

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

Institut für Fleischhygiene

(Leiterin: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Karin Schwaiger)

Zoonotische Bakterien und deren Phagen in ausgewählten Seen in der Steiermark und Kärnten

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sarah Deimbacher

Wien, im September 2021

Betreuung und Gutachter

Betreuerin:

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert Dipl.ECVPH

(Institut für Fleischhygiene, Fleischtechnologie und Lebensmittelwissenschaften)

Gutachterin:

O.Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.vet.habil. Renate Rosengarten

(Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene)

Danksagung

Zu Beginn möchte ich meiner Betreuerin Frau Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und der umfassenden Betreuung während der Fertigstellung danken.

Ein weiterer Großer Dank gilt Herrn Dr. Dmitri Sofka für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor in stets fröhlicher Atmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Michaela und Harald für die stetige Unterstützung und den Rückhalt während meines Studiums.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Studienzeit begleitet und unterstützt haben. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Freundin Vanessa für die Hilfe während der Probensammlung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Hypothese	3
2 Literaturübersicht	4
2.1 Qualität österreichischer Seen	4
2.2 Zoonotische Erreger, ihr Vorkommen in Gewässern und deren Antibiotikaresistenzen	6
2.2.1 <i>Campylobacter spp.</i>	6
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.3 <i>Salmonella</i>	9
2.2.4 Zoonotische Erreger in Gewässer	10
2.2.5 Antibiotikaresistenzen zoonotischer Erreger	14
2.3 Einbringungswege zoonotischer Erreger in Stillgewässer	19
2.4 Bakteriophagen	26
3 Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Probenmaterial	31
3.1.2 Geräte und sonstige Materialien	31
3.1.3 Bakterien	33
3.1.4 Chemikalien und Primer	33
3.1.5 Nährmedien	35
3.2 Methoden	37
3.2.1 Probennahme	37
3.2.2 Herstellung der Medien	42
3.2.3 Anzüchten der Wirtsstämme für die Phagenisolation	44
3.2.4 Anreicherung und Anzucht der Bakterien	44
3.2.5 pH-Wert-Messung	45
3.2.6 PEG-Präzipitation	45
3.2.7 Bakteriophagen Nachweis	46
3.2.8 Auswertung der Platten	46
3.2.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)	47
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese	48

3.2.11 Antibiotogramm	48
3.2.12 Salmonellen-Agglutinationstest.....	49
4 Ergebnisse	50
4.1 pH-Wert-Messung.....	50
4.2 Anzüchtung der Bakterien	51
4.3 Salmonellen-Agglutinationstest	51
4.4 Bakteriophagennachweis.....	52
4.5 Nachweis der Virulenzgene <i>stxI</i> und <i>stxII</i>	52
4.6 Antibiotogramme	53
5 Diskussion	56
6 Zusammenfassung	61
7 Summary	62
8 Abkürzungsverzeichnis	63
9 Literaturverzeichnis	64
10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	69
10.1 Abbildungsverzeichnis	69
10.2 Tabellenverzeichnis.....	70

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Österreichs Seen sind besonders für ihre ausgezeichnete Wasserqualität bekannt (EUROPÄISCHE UMWELTAGENTUR, 2020). Jährlich locken sie zahlreiche Touristen an und bieten auch für Einheimische einen Ort der Erholung. Besonders durch die Coronavirus-Pandemie im Vorjahr wurde Urlaub in Österreich für viele Einwohner wieder sehr attraktiv. Die Seen bieten Abkühlung in heißen Sommermonaten oder aber auch einen Ort für sportliche Aktivitäten wie dem Schwimmen, dem Stand-Up-Paddling und vielem mehr.

Nach Veröffentlichung einer Studie über die Wasserqualität österreichischer Badegewässer im Jahr 2019 konnte man einen Anstieg an negativen Schlagzeilen, vor allem in den Onlinemedien vermerken. „Gefährliche Keime in Seen gefunden“ meldete die Presse (DIE PRESSE, 2019). Andere Medien berichteten von dem Nachweis von so genannten Krankenhauskeimen in vier österreichischen Badeseen (ORF, 2019).

Ziel dieser vorliegenden Studie war es zu bestimmen, ob das Baden in österreichischen Seen eine Gefahrenquelle für den Menschen durch die Ansteckung mit zoonotischen Erregern darstellt.

