkubiert.

#### 3.2.2.2 Vibrionen Nachweis in Wasserproben

Der Nachweis von Vibrionen in Wasserproben erfolgte nach DIN EN ISO 21872-1.

Für die klassische Herstellung von alkalischem Peptonwasser wurde 10 g Pepton mit 20 g NaCl bis auf 1 Liter H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Durch Herstellung von alkalischem Peptonwasser wird eine selektive Anreicherung erzielt. Da *Vibrio* sich bei einem hohen pH Wert schneller vermehren können und das Wachstum anderer Bakterien gehemmt wird, wurde der pH-Wert auf 8,6 eingestellt.

Für unseren Versuch wurden 300 ml von 10-fach konzentrierten APW nach folgenden Angaben hergestellt: 30,0 g Pepton, 60,0g Natriumchlorid, pH 8,6 ± 0,2 bei 25 °C.

Von diesen 10-fach konzentrierten APW wurden 22,77 ml zu 250 ml Wasserprobe dazu pipettiert. Die 250 ml Wasserprobe ist eine Sammelprobe je See. Es wurden jeweils 50 ml entnommen.

Diese Anreicherung wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Nach der 16 stündigen Anreicherung im alkalischen Peptonwasser (APW, pH 8,6) erfolgte sowohl der Ösenausstrich, als auch die Ausplattierung von 100 µl der Anreicherungssuspension auf TCBS Agar.

#### 3.2.3 Anzüchten der Wirtsstämme für einen Phagennachweis

Zum Nachweis von *Pseudomonas* Bakteriophagen in Wasserproben wurde der Wirtsstamm PAO 1 *Pseudomonas aeruginosa* verwendet.

Der bakterielle Stamm PAO1 wurde auf einer LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Danach wurde eine Kolonie von diesem Stamm in 10 ml LB+ Medium (LB Broth; 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 100mM MgSO<sub>4</sub>) aufgelöst und anschließend bei 37 °C für 16 Stunden über Nacht bei 250 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 100 µl bakterieller Übernachtskultur in 10 ml LB+ Medium aufgelöst und zirka 2 Stunden bei 250 rpm bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert bis die optische Dichte der bakteriellen Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm 0,3 erreicht hat. Anschließend wurde die Dichte der bakteriellen Suspension PAO1 auf McFarland 0,5 eingestellt ( $\approx 10^8$ CFU/ml) und 1 ml dieser Suspension mit 2 ml Wasserprobe vermischt und bei Raumtemperatur (25°C) für 30 min inkubiert.

Für den *Aeromonas* Bakteriophagen Nachweis wurde kein Typstamm verwendet, sondern ein *Aeromonas* Isolat der Bakterienkultur von einer Kielweinplatte von den Wasserproben aus Millstättersee (AM4). Dafür wurde ein *Aeromonas* Isolat auf einen Kielweinagar bei 35°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine *Aeromonas* Kolonie von der Kielweinplatte entnommen und in 10 ml LB+ Medium aufgelöst. Die Suspension wurde bei 35°C für 16 Stunden über Nacht bei 250 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert.

Am Folgetag wurden 100 µl bakterieller Übernachtskultur in 10 ml LB+ Medium aufgelöst und zirka 2 Stunden bei 250 rpm bei 35°C in einem Thermoschüttler inkubiert bis die optische Dichte der bakteriellen Suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm 0,3 erreicht hat. Anschließend wurde die Dichte der bakteriellen *Aeromonas* Suspension auf McFarland 2 eingestellt und 1 ml dieser Suspension mit 2 ml Wasserprobe vermischt und bei Raumtemperatur (25°C) für 30 min inkubiert.

Für die *Vibrio* Phagendetektion wurden zwei *Vibrio* Isolate der Bakterienkultur aus Ödensee (VÖD) und Weißensee (VWE) verwendet. Dafür wurde jeweils eine Kolonie von der selektiven TCBS Platte entnommen und in je 10 ml alkalisches Peptonwasser gelöst. Die bakterielle Suspension wurde bei 37°C für 16 Stunden über Nacht bei 250 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 100 µl *Vibrio* bakterieller Übernachtskultur in 10 ml alkalisches Peptonwasser aufgelöst und zirka 4 Stunden bei 250 rpm bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert bis die optische Dichte der bakteriellen Suspension bei einer Wellenlänge von 600nm 0,3 erreicht hat. Anschließend wurde die Dichte der bakteriellen Suspension auf McFarland 3 eingestellt und 1 ml dieser Suspension mit 2 ml Wasserprobe vermengt und bei Raumtemperatur (25°C) für 30 min inkubiert.

### 3.2.4 Phagennachweis

#### 3.2.4.1 Bakteriophagennachweis *Pseudomonas*

Weiterführend wurde zeitgleich mit dem Anzüchten des Wirtsstammes der semi-solider Agar(ssAgar) 10 Minuten lang aufgekocht und verflüssigt. Dieser wurde dann in Glasröhrchen mit je 4 ml ssLB Agar überfüllt und in einen 50°C Inkubator gegeben.

Es wurden zu den 4 ml ssLB Agar noch 24 µl 1M CaCl<sub>2</sub> hinzu pipettiert. Nach dem Vortexen wurden 2 ml der jeweiligen Wasserproben (siehe Liste) und 1 ml der bakteriellen Suspension PAO1 (McFarland 0,5) dazu pipettiert. Anschließend wurde die nun hergestellte Suspension auf eine LB Agar Platte gegossen. Diese wurde bei 35°C für 16 Stunden (über Nacht) inkubiert.

Es wurden noch zusätzlich 2 Platten mit je einer negativ und einer positiv Kontrolle überimpft.

Als negativ Kontrolle wurde 1 ml PAO1 Stamm, McFarland 2 ml und 2 ml SM Puffer verwendet.

Als positiv Kontrolle wurden Proben aus der Stammsammlung, Lebensmittelisolate und tierische Isolate und Standardstämme aus Stammsammlungen: herangezogen PPL 3 vom 13.12.2019 und PGE 3 vom 13.12.2019

#### Bakteriophagennachweis *Aeromonas*

In die Glasröhrchen mit je 4 ml ssLB wurden 24 µl 1M CaCl<sub>2</sub> und jeweils 1 ml der hergestellten Aeromonaden Suspension (McFarland 2) sowie 2 ml von jeder Wasserprobe hinzu pipettiert. Anschließend wurde diese Suspension gevortext und auf LB Agar Platte ausgegossen. Bei Raumtemperatur (25°C) wurden die Platten für 24 Stunden bebrütet.

Als negativ Kontrolle wurde 1 ml Aeromonas Suspension AM4 (McFarland 2) und 2 ml SM Puffer verwendet.

#### 3.2.4.2 Bakteriophagennachweis *Vibrio*

Der semi-solide TCBS Agar (ssTCBSA) wurde 10 min lang aufgekocht und verflüssigt. Danach wurden die Glasröhrchen mit je 4 ml ssTCBSA (pH 8,6) in einen 50°C Inkubator überführt. Zu je 4 ml ssTCBSA wurde 24 µl 1M CaCl<sub>2</sub> hinzu pipettiert und anschließend gevortext. Nach dem Vortexen wurden 2 ml der jeweiligen Wasserproben (siehe Liste) und 1 ml der bakteriellen Vibrionen Suspension (McFarland 3) dazu pipettiert. Anschließend wurde die hergestellte Suspension auf eine TCBSA Agar Platte (pH 8,6) gegossen. Diese wurde bei Raumtemperatur (25°C) für 48 Stunden inkubiert.

Als negativ Kontrolle wurde 1 ml *Vibrio* Suspension VÖD / bzw. VWE (McFarland 3) und 2 ml SM Puffer verwendet.

#### 3.2.5 Auswertung der Platten

Die Auswertung der Platten erfolgte nach 16 h bzw. nach 48 Stunden.

*Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio* Kolonien wurden ausgezählt und in einer Tabelle dokumentiert.

Einzelne Kolonien wurden entnommen und einem Oxidase Test unterzogen.

Die Platten wurden makroskopisch und mikroskopisch auf Plaques untersucht. Die Plaques der positiven Platten wurden notiert.

Die einzelnen Plaques wurden mit der sterilen Pipittenspitze ausgestochen und in 2000 µl SM Puffer gelöst und 2 min lang bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe eines 0,2 µm PES-Spritzenvorsatzfilters steril filtriert. Bis auf weiteres wurden die steril filtrierten Phagenlysate im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 3.2.6 Glucose Fermentationstest

Phenolrot-Bouillon (Basis) mit einer Glucose-Endkonzentration von 0,5 bis 1 Prozent wird für den Nachweis der Fermentationsaktivität von Mikroorganismen verwendet. Die meisten Endprodukte der Kohlenhydratfermentation sind organische Säuren, die in Gegenwart von Phenolrot einen Farbumschlag des Mediums von Rot nach Gelb verursachen.