Campylobacter (C.), Salmonellen und Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (E. coli) zählen derzeit zu den bedeutendsten Zoonoseerregern in Österreich. Seit einigen Jahren hat *Campylobacter* als wichtigster Auslöser für Erkrankungen des Magendarmtraktes des Menschen die Salmonellose abgelöst. Den wichtigsten Übertragungsweg stellt hierbei die Aufnahme dieser Erreger über kontaminierte Nahrungsmittel dar (AGES, 2018). Daneben können diese Erreger jedoch auch durch unterschiedliche Wege in natürliche Gewässer gelangen und so in Kontakt mit dem Menschen treten. Einbringungswege in Oberflächengewässer sind vielfältig und können beispielsweise bedingt sein durch inadäquat behandeltes Abwasser, Niederschlagsereignisse, durch den Abfluss von landwirtschaftlichen Aktivitäten oder aber auch durch eine Kontamination durch Wildtiere (O'FLAHERTY et al., 2019).

Eine Gefahr für den Menschen besteht dabei durch die Aufnahme dieser Erreger beim Schwimmen in kontaminierten Gewässern. Nach einer Studie konnte gezeigt werden, dass Erwachsene beim Schwimmen bis zu 53 ml an Wasser verschlucken (DUFOUR et al., 2006).

In den meisten Gewässern besteht die höchste Gefahr einer Verschmutzung des Wassers durch Fäkalerreger. Die Übertragung dieser erfolgt meist fäkal-oral. Zur Überprüfung der Reinheit eines Badegewässers werden sogenannte Indikatorbakterien herangezogen, deren Auftreten eine gewisse Grenze nicht überschreiten darf. Als Indikatorbakterien für Süß- und Salzwasser werden *E. coli* und Enterokokken herangezogen. Das Vorhandensein anderer bakterieller oder viraler Erreger wird jedoch routinemäßig nicht überprüft (MCKEE u. CRUZ, 2021).

Infektionen mit Erregern aus Gewässern führen hauptsächlich zu Symptomen im Verdauungstrakt. Nur in seltenen Fällen kann es zu einer Manifestation an der Haut oder des Atmungstraktes kommen. Zu den häufigsten Erregern, welche durch das Baden in Gewässern übertragen werden, zählt man Kryptosporidien, Giardien, Shigatoxin-bildende *E. coli*, *Campylobacter* und Shigellen (PERKINS u. TRIMMIER, 2017).

Neben den Erregern selbst besteht ebenfalls die Gefahr des Eintrags von Antibiotikaresistenzen in die aquatische Umwelt. Neben unbehandeltem, aber auch behandeltem Abwasser, in welchem sich antibiotikaresistente Keime befinden, spielt auch die Nutztierhaltung eine bedeutende Rolle in der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Umwelt. Natürliche Gewässer sind demnach nicht nur Empfänger für antibiotikaresistente Erreger, sondern können auch als Reservoir dieser dienen und wiederum eine Gefahr für den Menschen darstellen (NAPPIER et al., 2020).

Neben dem Einsatz von Indikatorbakterien gewinnen Bakteriophagen als Indikatoren für Wasserverschmutzung in der Forschung immer mehr an Popularität. Unter Bakteriophagen versteht man Viren, welche Bakterien befallen. Im Falle des Indikatorkeims *E. coli* handelt es sich dabei um die so genannten Coliphagen. Sie weisen eine bessere Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen auf als die herkömmlich genutzten Indikatorbakterien und könnten diese somit eventuell im Laufe der Zeit ablösen (LIN u. GANESH, 2013).

Die Verbreitung der Bakteriophagen ist noch nicht vollständig erforscht. Man nimmt jedoch an, dass sie ähnlich verbreitet sind, wie ihre dazugehörigen Bakterien, da die Phagen für ihre Reproduktion vollständig von ihren bakteriellen Wirten abhängig sind (DÍAZ-MUNOZ u. KOSKELLA, 2014). Ziel dieser Studie war es ebenso herauszufinden, ob zu den isolierten Bakterien auch dazugehörigen Bakteriophagen nachgewiesen werden können.

1.2 Hypothese

Die häufigsten zoonotischen Lebensmittelinfektionen werden durch *Campylobacter* spp., Salmonellen und pathogene *Escherichia coli* verursacht. Diese drei Lebensmittelinfektionserreger können aber auch insbesondere im Sommer aus natürlichen Gewässern isoliert werden. Inwieweit eine Verunreinigung von österreichischen Badeseen mit diesen Pathogenen zur Infektionshäufigkeit beiträgt und ob neben diesen Bakterien auch zugehörige Bakteriophagen in den natürlichen Gewässern auftreten, ist nicht bekannt. Daher soll in dieser Arbeit der Hypothese nachgegangen werden, dass das Vorhandensein von *Campylobacter* spp., Salmonellen und pathogenen *Escherichia coli* und deren Phagen in österreichischen Badegewässern in den Sommermonaten nicht zu bedeutenden Infektionsquellen des Menschen zählt.