Phenolrot-Glucose Bouillon Zusammensetzung\* je 1000ml bi-destilliertes Wasser (g/l):

Pepton 10.0

Fleischextrakt 3.0

Natriumchlorid 5.0

Phenolrot 0.018

pH  $7.4 \pm 0.2$  bei 25°C

Die o.g. Komponenten des Nährmediums wurden unter Aufkochen in 960 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und 15 Minuten lang bei 121 °C autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren wird die Phenolrot-Bouillon (Basis) (960 ml) bis auf 50°C abgekühlt und mit 40 ml 20%-er sterilfiltrierten Glucose Lösung supplementiert.

Die 15 ml Glasröhrchen wurden mit je 10 ml Phenolrot-Glucose Bouillon befüllt. Die Röhrchen wurden mit Hilfe einer Impföse mit 18 bis 24 Stunden alten Kulturen von einer TCBS Agar-Platte inokuliert und gevortext.

Die Röhrchen wurden mit 500 µl Paraffinöl überschichtet und mit aufgesetzten Kappen und bei 35 – 37 °C 24 bis 48 Stunden lang inkubiert und auf Farbumschläge beobachtet. Die bei der Fermentation von Glukose entstehenden Säuren bewirken einen Farbumschlag des gesamten Mediums von rot nach gelb (gelb = positiv).

Als negative Kontrolle wurde *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 verwendet und für die positive Kontrolle wurde *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 und *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 verwendet.

### 3.2.7 Cytochrom-Oxidase-Test

Zum Nachweis von Cytochrom-C-Oxidase wird das Oxidase-Reagenz auf die zu untersuchenden Kolonien aufgetropft. Der Farbstoff N, N-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid oxidiert in Anwesenheit von Cytochromoxidase und Luftsauerstoff, wodurch ein Indophenolkomplex entsteht und die Oxidase-positiven Kolonien innerhalb von zirka 30 Sekunden intensiv blau verfärbt werden. Die Oxidase-negativen Kolonien bleiben unverändert (ungefärbt).

Ein Rundfilter mit dem Durchmesser von 90 mm wurde in eine sterile Petrischale eingelegt. Mithilfe einer Impföse wurde eine einzelne Kolonie von der Platte auf das Filterpapier übertragen und verrieben. Anschließend wurde das Oxidase-Reagenz auf die verriebene

Kolonie aufgetropft. Die Reaktionsergebnisse konnten nach 30-60 Sekunden abgelesen werden.

### 3.2.8 Antibiogramm

Mithilfe eines Agardiffusionstest wurden die Antibiotikaresistenzen (nach CLSI Standardmethode) bestimmt. Es wurden jeweils drei, der zuvor auf TCBS Agarplatten angezüchteten Kolonien, mit einer sterilen Metallöse entnommen und auf eine gedrittelte GKZ-Agarplatte ausgestrichen. Es wurden aus allen Seen jeweils 4 Isolate auf Antibiotikaresistenzen geprüft.

Die GKZ-Agarplatten wurden dann bei 37 °C für 24 h inkubiert. Daraufhin wurden 1,5 ml Eppendorf Röhrchen mit 650 µl MH befüllt. Die davor auf der TCBS-Agarplatte angezüchteten Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze jeweils einzeln entnommen. Diese einzeln entnommene Kolonien wurden in ein mit MH befüllten Eppendorf Röhrchen abgestreift, danach gevortext und anschließend wurde die Bakteriendichte auf McFarland 0,5 eingestellt.

Mithilfe steriler Wattestäbchen (Heinz Herenz; 1030419) wurde die Suspension auf MH-Agarplatten ausgestrichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gesamte MH-Agarplatte mit der Suspension benetzt war.

Es wurde auf eine Resistenz gegenüber folgender Antibiotika getestet: Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Cefotaxime, Colistin, Imipenem, Kanamycin, Tetracyclin und Tobramycin. Für die einzelnen Antibiotika wurden dabei folgende Plättchenkonzentrationen verwendet: für Cefotaxime 30 µg, für Ceftazidime 30 µg, für Ciprofloxacin 5 µg, für Colistin 25 µg, für Gentamicin 10 µg, für Imipenem 10 µg, für Kanamycin 5 µg, für Tetracyclin 30 µg und für Tobramycin 10 µg. Diese Agarplatten wurden darauffolgend bei 35 °C für 24 h inkubiert und anschließend erfolgte Abmessung der Hemmhofdurchmesser in mm sowie die Auswertung.

## 4 Ergebnisse

Nach der Inkubationszeit von 16 bzw. 48 Stunden wurden die Platten ausgewertet. Die auf den 49 Kielweinplatten wachsenden *Pseudomonas* wurden ausgezählt und die Ergebnisse in eine Tabelle eingetragen. *Pseudomonas*-Kolonien konnten in fast alle Seen gefunden werden. Einzig die Platten mit Wasserproben aus einem der fünf Proben aus dem Grundlsee GR5 und aus einer des Faaker Sees F1 zeigten kein *Pseudomonas* Wachstum. Die höchste Anzahl an *Pseudomonas* Kolonien ließen sich in den Wasserproben Altaussee AL4, Ossiacher See O5, Toplitzsee TO3 und Weissensee WE1 nachweisen (Tab.1).

Gleichermaßen wurden die auf den 49 Platten wachsenden *Aeromonas* gezählt und das Ergebnis auch in einer Tabelle protokolliert. Mit der Ausnahme von Altaussee AL2, Faaker See F1, Faaker See F3, Grundlsee GR3, Grundlsee GR5 und Millstätter See M2 konnten *Aeromonas*-Kolonien in allen anderen Wasserproben gefunden werden. In den Wasserproben Altaussee AL5, Grundlsee GR1, Millstätter See M3, Ossiachersee O2, Ödensee ÖD2, Toplitzsee TO4, Weissensee WE1, Weissensee WE2, Weissensee WE4 und Wörthersee WÖ2 waren die meisten *Aeromonas*-Kolonien nachweisbar (Tab.1).

In nahezu jedem beprobten See gibt es bei den *Pseudomonas* und auch *Aeromonas* Kolonien betreffend der Anzahl mehr oder weniger starke Schwankungen.

Alle getesteten *Pseudomonas*-Kolonien sowie alle *Aeromonas*-Kolonien waren oxidase-positiv (Abb.4).



Abbildung 4 Oxidase-positiv getestete Kolonien

Tabelle 1: Ergebnis Auszählung *Pseudomonas* und *Aeromonas*

See	Wasserprobe	CFU/ml	
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
Altaussee	AL1	5e+03	4e+01
Altaussee	AL2	1e+01	unter Nachweisgrenze
Altaussee	AL3	2e+02	2e+02
Altaussee	AL4	6e+02	2e+03
Altaussee	AL5	5e+02	7e+02
Faaker See	F1	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze
Faaker See	F2	5e+02	1e+03
Faaker See	F3	5e+04	unter Nachweisgrenze
Faaker See	F4	1e+02	1e+02
Faaker See	F5	5e+03	2e+03
Grundlsee	GR1	1e+03	7e+01
Grundlsee	GR2	2e+02	4e+02
Grundlsee	GR3	2e+03	unter Nachweisgrenze
Grundlsee	GR4	1e+02	4e+01
Grundlsee	GR5	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze
Millstätter See	M1	1e+02	1e+02
Millstätter See	M2	4e+03	unter

			Nachweisgrenze
Millstätter See	M3	1e+02	6e+01
Millstätter See	M4	5e+01	2e+01
Millstätter See	M5	1e+03	2e+02
Ossiachersee	O1	2e+02	5e+01
Ossiachersee	O2	5e+02	8e+02
Ossiachersee	O3	3e+03	5e+03
Ossiachersee	O4	3e+02	5e+02
Ossiachersee	O5	7e+01	4e+01
Ödensee	ÖD1	3e+03	1e+03
Ödensee	ÖD2	2e+03	6e+03
Ödensee	ÖD3	5e+02	3e+02
Ödensee	ÖD4	2e+03	5e+02
Ödensee	ÖD5	3e+02	2e+03
Teichalmsee	TAS1	1e+03	4e+02
Teichalmsee	TAS2	2e+03	3e+02
Teichalmsee	TAS3	2e+03	4e+02
Teichalmsee	TAS4	2e+03	5e+02
Teichalmsee	TAS5	3e+03	2e+03
Toplitzsee	TO1	2e+03	2e+02
Toplitzsee	TO2	4e+02	4e+02
Toplitzsee	TO3	9e+02	3e+03
Toplitzsee	TO4	1e+03	7e+02
Toplitzsee	TO5	1e+03	2e+02
Weißensee	WE1	8e+02	6e+02

Weißensee	WE2	2e+02	7e+01
Weißensee	WE3	2e+03	4e+03
Weißensee	WE4	5e+01	9e+01
Wörthersee	WÖ1	5e+02	2e+03
Wörthersee	WÖ2	2e+02	8e+01
Wörthersee	WÖ3	2e+03	3e+03
Wörthersee	WÖ4	2e+02	1e+02
Wörthersee	WÖ5	3e+02	3e+02

#### 4.1 Auswertung der Plaques

Für die Auswertung der fraglichen Plaques wurden die über Nacht inkubierten LB Agarplatten mit freiem Auge und unter einem Mikroskop analysiert.