2 Literaturübersicht

2.1 Qualität österreichischer Seen

Österreichs Seen zählen zu den saubersten Seen in Europa. So konnten sie im Jahr 2019 wieder mit ihrer ausgezeichneten Wasserqualität punkten und landeten im EU-weiten Ranking auf Platz zwei hinter Zypern (EUROPÄISCHE UMWELTAGENTUR, 2020). Einen jährlichen ausführlichen Bericht über die Wasserqualität der Seen in Österreich liefert das Badegewässermonitoring der Österreichischen Agentur für Ernährungssicherheit (AGES). In der von der AGES angelegten Badegewässerdatenbank kann man die Bewertung aller der in dieser Diplomarbeit beprobten Seen finden, mit Ausnahme des Teichalmsees und des Toplitzsees in der Steiermark. Die restlichen der beprobten Seen wiesen auch in der Veröffentlichung der AGES eine ausgezeichnete Wasserqualität auf. In die Beurteilung fallen hierbei unter anderem die Anzahl der koloniebildenden Einheiten an *E. coli* und an Enterokokken pro 100 ml Seewasser sowie die Wassertemperatur und die Sichttiefe (AGES, 2020).

Von einer ausgezeichneten Wasserqualität eines Sees spricht man laut der Richtlinie 2006/7/EG des Europäischen Parlaments und des Europäischen Rates, wenn in 100 ml des beprobten Seewassers weniger als 200 koloniebildende Einheiten an intestinalen Enterokokken und weniger als 500 koloniebildende Einheiten an *E. coli* nachgewiesen werden können (RICHTLINIE 2006/7/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES EUROPÄISCHEN RATES, 2006). Routinemäßig werden Badestellen in Österreich demzufolge nur auf die Indikatorkeime *E. coli* und Enterokokken überprüft. Ein Vorhandensein anderer eventuell humanpathogener Erreger wird bei diesen jährlichen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

In einer Studie aus dem Jahr 2017 wurden 27 Badestellen in Österreich auf das Vorkommen von antibiotikaresistenten pathogenen Bakterien getestet. Von diesen 27 Proben konnten an 23 der beprobten Stellen keine für den Menschen gefährlichen Keime gefunden werden. An den restlichen vier der Probestellen konnten jedoch pathogene Erreger nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um *Pseudomonas aeruginosa* im Stausee in Forchtenstein, um *Enterobacter mori* im Ossiacher See in Bodendorf, um *Enterobacter cloacae* im Donaualtarm in Greifenstein und um *E. coli* im Wocherhafen in Bregenz. Bei den weiteren Laboruntersuchungen konnten in *Enterobacter cloacae* zwei Plasmide und in *E. coli* ein

Plasmid nachgewiesen werden. Diese Laborergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bakterien ihre Antibiotikaresistenzgene im Laufe der Zeit durch Plasmide erworben haben. Das *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat zeigte Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum Aztreonam. Das *Enterobacter mori*-Isolat war resistent gegenüber Imipenem, Meropenem, Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure sowie Moxifloxacin. Das *Enterobacter cloacae*-Isolat zeigte gegenüber folgender Antibiotika keine Wirkung: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxime, Ceftazidime, Aztreonam und Fosfomycin. In dem gefundenen *E. coli*-Isolat konnte das Enzym Extended-Spectrum-Betalaktamase (ESBL) nachgewiesen werden, wodurch es befähigt ist, Beta-Laktam-Antibiotika zu verdauen. Dieses Isolat wies Resistenzen gegenüber Ampicillin, Cefuroxime-Axetil und Cefotaxime auf und zeigte eine intermediär resistente Wirkung gegen Cefepime und Aztreonam. Laut dieser Studie geht man jedoch von keiner Infektionsgefahr mit pathogenen Erregern durch das Schwimmen in österreichischen Seen aus, sofern der Schwimmer ein intaktes Immunsystem besitzt. Personen, welche an offenen Hautwunden oder schweren Hauterkrankungen leiden oder für einen längeren Zeitraum Antibiotika einnehmen müssen, wird vom Baden in offenen Gewässern abgeraten (LEPUSCHITZ et al., 2019).