Für den *Pseudomonas* Phagen Nachweis wurden die scheinbaren Plaques aus drei Proben, dem Millstätter See M3, Teichalmsee TAS3 und Weissensee WE3, nochmals auf lytisches Verhalten ausgewertet und als negativ beurteilt.

Die Untersuchung auf *Aeromonas* Bakteriophagen war negativ und konnte mit der Negativprobe vom Millstätter See M4 vergleichend bestätigt werden.

#### 4.2 TCBS Platten Auswertung

Nach der Inkubationszeit wurden die TCBS Platten mit den Wasser-Sammelproben ausgewertet. Die Erstisolierung der TCBS-Agarplatten zeigte ein Wachstum von Kolonien (Abb. 5), welche bei weiterführender Evaluierung mithilfe der MALDI-TOF Methode identifiziert wurden. Es konnten keine *Vibrio* gefunden werden. Zusätzlich wurden die auf TCBS-Agar wachsenden Kolonien einem Glukose-Fermentationstest sowie einem Oxidase-Test unterzogen. Insgesamt waren es 20 Proben, vier Proben aus fünf Seen (siehe Tabelle 2).

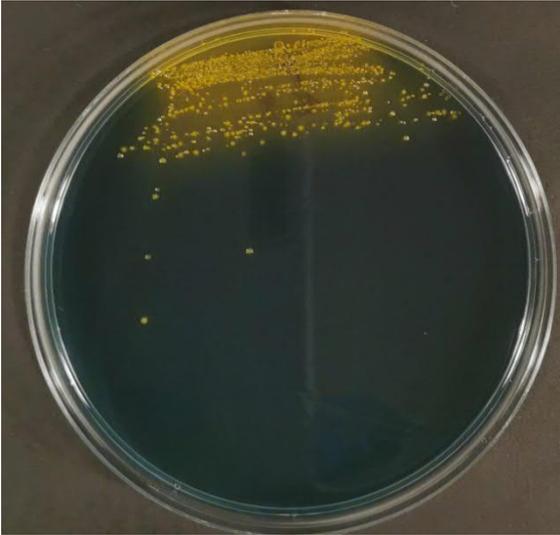


Abbildung 5 TCBS-Agar Kolonien

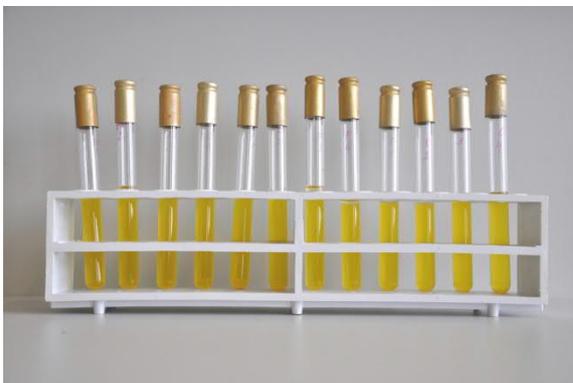
Tabelle 2: TCBS-Agar ausgewählte Isolate

Isolat Nr.	See
VAL1	Altaussee
VAL2	Altaussee
VAL3	Altaussee
VAL4	Altaussee
VF1	Faaker See
VF2	Faaker See
VF3	Faaker See
VF4	Faaker See
VO1	Ossiachersee
VO2	Ossiachersee
VO3	Ossiachersee
VO4	Ossiachersee
VWE1	Weißensee
VWE2	Weißensee
VWE3	Weißensee
VWE4	Weißensee

VWÖ1	Wörthersee
VWÖ2	Wörthersee
VWÖ3	Wörthersee
VWÖ4	Wörthersee

#### 4.3 Glucose Fermentationstest

Alle mit dem Glucose Fermentationstest aus der Tabelle 2 getesteten Proben können die Glucose fermentativ abbauen und sind damit positiv (Abb.6,7).



*Abbildung 6 Glucose Fermentationstest Altaussee, Faaker See, Ossiachersee*



*Abbildung 7 Glucose Fermentationstest Negativ Kontrolle*

#### 4.4 Cytochrom-Oxidase Test

Alle getesteten Proben aus Tabelle 2 zeigten eine Blaufärbung und waren somit Oxidase positiv.

#### 4.5 Antibiogramme

Es wurden 40 Pseudomonaden Isolate zufällig von den Platten aller Seen ausgewählt und auf Antibiotikaresistenzen gegenüber Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Cefotaxime, Colistin, Imipenem, Kanamycin, Tetracyclin und Tobramycin getestet (Tab.3). Zudem wurden alle Aeromonaden, die mittels MALDI-TOF identifiziert wurden ebenfalls auf Antibiotikaresistenzen gegenüber Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Cefotaxime, Colistin, Imipenem, Kanamycin, Tetracyclin und Tobramycin mittels Plättchendiffusionstest geprüft (Tab. 3). Für die Durchführung des Tests und der Resistenzbestimmung wurden nach den CLSI-Richtlinien vorgegangen. Für die Antibiotika Cefotaxime, Colistin, Kanamycin und Tetracyclin sind keine Grenzwerte vorhanden, hier wurden nur die Hemmhöfe in mm angegeben.

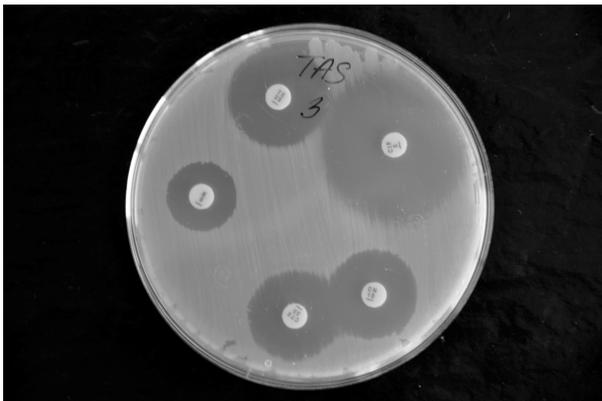


Abbildung 8 Hemmhöfe Teichalmsee 3

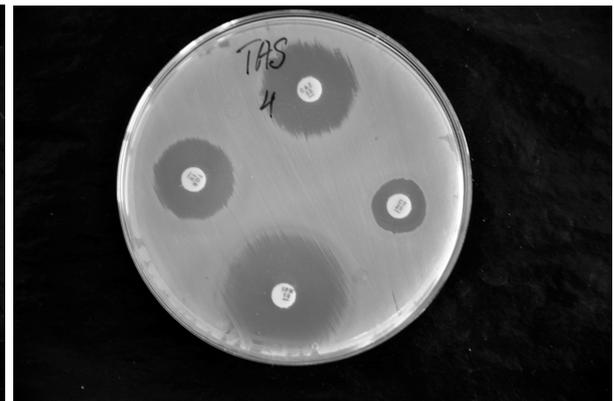


Abbildung 9 Hemmhöfe Teichalmsee 4

Tabelle 3 Abkürzungsverzeichnis Antibiotika

Abkürzung Antibiotika	
CAZ30	Ceftazidime
CIP5	Ciprofloxacin
CN10	Gentamicin
CTX30	Cefotaxime
CT25	Colistin

IMP10	Imipenem
K5	Kanamycin
TE30	Tetracycline
TOB10	Tobramycin

Tabelle 4 Ergebnisse Hemmstofftest *Pseudomonas*

Isolat	See	Hemmhof in mm								
		CAZ30	CIP5	CN10	CT25	CTX30	IMP10	K5	TE30	TOB10
PAL1	Altaussee	32	41	15	13	31	20	15	29	14
PAL2	Altaussee	32	41	15	13	33	18	14	29	15
PAL3	Altaussee	32	40	15	13	38	18	13	29	14
PAL4	Altaussee	33	42	15	14	39	20	13	31	15
PF1	Faaker See	32	43	13	12	36	18	13	34	13
PF2	Faaker See	30	40	14	12	35	14	14	33	13
PF3	Faaker See	32	42	14	13	35	17	13	34	13
PF4	Faaker See	33	38	19	13	39	17	14	33	14
PGR1	Grundlsee	8	25	18	12	26	35	20	35	21
PGR2	Grundlsee	9	28	20	12	25	32	18	34	21
PGR3	Grundlsee	9	26	13	12	26	38	15	29	21
PGR4	Grundlsee	7	27	20	12	26	38	19	35	21
PO1	Ossiachersee	26	39	14	13	37	20	11	34	11
PO2	Ossiachersee	26	38	13	13	35	17	14	34	13
PO3	Ossiachersee	31	39	14	13	37	15	14	30	14
PO4	Ossiachersee	30	37	13	13	37	15	12	33	11
PÖD1	Ödensee	31	38	21	16	35	22	19	7	21
PÖD2	Ödensee	30	34	20	17	33	21	18	7	20
PÖD3	Ödensee	31	36	20	16	32	21	18	7	20
PÖD4	Ödensee	31	35	21	16	34	21	20	8	20
PTAS1	Teichalmsee	25	40	20	13	18	44	19	33	18
PTAS2	Teichalmsee	26	41	22	14	19	43	19	32	19
PTAS3	Teichalmsee	25	40	20	13	18	43	18	32	18
PTAS4	Teichalmsee	26	41	23	13	19	40	22	26	17
VTAS1	Teichalmsee	19	35	30	16	9	17	10	24	16
VTAS2	Teichalmsee	20	35	30	16	13	18	11	24	16
VTAS3	Teichalmsee	26	37	21	15	21	30	17	25	22
VTAS4	Teichalmsee	24	35	21	14	20	32	15	22	21

PWE1	Weißensee	34	42	16	14	40	18	14	35	13
PWE2	Weißensee	34	41	16	13	39	17	15	35	13
PWE3	Weißensee	34	39	15	13	39	19	14	36	14
PWE4	Weißensee	34	44	15	13	40	20	14	38	13
PWÖ1	Wörthersee	36	41	14	13	42	21	13	37	15
PWÖ2	Wörthersee	37	44	17	13	41	20	14	40	15
PWÖ3	Wörthersee	32	36	14	13	36	17	14	34	14
PWÖ4	Wörthersee	30	35	14	13	37	15	13	35	15

Tabelle 5 Ergebnisse Hemmstofftest *Aeromonas*

Isolat	Spezies	See	Hemmhof in mm								
			CAZ30	CIP5	CN10	CT25	CTX30	IMP10	K5	TE30	TOB10
VAL1	<i>Aeromonas veronii</i>	Altaussee	45	43	18	18	38	33	14	32	17
VAL2	<i>Aeromonas veronii</i>	Altaussee	43	40	20	16	39	31	15	35	16
VAL3	<i>Aeromonas veronii</i>	Altaussee	46	43	20	19	37	33	15	34	18
VAL4	<i>Aeromonas veronii</i>	Altaussee	45	42	20	16	39	33	14	32	17
VF1	<i>Aeromonas veronii</i>	Faaker See	40	39	18	15	39	24	13	32	15
VF2	<i>Aeromonas veronii</i>	Faaker See	35	40	16	13	40	15	13	33	14
VF3	<i>Aeromonas veronii</i>	Faaker See	39	39	20	13	42	22	15	34	15
VF4	<i>Aeromonas veronii</i>	Faaker See	42	41	19	14	42	28	15	33	16
VO1	<i>Aeromonas veronii</i>	Ossiachersee	41	42	18	16	44	25	13	34	16
VO2	<i>Aeromonas veronii</i>	Ossiachersee	37	34	19	14	42	21	14	34	14
VO3	<i>Aeromonas veronii</i>	Ossiachersee	39	34	16	14	40	24	14	34	14
VO4	<i>Aeromonas veronii</i>	Ossiachersee	36	40	18	14	40	20	13	34	15
VWE1	<i>Aeromonas veronii</i>	Weißensee	43	40	20	17	40	30	10	34	15

VWE2	<i>Aeromonas veronii</i>	Weißensee	42	40	17	17	39	31	10	32	15
VWE3	<i>Aeromonas veronii</i>	Weißensee	45	40	18	17	40	34	9	32	15
VWE4	<i>Aeromonas veronii</i>	Weißensee	43	38	18	17	39	32	10	32	17
VWÖ1	<i>Aeromonas veronii</i>	Wörthersee	40	39	18	15	40	22	15	33	15
VWÖ2	<i>Aeromonas veronii</i>	Wörthersee	35	38	19	14	37	19	15	29	17
VWÖ3	<i>Aeromonas veronii</i>	Wörthersee	32	39	19	13	37	18	16	27	16
VWÖ4	<i>Aeromonas veronii</i>	Wörthersee	45	39	18	16	37	22	12	31	16

●resistent ●intermediär ●sensibel ●CLSI nicht vorhanden

Bei den getesteten Pseudomonaden Isolaten zeigten sich alle gegen Ciprofloxacin sensitiv (Abb. 8,9). Gegenüber Ceftazidime zeigten sich alle vier Isolate vom Grundlsee resistent, alle anderen Isolate waren sensitiv (Abb. 8,9). Kein Isolat zeigte eine Gentamicinresistenz, aber 11 Isolate wiesen einen intermediären Typ auf. Vier Isolate, eines vom Wörthersee, zwei vom Ossiachersee und eines vom Faaker See zeigten eine Resistenz gegenüber Imipenem und weitere 10 Isolate zeigten einen intermediären Phänotyp (Abb. 8,9). Eine Tobramycinresistenz wurde bei zwei Isolaten aus dem Ossiachersee detektiert und weitere 13 Isolate bildeten einen intermediären Phänotyp aus. Gegenüber Tetracyclin wiesen vier Isolate des Ödensees einen sehr kleinen Hemmhof von nur 7 bzw. 8 mm auf.

Eine Wirksamkeit gegenüber Ceftazidime, Ciprofloxacin und Gentamicin besaßen alle *Aeromonas* Isolate. Zwei Isolate aus dem Ossiachersee und ein Isolat aus dem Faaker See wiesen eine intermediäre Empfindlichkeit gegenüber Tobramycin auf. Die restlichen Isolate zeigten sich empfindlich gegenüber Tobramycin. Ein Isolat aus dem Faaker See zeigte eine Imipenemresistenz und ein Isolat aus dem Wörthersee zeigte sich intermediär resistent. Die Isolate wurden mittels der MALDI-TOF Methode als *Aeromonas veronii* identifiziert. Die Isolate wurden außerdem auf Resistenzen gegenüber Cefotaxime, Colistin, Tetracyclin und Kanamycin überprüft, aufgrund fehlender Referenzwerte für Aeromonaden war keine Einteilung in einen resistenten oder sensitiven Phänotyp möglich.

## 5 Diskussion

Mikrobiologische Verunreinigungen wie eine steigende Anzahl von natürlich vorkommenden Mikroorganismen in Badeseen, welchen Trinkwasserqualität deklariert wird, können für immunsupprimierte Personen eine Gesundheitsgefährdung darstellen. Zwar muss die Wasserqualität von Badegewässern regelmäßig überprüft werden, allerdings umfasst diese Kontrolle keine Mikroorganismen wie *Pseudomonas* oder *Vibrio* Arten (SCHETS et al., 2020).