Eine weitere Studie zur Wasserqualität und über die fäkale Verschmutzung des Neusiedler Sees im Burgenland wurde 2018 veröffentlicht. Diese Studie zeigte, dass eine Verunreinigung des Seewassers, vor allem in Bereichen mit erhöhtem Aufkommen von Menschen und in der Nähe von Wochenendhütten, wo häusliches Abwasser anfällt, sowie auch in der Nähe von Kläranlagen, auftritt. Einfluss auf die Wasserqualität haben ebenfalls Wetterbedingungen, wie Starkregen, der zum Überlaufen von Kanälen und demzufolge zur Einspülung verunreinigten Wassers in den See führen kann. Aber auch Stürme können Erreger aus dem Sediment oder dem Schilfgürtel, wo sich eine höhere Dichte an Fäkalbakterien befindet, in andere Bereiche des Gewässers übertragen. Jedoch zeigte sich auch in dieser Studie, dass österreichische Seen eine außerordentlich gute Wasserqualität aufweisen. So wurden 5 der 7 beprobten EU-Badestellen rund um den Neusiedler See mit einer ausgezeichneten, die restlichen zwei mit einer guten Wasserqualität anerkannt (HATVANI et al., 2018).

2.2 Zoonotische Erreger, ihr Vorkommen in Gewässern und deren Antibiotikaresistenzen

Nach der Definition der World Health Organisation (WHO) versteht man unter einer Zoonose Krankheitserreger, welche von Tieren auf den Menschen übertragen werden können. Diese Erreger können dabei bakteriellen, parasitären oder viralen Ursprunges sein. Die Übertragung von zoonotischen Erregern erfolgt entweder durch den direkten Kontakt zu Tieren, durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel oder Wasser, oder aber auch durch die Umwelt (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2020). Die Übertragung von Krankheitserregern vom Menschen auf Tiere ist jedoch ebenfalls möglich und wird als Anthropozoonose bezeichnet. Bis heute stellen Zoonosen eine relevante Gefährdung für die menschliche und tierische Gesundheit dar und immer wieder werden neue Krankheitsbilder mit zoonotischem Potential entdeckt (BAUERFEIND et al., 2015).

Zu den bedeutendsten zoonotischen Erregern in Österreich zählen derzeit *Campylobacter*, Salmonellen und Verotoxin-bildende *E. coli*. Der wichtigste Übertragungsweg für Menschen stellt dabei die Aufnahme dieser Erreger über kontaminierte Nahrungsmittel, hauptsächlich tierischer Herkunft, dar. Seit einigen Jahren steht die Campylobacteriose an erster Stelle der bakteriell bedingten Enteritiden beim Menschen in Österreich und hat somit die Salmonellose abgelöst (AGES, 2018).

2.2.1 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. ist schon lange als Erreger im veterinärmedizinischen Bereich, zum Beispiel als Verursacher von Durchfällen bei Rindern, bekannt. Die erste Nachweise dieses Erregers beim Menschen erfolgten vermutlich bereits 1880 bei an Durchfall erkrankten Säuglingen in Deutschland. Die Bedeutsamkeit von *Campylobacter* für die menschliche Gesundheit wurde jedoch erst im Laufe der Jahre erkannt. Die erste Identifikation dieses Erregers erfolgte 1913 durch McFadyen und Stockman, die ihn aus Abortmaterial von Schafen isolierten. Ursprünglich wurde *Campylobacter* aufgrund seiner spiralförmigen Morphologie der Gattung der Vibrionen zugeordnet. Erst 1963 wurde der Begriff *Campylobacter* zur Beschreibung des gramnegativen, mikroaerophilen Erregers verwendet. Die wichtigsten Spezies für den Menschen sind *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, wobei *C. jejuni* am häufigsten als Auslöser der humanen Campylobacteriose auftritt. Diese beiden Spezies zählen zu den prominentesten bakteriellen Durchfallerregern für den Menschen weltweit. Das

Leitsymptom für eine Campylobacteriose ist Durchfall, welcher sich wässrig bis blutig darstellen kann. Ebenfalls häufige Beschwerden sind Bauchschmerzen, Fieber und Kopfschmerzen. In den meisten Fällen ist eine Infektion selbstlimitierend und im Vergleich zu Erkrankungen mit anderen zoonotischen Erregern verläuft sie weniger akut. Eine Ansteckung mit *Campylobacter spp.* kann in allen Altersstufen erfolgen, jedoch ändert sich das klinische Bild in Abhängigkeit des Alters und des Immunsystems der Betroffenen. Neben der enteralen Krankheitsform der Campylobacteriose kann es in sehr seltenen Fällen auch zu einer Septikämie kommen, meistens verursacht durch die Spezies *C. fetus*. Der bedeutsamste Übertragungsweg der Spezies *C. jejuni* und *C. coli* ist wie bereits erwähnt, die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel. Nicht ausreichend heiß zubereitetes Geflügelfleisch oder mangelnde Hygiene bei der Verarbeitung sind die Hauptursachen. Neben Geflügel stellen aber auch Schweine, Rinder und Schafe ein Erregerreservoir dar. *C. jejuni* kann vor allem aus Kot von Rindern, Schafen, Enten, in Hühnerkadavern, aber auch aus Oberflächengewässern isoliert werden. Während man *C. coli* hauptsächlich im Kot von Schweinen vorfinden kann. Aber auch verschmutztes Trinkwasser wurde bereits als Infektionsquelle beschrieben, insbesondere wenn Grundwasser, das zuvor nicht desinfiziert wurde, als Trinkwasser verwendet wird. Ebenso kann nicht ausreichend aufbereitetes Abwasser aus Wasseraufbereitungsanlagen in die Umwelt gelangen und dadurch eine mögliche Infektionsquelle für Menschen und Tiere darstellen (MOORE et al., 2005).

2.2.2 *Escherichia coli*

Bei *E. coli* handelt es sich um ein gramnegatives, fakultativ anaerobes und meist bewegliches Bakterium des Genus *Escherichia*. Eine Besiedelung des menschlichen Verdauungstraktes mit diesem Keim erfolgt bereits innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt. Von diesem Zeitpunkt an befindet sich *E. coli* physiologischerweise im Darmlumen von Säugetieren und Vögeln und ist für den Wirt als harmlos zu betrachten, insofern dieser ein ausreichend ausgebildetes Immunsystem besitzt. Grundsätzlich kann man bei *E. coli* zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen unterscheiden. Auf Basis des modifizierten Kauffmann-Schemas werden *E. coli* abhängig ihrer somatischen, flagellaren und kapsulären Oberflächenantigenprofile in Serotypen unterteilt. Nahezu alle *E. coli*-Stämme, einschließlich apathogener Stämme, besitzen so genannte Fimbrien, welche zur Anheftung an Zelloberflächen dienen. Pathogene Stämme besitzen zusätzlich bestimmte fimbriale Antigene,

welche es ihnen ermöglicht, sich noch leichter im Darmlumen und besonders an der Dünndarmschleimhaut anzusiedeln. Man kann sechs unterschiedliche Kategorien an Durchfall auslösenden *E. coli* unterscheiden, wobei jede davon in einer unterschiedlichen Art und Weise mit der Darmschleimhaut interagiert. Die Variabilität des *E. coli*-Genoms ist durch das Vorhandensein von Virulenzplasmiden und chromosomalen Pathogenitätsinseln zu erklären. Zu diesen sechs Kategorien werden folgende *E. coli*-Gruppen gezählt: enterotoxinbildende *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) sowie diffus adhärente *E. coli* (DAEC) (NATARO u. KAPER, 1998). Der erste pathogene *E. coli*-Stamm wurde 1945 aus dem Kot von an Durchfall erkrankten Säuglingen im Vereinigten Königreich isoliert. Bei diesem Stamm handelte es sich um EPEC. Durch die Bindung von EPEC an die Zelloberfläche mit Hilfe von Adhäsinen und der Sekretion von Toxinen kommt es in weiterer Folge zur Sekretion von Ionen, einer entzündlichen Reaktion, einer erhöhten Permeabilität, sowie dem Verlust der Absorptionsfähigkeit der Darmschleimhaut. Aus dieser Kombination an Patho-Mechanismen resultiert schließlich das Leitsymptom Durchfall (KAPER et al., 2004).