Trotz Erfüllung der Badegewässerstandards kann *Pseudomonas aeruginosa* für Otitis externa Infektionen nach dem Schwimmen im Süßwasserseen verantwortlich sein, da die Untersuchung auf *Pseudomonas aeruginosa* bei den Badegewässerstandards nicht mit abgedeckt wird (VAN ASPEREN et al., 1995). Dieses allgegenwärtige Bakterium ist allerdings selten in unberührter Natur vorkommend. *Pseudomonas aeruginosa* wird grundsätzlich vermehrt mit menschlicher Aktivität assoziiert gefunden (CRONE et al., 2020). Aus diesem Grund erfolgte auch die in dieser Arbeit durchgeführte Probenziehung an unterschiedlichen Seezugängen. Ein Zusammenhang mit menschlichen Aktivitäten und dem quantitativen Nachweis von *Pseudomonas* konnte in dieser Studie gezeigt werden. Zusätzlich bevorzugen diese Bakterien ein gewisses Temperaturspektrum. *Pseudomonas aeruginosa* wächst in einem breiten Temperaturbereich, bevorzugt aber in warmen Gewässern. Ein Zusammenhang mit dem Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* und der Wassertemperatur könnte hiermit gegeben sein (SCHETS et al., 2020). In dieser Arbeit wurden die Proben in den Sommermonaten gezogen, was zu der durchgehenden Isolation von *Pseudomonas* spp. geführt haben könnte. Unter Laborbedingungen erfolgt das Wachstum bei einem toleranten Temperaturbereich in Abhängigkeit von dem Isolat zwischen 4 bis 42 Grad sowie einer angepassten Inkubationstemperatur für Agarplatten von 36 auf 42 Grad (SCHREIBER et al., 2021). In unseren Versuchen inkubierten wir die Platten bei 37 Grad (optimal für *P. aeruginosa* aber nicht für andere Pseudomonaden) und so war es uns möglich, *Pseudomonas*-Kolonien aus nahezu allen Seen zu isolieren.

Gerade in den Sommermonaten erreichen Badeseen höhere Wassertemperaturen und werden von Menschen gerne für Freizeitaktivitäten genutzt. Jedoch können diese Süßwasserseen von anthropogenen Einflüssen beeinflusst werden, da anthropogene Aktivitäten in Süßwasser Einfluss auf die Nährstoffbelastung in Sediment und Wasser haben können (PURMALIS et al., 2019). In dieser Arbeit wurden die Proben bewusst aus

verschiedensten Stellen wie Schiffanlegestelle, Rutschenbereich oder Kinderbadeplatz gezogen. Da im Sediment häufiger Krankheitserreger nachgewiesen werden als direkt im Wasser (DONG et al., 2019), wurde daher auch bewusst Sediment, Kies und Sand in die Beprobung mit einbezogen. Pseudomonaden sind oftmals gegenüber Antibiotika multiresistent. Das liegt einerseits an der stark ausgeprägten intrinsischen Resistenz aber auch an einer leichten horizontalen Verbreitung von Resistenzgenen innerhalb dieser Mikroorganismen. In unserer Studie wurden jeweils 4 Isolate mit einer Imipenem- und einer Ceftazidimeresistenz detektiert und zwei Isolate mit einer Tobramycinresistenz. Ein Isolat war sowohl gegen Tobramycin als auch gegen Imipenem resistent. Obwohl Tetracyclin nicht gegen Pseudomonasinfektionen eingesetzt wird, sind Rückstände von diesem Antibiotikum auch in natürlichen Gewässern zu finden (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2020). Daher wurden die Isolate gegenüber ihrer Sensitivität gegenüber Tetracyclin getestet. Vier der getesteten Isolate wiesen einen deutlich reduzierten Hemmhof bei den Tetracyclinplättchen auf und könnten somit Resistenzgene gegenüber diesem Antibiotikum tragen.

Die in Süßwasser allgegenwärtig bezeichneten *Aeromonas* scheinen laut HOLMES et al., 1996 in nährstoffarmen Gewässern nur schwer isolierbar. In einem nährstoffreichen Medium und bei hohen Temperaturen erfolgt das Vorfinden hingegen häufiger. In dieser Arbeit wurden die Proben in den warmen Sommermonaten gezogen und mit bis auf wenig Ausnahmen konnten *Aeromonas*-Kolonien in fast allen Seen gefunden werden. Fortführend könnte man auch in den Wintermonaten die Probenziehung wiederholen, aber Berichten zu Folge (BARON et al., 2017) sind keine gravierenden Unterschiede zwischen Winter- und Sommermonaten bekannt.

Das häufige Vorfinden von *Aeromonas* in Seen scheint nicht außergewöhnlich, da die Isolation von *Aeromonas* in Seen fast zu 100 Prozent möglich ist (BRAVO, 2019). In dieser Arbeit wurden *Aeromonas* häufig, aber nicht in jedem See gefunden. Ein geringes Auffinden von *Aeromonas*-Kolonien in manchen Badeseen könnte auch mit der Sauberkeit des Wassers zusammenhängen, da *Aeromonas* auch als Indikator für Verschmutzung angesehen werden kann (HOLMES et al., 1996). Des Weiteren könnte das Fehlen der Isolation in manchen Seen durch ein Nichtwachsen von *Aeromonaden* unter Laborbedingungen geschuldet sein (HOLMES et al., 1996). Temperatur und der pH-Wert spielen für den Nachweis von *Aeromonas* eine wichtige Rolle. Der breite Temperaturbereich

von 4 bis 45 Grad, mit einem Optimum von 22 bis 30 Grad, sowie der pH-Wert 5,2 und 9,8 (BRAVO, 2019) korreliert mit unseren Untersuchungen.

Ob die gefundenen *Aeromonas* spp. ein Risiko für den Menschen darstellen, hängt unter anderem von deren Virulenzgenen ab. Deswegen wäre fortsetzend eine genauere Identifizierung aller Kolonien sowie eine Bestimmung der Pathogenitätsfaktoren notwendig, um eine mögliche Pathogenität abzuklären. In unserer Arbeit wurde mit den auf TCBS-Agar wachsenden Kolonien ein Agardiffusionstest durchgeführt. Diese mithilfe der MALDI-TOF Methode als *Pseudomonas* spp. und *Aeromonas veronii* identifizierten Isolate wurden auf Resistenzen gegenüber Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Cefotaxime, Colistin, Imipenem, Kanamycin, Tetracyclin und Tobramycin getestet. Von diesen in der Tabelle 2 aufgelisteten Isolaten waren die meisten sensibel, ausgenommen ein *Aeromonas veronii*-Isolat aus dem Faaker See zeigte sich resistent gegenüber Imipenem. In einer Studie von DIAS et al., 2012 war eine Vielzahl der getesteten *Aeromonas veronii* sensibel gegenüber Imipenem, wie auch gegenüber Ceftazidime und Ciprofloxacin. Auch die in unserer Arbeit getesteten *Aeromonas veronii*-Isolate waren sensibel gegenüber Ceftazidime, Ciprofloxacin und Gentamicin. In dieser Studie von DIAS et al., 2012 war ein beträchtlicher Anteil resistent gegenüber Tetracyclin, Erythromycin, Ticarcillin, Carbenicillin, Amoxicillin und Ampicillin.

Aufgrund rascher Verbreitung von Resistenzen in aquatischen Umgebungen durch autochthone Bakterien mit antibiotikaresistenten Genen (BARON et al., 2017) wären weiterführend auch die Erstellung von weiteren Antibiogrammen der übrigen gefundenen Isolate interessant, um eine umfangreichere Erkenntnis über die Belastung von antibiotikaresistenten Bakterien zu gewinnen. Allerdings breiten sich antibiotikaresistente Bakterien eher in Umgebungen von Krankenhäusern, Abwässern, Kläranlagen sowie aus naheliegenden Tierfarmen bzw. Flächen landwirtschaftlicher Nutzung aus (CARNELLI et al., 2017).

Da Bakterien der Gattung *Vibrio* in Österreich bereits aus Badeseen isoliert werden konnten, wurde in den hier ausgewählten Badeseen zusätzlich auf diese Gattung untersucht. Die am TCBS-Agar wachsenden Kolonien wurden mittels MALDI-TOF Test überprüft und konnten nicht als *Vibrio* identifiziert werden. Somit konnten in unserem Versuch keine *Vibrio* gefunden werden. Potenziell pathogene *Vibrio* stellen nicht unbedingt ein Risiko für den Menschen dar, solange die mikrobielle Belastung nicht die infektiöse Dosis erreicht. Auch sollte eine Identifizierung von Virulenzfaktoren bzw. Toxinen erfolgen, denn nur bestimmte Spezies

kodieren diese Toxine. Jedoch zählen Nicht-O1 / Nicht-O139-Stämme zur normalen aquatischen Mikrobiota, welche allerdings auch lokal zu Infektionen, wie Ohren- oder Wunderkrankungen, oder Gastroenteritis führen könnten (HUEHN et al., 2014). Außerdem ist bekannt, dass für den Menschen pathogenen *Vibrio*-Arten überwiegend bei niedrigem Salzgehalt und höheren Temperaturen vorkommen. In der Studie von HÄKONSHOLM et al., 2020 konnten die meisten *Vibrio*-Kolonien auf der TCBS Platte bei der höchst gemessenen Temperatur und dem niedrigsten Salzgehalt nahe dem Ufer gezählt werden. *Vibrio* bevorzugen einen hohen pH-Wert in etwa von 7,8 bis 9,1, welcher auch mit dem pH-Wert in dieser Arbeit korrelieren würde.