EHEC wurde erstmals 1982 als Krankheitserreger für den Menschen erkannt. Als Erregerreservoir für diesen Stamm gelten hauptsächlich Rinder. Die Symptome einer Infektion mit EHEC reichen von nicht-blutigen über blutige Durchfälle bis hin zum hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). HUS ist das Krankheitsbild, welches eine hämolytische Anämie, eine Thrombozytopenie sowie ein akutes Nierenversagen beschreibt. EHEC produzieren das so genannte Verotoxin (VT), welches auch als Shigatoxin (Stx) bezeichnet werden kann, und welches einen Virulenzfaktor dieses Krankheitserregers darstellt. Beim Shigatoxin werden zwei Untergruppen unterschieden und zwar Stx1 und Stx2. Die Sekretion dieses Toxins löst bei Betroffenen blutigen Durchfall aus. Ebenso können eine hämorrhagische Dickdarmentzündung, Nekrosen oder auch Perforationen der Darmschleimhaut die Folge einer Ansteckung mit EHEC sein (KAPER et al., 2004).

ETEC löst wässrigen Durchfall aus, wobei sich die Krankheitsverläufe in ihrem Schweregrad stark unterscheiden können. ETEC produziert zwei Enterotoxine, welche als hitzelabiles (LT) und hitzestabiles Enterotoxin (ST) bezeichnet werden (KAPER et al., 2004).

Neben der Bedeutung als Krankheitserreger spielt *E. coli* aber auch eine Rolle als Indikator für fäkale Verschmutzung von Grundwasser, Trinkwasser sowie Freizeitgewässer. Studien erwiesen, dass das Vorhandensein und Übersteigen einer gewissen Grenze von *E. coli* und

Enterokokken in Salz- und Süßwasser am ehesten mit der Anzahl an Krankheitsausbrüchen nach dem Schwimmen korrelieren. Daher sind diese beiden Erreger gute Indikatoren für die Prävention von durch Wasser übertragenen Krankheitsausbrüchen (ISHII u. SADOWSKY, 2008).

2.2.3 *Salmonella*

Salmonellen sind gramnegative Bakterien und zählen zu den bedeutendsten Krankheitserregern, sowohl für den Menschen, als auch für die Tierwelt. Ausbrüche von *Salmonella* spp. sind gekennzeichnet von hoher Morbidität. Das Genus *Salmonella* (S.) kann in zwei Spezies unterteilt werden, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Während *S. bongori* keine Subspezies besitzt, wird *S. enterica* wiederum in sechs Subspezies untergliedert. Bezeichnet werden diese Subspezies als *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* und *S. indica*. Ebenfalls kann bei *Salmonella* unterschieden werden zwischen typhoiden und nichttyphoiden Salmonellen. Zu diesen werden *S. enterica*, Subspezies *enterica* der Serotypen Typhi und Paratyphi gezählt. Diese lösen das so genannte enterische Fieber beim Menschen aus, wobei *S. Typhi* erstmals 1880 als einer der Erreger dieses Krankheitsbildes erkannt worden ist. Der Verlauf und der Schweregrad einer Infektion mit *Salmonella* sind hauptsächlich von dem jeweiligen Salmonellenserotyp abhängig. Während eine Erkrankung mit nichttyphoiden Salmonellen mildere und für gewöhnlich selbstlimitierende Verläufe zeigt, stellt ein Ausbruch des enterischen Fiebers oftmals eine lebensbedrohliche Situation für die Betroffenen dar, vor allem in unterversorgten Bevölkerungsgruppen. Im Gegensatz zu anderen Salmonellenarten stellt der Mensch das einzige Reservoir für *S. Typhi* und *S. Paratyphi* dar. Die Aufnahme dieser Erreger erfolgt weitgehend über kontaminiertes Wasser, seltener über kontaminierte Lebensmittel. Am häufigsten betroffen sind Säuglinge und Kinder. Die Klinik des enterischen Fiebers mit *S. Typhi* oder *S. Paratyphi* als Verursacher stellt sich ähnlich dar. Vor dem Einsetzen des Fiebers klagen die meisten Patienten über Kopfschmerzen, Durchfall oder Verstopfung sowie Bauchschmerzen. Zu Beginn zeigt sich leichtes Fieber, welches in ein hohes anhaltendes Fieber übergeht und unbehandelt bis zu vier Wochen anhalten kann. Betroffene zeigen eine belegte Zunge, die man auch als typhoide Zunge bezeichnet. In manchen Fällen tritt eine verminderte Herzfrequenz sowie rosafarbene Flecken auf der Haut im Bereich von Brust und

Abdomen auf. Besonders schwere Verläufe zeigen sich hier bei Kindern unter einem Jahr und bei Personen mit geschwächtem Immunsystem.

Ansteckungen mit nichttyphösen Salmonellen sind auch heute trotz verbesserten Hygienestandards sowohl in unterentwickelten, als auch in industrialisierten Ländern von großer Relevanz. Überwiegend stellt bei dieser Kategorie an Salmonellen der Serotyp *S. Enteritidis* den häufigsten Vertreter dar, gefolgt von *S. Typhimurium* und *S. Newport* (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2011).

Als Risikofaktoren für eine Infektion mit diesen Erregern stellen die Kontamination von Rohstoffen durch den Kontakt mit infizierten Menschen oder Tieren sowie eine inadäquate Lagerung oder Verarbeitung von Lebensmitteln dar. So birgt die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, sowohl tierischen als auch pflanzlichen Ursprungs oder verschmutztes Trinkwasser und der direkte Kontakt mit infizierten Tieren für den Menschen eine bedeutende Gefahr. Nichttyphoide Salmonellen können im Darmtrakt zahlreicher Tierarten gefunden werden, zum Beispiel in Hühnern, Enten, Schafen, Ziegen, Schweinen, Reptilien, Hunden, Katzen sowie in einigen Wildtieren. Die häufigsten Symptome bei einer Infektion mit nichttyphoiden Salmonellen sind Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Die Krankheitsprozesse verlaufen vorwiegend selbstlimitierend. Nur in seltenen Fällen, vor allem bei immungeschwächten Personen kann es zu einer systemischen Manifestation dieser Erreger kommen, die sich in den meisten Fällen als Bakteriämie darstellt. Als häufigstes extraintestinales Organ wird die Leber und Milz befallen (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2011).

2.2.4 Zoonotische Erreger in Gewässer

Damit Erreger wie *Campylobacter spp.*, *E. coli* oder Salmonellen an ihren Hauptzielort den Verdauungstrakt gelangen können, müssen sie vom Menschen oral aufgenommen werden. Wenn man von einer Infektionsgefahr mit diesen Erregern durch das Schwimmen in Badeseen ausgeht, müsste der Mensch folglich eine gewisse Menge an Seewasser verschlucken. Nach einer Studie aus dem Jahr 2006 konnte man anhand von Urinuntersuchungen erkennen, dass Erwachsene beim Schwimmen bis zu 53 ml an Wasser verschlucken, bei Kindern waren es sogar bis zu 154 ml. Durchschnittlich nahmen Erwachsene bei einer Schwimmperiode mit einer Dauer von 45 Minuten 16 ml Wasser auf, bei Kindern waren es 37 ml für dieselbe Zeit. (DUFOUR et al., 2006).

In einer Metaanalyse von insgesamt 92 Studien versuchte man die häufigsten Folgen im Zusammenhang mit dem Schwimmen und dem Ausüben von Freizeitaktivitäten in Oberflächengewässern zu bestimmen. In diese Analyse wurden Studien über das Auftreten von Erkrankungen nach dem Kontakt mit Süßwasser wie Seen, Flüssen oder Teichen, aber auch dem Kontakt mit Meerwasser eingeschlossen. Nach Vergleich dieser Studien erkannten die Autoren, dass das Schwimmen das Risiko für eine Infektion mit Erregern des Gastrointestinaltraktes verdoppelt und die Gefahr einer Erkrankung des Respirationstraktes um 75 % steigert. Bei Kindern ist das Risiko eine Magen-Darm-Erkrankung nach dem Wasserkontakt zu erleiden höher, als im Vergleich zu Erwachsenen. Als minimalen Kontakt bezeichnete man Kanu- oder Kajakfahren, Rudern, Bootfahren, Fischen, Stand-Up-Paddling sowie das Rafting in stillen Gewässern. Bei diesen Aktivitäten zeigte sich zwar ein deutlich erhöhtes Risiko für gastrointestinale Erkrankungen, jedoch ein geringeres als beim Schwimmen. Die Gefahr bei diesen Sportarten bleibt das versehentliche Hineinfallen ins Wasser, welches wiederum zu einer Aufnahme pathogener Keime führen kann. Als sportbezogene Kontakte wurden das Surfen, Schnorcheln, Tauchen, Windsurfen, Kanu- und Kajakfahren, sowie das Rafting in wilderen Gewässern eingestuft. Bei diesen Aktivitäten zeigte sich ein gleich hohes bzw. höheres Infektionsrisiko mit wasserbürtigen Erregern, als beim Schwimmen. Diese Metaanalyse zeigte auch, dass das Risiko einer Infektion durch Erreger aus dem Wasser vermutlich von der Intensität des Betreibens der jeweiligen Wassersportart abhängig ist. Hauptrisikofaktoren für die Aufnahme zoonotischer Erreger aus dem Badewasser sind folglich das Schwimmen und der intensive Wasserkontakt bei Wassersportarten (RUSSO et al., 2020).