Mit dem Wirtstamm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 wurde das Wasser der ausgewählten Seen auf *Pseudomonas* Phagen untersucht. Allerdings konnten in keinen der Wasser oder Sedimentproben *Pseudomonas*phagen oder *Aeromonas*phagen isoliert werden. Dafür könnte die Wirtsspezifität der Phagen verantwortlich zeichnen. LATZ et al., 2016 konnten *Pseudomonas aeruginosa* Phagen häufig, vor allem in Abwasser und ungeklärten Gewässern, isolieren. Im Gegensatz zu Seen und Teichen, wo weniger Phagen gefunden wurden. Dies könnte auf ein wenig verschmutztes aquatisches Umfeld mit nosokomialen bakteriellen Krankheitserregern hindeuten.

Neben der Wirtsspezifität können Bakteriophagen mit unvollständiger Plaquesbildung auf einem Bakterienrasen übersehen worden sein. Auch kulturabhängige Methoden können den Phagen-Nachweis beeinflussen. Das Wirtsbakterium muss kultivierbar sein und der Phage sollte genau dieses Bakterium unter Laborbedingungen infizieren, um einen erfolgreichen Phagen-Nachweis zu ermöglichen (DÍAZ-MUÑOZ u. KOSKELLA, 2014).

Da Phagen auf ihre Wirte, die Bakterien, angewiesen sind, kommen sie gleich wie diese ungleichmäßig in der Umwelt vor. Es ist anzunehmen, dass sich Phagen dort verteilen, wo es auch ihre Wirte tun. Und obwohl im Meerwasser mehr Phagen pro Bakterienzelle gefunden werden können, so auch im Süßwasser, ist es für andere komplexere Umgebungen noch ungewiss, ob mehr oder weniger Phagen je Bakterienzelle vorkommen (CLOKIE et al., 2011).

## 6 Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk dieser Diplomarbeit war es herauszufinden, ob *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Vibrio* sowie deren Phagen natürlicherweise in einheimischen Badeseen vorkommen.

Im August 2020 wurden je 5 Wasserproben sowie Sediment (bzw. 4 aus dem Weissensee) aus beliebten Badeseen, jeweils 5 aus Kärnten und der Steiermark gezogen. Zu der Zeit der Probenentnahme wurden diese Seen von zahlreichen Besuchern für Freizeitaktivitäten genutzt und da alle drei Bakterienarten warme Temperaturen bevorzugen, korrelierte die Probenziehung mit den Informationen aus der Literaturrecherche.

Allgemein kann man sagen, dass in Gewässern eine große Anzahl von Bakterien existieren. Das Schwimmen in natürlichen Gewässern kann besonders für immunsupprimierte Menschen ein Problem darstellen, wenn die mikrobiologische Wasserqualität nicht zufriedenstellend ist. Die Wasserqualität kann sich aus Gründen einer steigender Anzahl natürlich vorkommender Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Vibrio*arten verschlechtern, diese werden allerdings nicht standardmäßig kontrolliert. Weiters ist bekannt, dass Infektionen mit *Aeromonas* zwar weltweit vorkommen, jedoch die Gastroenteritis beispielsweise am ehesten in Ländern mit geringeren Hygiene-Standards eine bedeutende Rolle spielt. Zusätzlich beeinflussen die Stärke des Immunsystems eines Menschen, sowie die Eintrittspforte der Bakterien die Entstehung einer Erkrankung bedeutend.

Aus verschiedensten Studien weiß man, dass Wunden, die im Wasser entstanden sind, sich häufiger infizieren als vergleichbare Verletzungen, die nicht dem Gewässer ausgesetzt waren. Daher sollte bei Symptomen eine Antibiotikatherapie angedacht werden. Dabei ist zu beachten, dass Antibiotika eher therapeutisch eingesetzt werden sollen und nicht prophylaktisch.

Die mittels MALDI-TOF als *Aeromonas veronii* identifizierten Isolate wurden auf Antibiotikaresistenzen überprüft. Die in dieser Diplomarbeit getesteten Isolate waren Großteils sensibel, lediglich ein *Aeromonas veronii*-Isolat aus dem Faaker See zeigte sich resistent gegenüber Imipenem. Des Weiteren wurden 36 *Pseudomonas* Isolate auf Resistenzen überprüft. Hier sind vor allem vier Isolate mit Resistenzen gegenüber Ceftazidime und drei gegenüber Imipenem zu erwähnen, sowie ein Tobramycin resistentes

Isolat und ein weiteres Isolat mit einer Zweifachresistenz gegenüber Imipenem und Tobramycin.

*Pseudomonas* und *Aeromonas* kommen wie angenommen in natürlichen Gewässern in höheren und auch niedrigeren Konzentrationen vor. Bis auf wenige Ausnahmen war es möglich, aus nahezu allen Seen Kolonien zu isolieren. Zwar konnten nicht an allen beprobten Stellen eines Sees gleich viele Kolonien gefunden werden und teilweise blieb ein Vorfinden an manchen Stellen aus, aber in jedem der 10 Badeseen waren *Pseudomonas*-, sowie *Aeromonas*-Kolonien vorhanden. Im Gegensatz dazu war die Isolation deren Phagen aus den Badeseen nicht erfolgreich. Vibrionen konnten in keinem in den von uns getesteten Seen gefunden werden. Das könnte der Tatsache geschuldet sein, dass Vibrionen üblicherweise nicht in Süßwasser-Badeseen vorkommen.

Inwiefern die isolierten Bakterien eine Gefährdung für Konsumenten der Badeseen darstellen, würde weiterführende Untersuchungen verlangen. Schlussendlich kann man aber davon ausgehen, dass das Schwimmen in den aus der Steiermark und aus Kärnten ausgewählten Badeseen kein gesundheitliches Risiko darstellt, vorausgesetzt, man hat kein geschwächtes Immunsystem.

## 7 Summary

The main focus of this thesis was to see whether *Pseudomonas*, *Aeromonas* and *Vibrio* and their phages occur naturally in local bathing lakes in Austria.

In August 2020, five water samples and sediment (or four from Lake Weissensee) were taken from popular bathing lakes, five each of Carinthia and Styria. At the time of sampling, these lakes were used by numerous visitors for recreational activities and since all three types of bacteria prefer warm temperatures, the sampling correlated with the information from the literature.

In general, it can be said that many bacteria exist in water. Swimming in natural waters can be a problem, especially for immunocompromised people, if the microbiological water quality is not satisfactory. The water quality can deteriorate due to an increasing number of naturally occurring bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Vibrio* species, but these are not checked as standard operation procedure. *Aeromonas* infections occur worldwide, for example, gastroenteritis, but more prominent in countries with lower hygiene standards. In addition, the strength of a person's immune system and the entry point of the bacteria have a significant influence on the development of a disease.

It is known from a wide variety of studies that wounds derived during recreation in the water get infected more often than comparable injuries that have not been exposed to water. Antibiotic therapy should therefore be considered if symptoms occur. It should be noted that antibiotics should be used therapeutically and not prophylactically.

The isolates identified by MALDI-TOF as *Aeromonas veronii* were checked for antibiotic resistance. Most of the genera tested in this diploma thesis were sensitive, only one *Aeromonas veronii* isolate in Lake Faak was resistant to imipenem. Furthermore antimicrobial resistance was tested in 36 *Pseudomonas* isolates. Resistance in four isolates against ceftazidime, in three against imipenem, in one isolate against tobramycin and combined resistance against tobramycin and imipenem in one isolate were detected.

As assumed, *Pseudomonas* and *Aeromonas* occur in natural waters in higher and lower concentrations. With a few exceptions, it was possible to isolate colonies from almost all lakes. It is true that the same number of colonies could not be found in all sampled places in a lake and in some places they were not found, but *Pseudomonas* and *Aeromonas* colonies

were present in each of the 10 bathing lakes. In contrast, the isolation of their phages from the bathing lakes was unsuccessful. *Vibrio* spp. could not be found in any of the lake. This could be due to the fact that *Vibrio* is not commonly found in freshwater bathing lakes.

The extent to which the isolated bacteria pose a risk to people who recreate in these bathing lakes would require further investigations. Ultimately, however, one can assume that swimming in the bathing lakes from Styria and Carinthia does not pose a health risk, provided that one does not have a suppressed immune system.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
APW	alkalisches Peptonwasser
bv.	Biovar
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CFU	colony forming unit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Exo	Exotoxin
GKZ	Gesamtkeimzahl
LB	Luria-Bertani
MH	Mueller-Hinton
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol
PI-Buffer	Prophage Induction-Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
ss	Semisolid
SsTCBSA	semi-solide TCBS Agar

spp.	Spezies (Plural)
tdh	thermostable direct hemolysin
WHO	World Health Organisation

## 9 Literaturverzeichnis

- AGES, 2020. Badegewässermonitoring [WWW Document]. AGES. URL <https://www.ages.at/themen/umwelt/wasser/badegewaesser/> (Zugriff: 03.12.2021)
- Amt der Kärntner Landesregierung Abt. 8 – Umwelt, Energie und Naturschutz, 2020. 842574\_fh\_seenbericht\_jahresrckblick\_2020\_842574.pdf.
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J., 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nat Rev Dis Primers* 4, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Hn, I.K., Llby, R.M., Bruscolini, F., Donelli, G., 1999. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 65, 6.
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., Chauvin, C., 2017. *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater—An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>
- Bisht, K., Moore, J.L., Caprioli, R.M., Skaar, E.P., Wakeman, C.A., 2021. Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *npj Biofilms Microbiomes* 7, 22. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00194-8>
- Bravo, A.F., 2019. UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SPECIES OF THE GENUS AEROMONAS 399.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8, 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Carnelli, A., Mauri, F., Demarta, A., 2017. Characterization of genetic determinants involved in antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. and fecal coliforms isolated from different aquatic environments. *Research in Microbiology* 168, 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.006>
- Cavallo, R.A., Stabili, L., 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research* 36, 3719–3726. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00107-0)
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A.K., Bhadra, R.K., Ghosh, A.N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S.M., Takeda, Y., Colwell, R.R., Nair, G.B., 2000. Virulence Genes in Environmental Strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 66, 4022–4028. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4022-4028.2000>
- Clokier, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1, 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Colwell, R.R., Macdonell, M.T., De Ley, J., 1986. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 473–477. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-3-473>

- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A.M., Malone, M., Nicolaisen, M.H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., Bjarnsholt, T., 2020. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 128, 220–231. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>
- de Bentzmann, S., Plésiat, P., 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections: *Pseudomonas aeruginosa* and human infections. *Environmental Microbiology* 13, 1655–1665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x>
- Dias, C., Mota, V., Murcia, A.M., 2012. Antimicrobial Resistance Patterns of *Aeromonas* spp. Isolated from Ornamental Fish. *J Aquac Res Development* 03. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000131>
- Díaz-Muñoz, S.L., Koskella, B., 2014. Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 135–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4>
- Dong, P., Cui, Q., Fang, T., Huang, Y., Wang, H., 2019. Occurrence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in water and sediment in urban recreational water. *Journal of Environmental Sciences* 77, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.06.011>
- Duckworth, D.H., Gulig, P.A., 2002. Bacteriophages: Potential Treatment for Bacterial Infections. *BioDrugs* 16, 57–62. <https://doi.org/10.2165/00063030-200216010-00006>
- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Ozdemir, B., Ajmi, N., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2021. The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey. *Aquaculture* 535, 736369. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736369>
- Dyavaiah, M., 2015. Microbial Keratitis in Contact Lens Wearers 13.
- Europäische Umweltagentur, 2020. DE - Bathing water (1).pdf.
- European Environment Agency, 2021. AT\_Bathingwater\_Country reports\_2021 (2).pdf.
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 8, 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Givens, C.E., Bowers, J.C., DePaola, A., 2014. lam.12226\_Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrioparahaemolyticus* – potential roles for fish, oyster, sediment and water.pdf.
- Gjødsbøl, K., Christensen, J.J., Karlsmark, T., Jørgensen, B., Klein, B.M., Kroghelt, K.A., 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound Journal* 3, 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00159.x>
- Guin, S., Saravanan, M., Anjay, Chowdhury, G., Pazhani, G.P., Ramamurthy, T., Chandra Das, S., 2019. Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission. *Heliyon* 5, e01743. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01743>
- Håkonsholm, F., Lunestad, B.T., Aguirre Sánchez, J.R., Martínez-Urtaza, J., Marathe, N.P., Svanevik, C.S., 2020. Vibrios from the Norwegian marine environment: Characterization of associated antibiotic resistance and virulence genes. *MicrobiologyOpen* 9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1093>

- Halpern, M., Izhaki, I., 2017. Fish as Hosts of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00282>
- Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2018. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment. *Science of The Total Environment* 626, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.100>
- Holmes, P., Niccolls, L.M., Sartory, D.P., 1996. 5 The Ecology of Mesophilic *Aeromonas* in the Aquatic Environment 14.
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., 2012. j.1472-765X.2012.03281.x\_Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China.pdf.
- Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C., Oberheitmann, B., Gunzer, F., Brennholt, N., Böer, S., Appel, B., Dieckmann, R., Strauch, E., 2014. Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 304, 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.010>
- Huhulescu, S., Indra, A., Feierl, G., Stoeger, A., Ruppitsch, W., Sarkar, B., Allerberger, F., 2007. Occurrence of *Vibrio cholerae* serogroups other than O1 and O139 in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 119, 235–241. <https://doi.org/10.1007/s00508-006-0747-2>
- Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B.E., Swerdlow, D.L., 2010. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *CMR* 23, 399–411. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-09>
- Jamal, M., Bukhari, S.M.A.U.S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M.A., Hussain, T., Rahman, S. u., Shah, S.S.A., 2019. Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *J Basic Microbiol* 59, 123–133. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800412>
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev* 23, 35–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Javanmardi, F., Emami, A., Pirbonyeh, N., Keshavarzi, A., Rajaei, M., 2019. A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection, Genetics and Evolution* 75, 104037. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104037>
- Ji, M., Liu, Z., Sun, K., Li, Z., Fan, X., Li, Q., 2021. Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations. *Front. Environ. Sci. Eng.* 15, 84. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1378-y>
- Kalatzis, P., Castillo, D., Katharios, P., Middelboe, M., 2018. Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. *Antibiotics* 7, 15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010015>
- Kanamori, H., Weber, D.J., Rutala, W.A., 2016. Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies. *Clin Infect Dis.* 62, 1423–1435. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw122>
- Kärnten.ORF, 2021. Sehr gute Wasserqualität in Kärnten. URL <https://kaernten.orf.at/stories/3112978/> (Zugriff: 03.12.2021)
- Kenneth, T., 2004. *Pseudomonas aeruginosa*.

- Khor, W.C., Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Puthuchery, S., Chua, K.H., 2015. Phenotypic and Genetic Diversity of *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. PLoS ONE 10, e0145933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145933>
- Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., Liebmann, A., Grisold, A.J., Farnleitner, A.H., Kirschner, A., Zarfel, G., 2016. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. Front. Microbiol. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586>
- Kokjohn, T.A., Saylor, G.S., 1991. Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. Journal of General Microbiology 137, 661–666. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-661>
- Kumari, S., Harjai, K., Chhibber, S., 2009. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Specific Bacteriophages Isolated from Sewage Samples. Am. J. Biomed. Sci. 91–102. <https://doi.org/10.5099/aj090200091>
- Kusuma, S.F., Rostinawati, T., Hendriani, R., Budiman, M., Parwati, I., 2021. Effect of water reservoirs types on the prevalence and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bathroom water in hospitals. J Adv Pharm Technol Res 12, 52. [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_103\\_20](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_103_20)
- Lakshmanaperumalsamy, P., Thayumanavan, Tha., Subashkumar, R., 2005. Lakshmanaperumalsamy\_chap12\_12. *Aeromonas Hydrophila A Re-Emerging*.pdf.
- Latz, S., Wahida, A., Arif, A., 2016. jobm.201600108\_Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria.pdf.
- Lee, J.-Y., Jeong, S.-Y., 2018. Characteristics and Effects of Algal-Lytic Bacterium for Control of Fresh Water Microalgae.
- Lepuschitz, S., Arnberger, E., Inreiter, N., Springer, B., Allerberger, F., Ruppitsch, W., 2019. Austria-wide survey on resistant, potentially pathogenic bacteria at Austrian bathing sites, 2017. Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment 70, 81–88. <https://doi.org/10.2478/boku-2019-0007>
- Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C., Liu, Y., 2020. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. BMC Microbiol 20, 141. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01811-w>
- Loo, K., Letchumanan, V., Law, J.W., Pusparajah, P., Goh, B., Ab Mutalib, N., He, Y., Lee, L., 2020. Incidence of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. Rev. Aquacult. 12, 2590–2608. <https://doi.org/10.1111/raq.12460>
- Magin, V., Garrec, N., Andrés, Y., 2019. Selection of Bacteriophages to Control In Vitro 24 h Old Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking and Thermal Water. Viruses 11, 749. <https://doi.org/10.3390/v11080749>
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Imai, S., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy 11, 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Matteucci, G., Schippa, S., Di Lallo, G., Migliore, L., Thaller, M.C., 2015. Species diversity, spatial distribution, and virulence associated genes of culturable vibrios in a brackish coastal Mediterranean environment. Ann Microbiol 65, 2311–2321. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1073-6>

- Mohamed, Z.A., Hashem, M., Alamri, S.A., 2014. Growth inhibition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and degradation of its microcystin toxins by the fungus *Trichoderma citrinoviride*. *Toxicon* 86, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.008>
- Nakai, T., Park, S.C., 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology* 153, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01280-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01280-3)
- Noonburg, G.E., 2005. Management of Extremity Trauma and Related Infections Occurring in the Aquatic Environment: *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 13, 243–253. <https://doi.org/10.5435/00124635-200507000-00004>
- ORF, 2019. Krankenhauskeime in Badeseen gefunden. URL <https://oesterreich.orf.at/stories/3019516/> (accessed 9.15.21).
- Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., Santos, J.A., García-López, M.L., 2011. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology* 147, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.006>
- Patil, H.J., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Smirnov, M., Ofek, T., Nasser, A., Minz, D., Cytryn, E., 2016. Evidence of Increased Antibiotic Resistance in Phylogenetically-Diverse *Aeromonas* Isolates from Semi-Intensive Fish Ponds Treated with Antibiotics. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01875>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 1132–1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Purmalis, O., Klavins, L., University of Latvia, Arbidans, L., 2019. Ecological quality of freshwater lakes and their management applications in urban territory. Presented at the Research for Rural Development 2019: annual 25th International scientific conference proceedings, pp. 103–110. <https://doi.org/10.22616/rrd.25.2019.016>
- Rather, M.A., Willayat, M.M., Wani, S.A., Hussain, S.A., Shah, S.A., 2019. [jam.14351\\_Enterotoxin gene profile and molecular epidemiology of \*Aeromonas\* species from fish and diverse water sources.pdf](#).
- Rawal, I., Joshi, H., Chaudhary, B.L., 2016. Isolation, Identification, and Antibiotics Resistance of *Aeromonas* spp. from Lakes of Udaipur (Rajasthan), India 5.
- RICHTLINIE 2006/7/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES, 2006. [richtlinie.pdf](#).
- Rodríguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T.U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J.L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K.M.M., Virta, M., Do, T.T., Walsh, F., Manaia, C.M., 2020. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International* 140, 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- Roux, F.L., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., Ritchie, J.M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C.C., Strauch, E., Kirschner, A., Huehn, S., 2015. The

- emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>
- Ryan, E.M., Gorman, S.P., Donnelly, R.F., Gilmore, B.F., 2011. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63, 1253–1264. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x>
- Saussereau, E., Debarbieux, L., 2012. Bacteriophages in the Experimental Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice, in: *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 123–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00004-9>
- Schets, F.M., van den Berg, H.H.J.L., Lynch, G., de Rijk, S., de Roda Husman, A.M., Schijven, J.F., 2020. Evaluation of water quality guidelines for public swimming ponds. *Environment International* 137, 105516. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105516>
- Schreiber, C., Zacharias, N., Essert, S.M., Wasser, F., Müller, H., Sib, E., Precht, T., Parcina, M., Bierbaum, G., Schmithausen, R.M., Kistemann, T., Exner, M., 2021. Clinically relevant antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments – An optimized culture-based approach. *Science of The Total Environment* 750, 142265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142265>
- Senderovich, Y., Izhaki, I., Halpern, M., 2010. Fish as Reservoirs and Vectors of *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE* 5, e8607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008607>
- Shuang, M., Lu, W.Y., Geng, L.C., Jing, Y., Min, Y., Ning, B.X., Dong, J., Rong, L.J., Gang, C.Z., Juan, L., 2020. Genetic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Aeromonas* Isolates from Clinical Patients, Tap Water Systems, and Food. *Biomed Environ Sci* 13.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M., 1966. The Aerobic *Pseudomonads* a Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology* 43, 159–271. <https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159>
- Steiermark.ORF, 2019. Steirische Badeseen mit Top-Qualität. URL <https://steiermark.orf.at/stories/1613/> (Zugriff: 03.12.2021)
- Streeter, K., Genecology Research Centre, Faculty of Science, Health, Education and Engineering, University of the Sunshine Coast, Maroochydore DC, Queensland, Australia, Katouli, M., Genecology Research Centre, Faculty of Science, Health, Education and Engineering, University of the Sunshine Coast, Maroochydore DC, Queensland, Australia, 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *iem* 2, 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G., 2001. Bacteriophage Therapy. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.* 45, 11.
- Tianzhi, W., Yunkai, L., Mingchao, L., Peiling, Y., Zhihui, B., 2014. Biofilms on the surface of gravels and aquatic plants in rivers and lakes with reusing reclaimed water. *Environ Earth Sci* 72, 743–755. <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2998-3>
- Valáriková, J., Korcová, J., Ziburová, J., Rosinský, J., Čížová, A., Bieliková, S., Sojka, M., Farkaš, P., 2020. Potential pathogenicity and antibiotic resistance of aquatic *Vibrio*

- isolates from freshwater in Slovakia. *Folia Microbiol* 65, 545–555.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-019-00760-w>
- van Asperen, I.A., de Rover, C.M., Schijven, J.F., Oetomo, S.B., Schellekens, J.F.P., van Leeuwen, N.J., Colle, C., Havelaar, A.H., Kromhout, D., Sprenger, M.W.J., 1995. Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMJ* 311, 1407–1410.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.311.7017.1407>
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2012. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of The Total Environment* 426, 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>
- Vezzulli, L., Colwell, R.R., Pruzzo, C., 2013. Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol* 65, 817–825.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0163-2>
- Vincent, A.T., Fernández-Bravo, A., Sanchis, M., Mayayo, E., Figueras, M.J., Charette, S.J., 2019. Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients. *Infection, Genetics and Evolution* 68, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.019>
- Zdanowicz, M., Mudryk, Z.J., Perliński, P., 2020. Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. *Vet Res Commun* 44, 9–18.  
<https://doi.org/10.1007/s11259-020-09768-x>
- Zhou, S., Yin, H., Tang, S., Peng, H., Yin, D., Yang, Y., Liu, Z., Dang, Z., 2016. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127, 214–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.001>

## 10 Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Beprobte Seen aus der Steiermark und Kärnten</i> .....	28
<i>Abbildung 2 Übersicht Messstellen Millstätter See</i> .....	29
<i>Abbildung 3 Übersicht Messstellen Weißensee</i> .....	29
<i>Abbildung 4 Oxidase-positiv getestete Kolonien</i> .....	37
<i>Abbildung 5 TCBS-Agar Kolonien</i> .....	41
<i>Abbildung 6 Glucose Fermentationstest Altaussee, Faaker See, Ossiachersee</i> .....	42
<i>Abbildung 7 Glucose Fermentationstest Negativ Kontrolle</i> .....	42
<i>Abbildung 8 Hemmhöfe Teichalmsee 3</i> .....	43
<i>Abbildung 9 Hemmhöfe Teichalmsee 4</i> .....	43

### 10.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Ergebnis Auszählung Pseudomonas und Aeromonas</i> .....	38
<i>Tabelle 2: TCBS-Agar ausgewählte Isolate</i> .....	41
<i>Tabelle 3 Abkürzungsverzeichnis Antibiotika</i> .....	43
<i>Tabelle 4 Ergebnisse Hemmstofftest Pseudomonas</i> .....	44
<i>Tabelle 5 Ergebnisse Hemmstofftest Aeromonas</i> .....	45

### 10.3 Datenquellen Messstellen

#### 10.3.1 Datenquelle Steiermark

Kartographie: Ortsplan, (c) basemap.at

<https://gis.stmk.gv.at/wgportal/atlasmobile/map/Basiskarten/Basiskarte>

Stand 24.06.2021

#### 10.3.2 Datenquelle Kärnten

Kartographie: Luftbild, Land Kärnten - KAGIS

<https://gis.ktn.gv.at/webgisviewer/atlas-mobile/map/Basiskarten/Orientierung%20u.%20Kataster>

Stand 24.06.2021