In vielen Freizeitgewässern sind hauptsächlich Fäkalerreger eine Gefahrenquelle für Badegäste. Die Übertragung dieser Erreger erfolgt dabei größtenteils fäkal-oral. Eine Untersuchung des Wassers auf alle bakteriellen, viralen oder protozoären Erreger, welche vorhanden sein könnten, wäre zwar ideal, jedoch zu kosten- und zeitintensiv. Daher werden zur Überprüfung der Reinheit eines Badegewässers so genannte Indikatorbakterien, die eine fäkale Verschmutzung anzeigen, eingesetzt. Diese Indikatorbakterien besitzen die Eigenschaft, dass sie im Darmtrakt von Menschen und zahlreichen Tieren zu finden sind. Diese Eigenschaften treffen vor allem auf *E. coli* und Enterokokken zu und so werden diese beiden seit 1986 als Indikatorbakterien für Süßwasser eingesetzt (MCKEE u. CRUZ, 2021). Als Indikatoren für enterale Viren werden somatische Coliphagen herangezogen (ISO 10705-2:2000).

Überwiegend führen Infektionen mit Erregern aus Gewässern zu Krankheitssymptomen im Verdauungsapparat, jedoch können in manchen Fällen auch die Haut oder der Atmungstrakt betroffen sein. Zu den häufigsten Erregern, welche den Gastrointestinaltrakt befallen, zählen Kryptosporidien und Giardien. Neben diesen beiden spielen aber auch noch Shiga-Toxin produzierende *E. coli*, Shigellen und *Campylobacter* als wasserbürtige Krankheitserreger eine bedeutende Rolle. Des Weiteren können Cyanobakterien in Gewässern vorkommen, welche sich unter bestimmten Umweltbedingungen sehr rasch vermehren und es in weiterer Folge zu einer gefährlichen Algenbildung führen kann. Durch das Schwimmen in diesen betroffenen Gewässern und der Aufnahme der Toxine können sowohl Symptome im Bereich des Magen-Darm-Traktes, im Atmungstrakt, aber auch der Haut auftreten. In seltenen Fällen kann eine Infektion mit dem Bakterium *Vibrio alginolyticus* zu einer bakteriellen Sinusitis oder einer Entzündung des äußeren Gehörganges führen. Legionellen können ebenfalls in Gewässern vorkommen und wenn diese beim Schwimmen eingeatmet werden, besteht die Möglichkeit, dass sie und in weiterer Folge respiratorische Symptome verursachen. Sehr selten kommt eine Infektion mit *Naegleria fowleri* vor, welche sich in Form einer Meningoenzephalitis darstellen kann, die in schweren Verläufen tödlich endet. Entzündliche Hautveränderungen nach dem Schwimmen lassen sich hauptsächlich auf *Pseudomonas aeruginosa* zurückführen. Die Zerkariendermatitis hingegen wird durch Schistosomen verursacht, welche von Wassergeflügel ins Wasser abgegeben werden. Zellulitis, eine Entzündung des Unterhautgewebes, kann durch *Staphylococcus aureus* oder Streptokokken ausgelöst werden, wobei *Pseudomonas aeruginosa* und *Aeromonas hydrophila* oftmals ebenfalls daran beteiligt sind. *Vibrio vulnificus* wird üblicherweise durch die Aufnahme von rohen kontaminierten Schalentieren übertragen, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese Bakterien ebenso über verletzte Hautstellen einwandern und so zu schweren Erkrankungen führen können. Meistens ist das Weichteilgewebe betroffen und es kann zu einer nekrotisierenden Entzündung von Haut und Unterhaut kommen. Leptospiren, die Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Muskelschmerzen und in seltenen Fällen eine Meningitis auslösen, werden indessen entweder über die Schleimhäute oder oral über kontaminiertes Wasser aufgenommen. Selten können infizierte Personen ein Leber- oder Nierenversagen mit Todesfolge erleiden (PERKINS u. TRIMMIER, 2017).

Die Gefahr zoonotische Erreger wie *Campylobacter* durch Wasser aufzunehmen besteht vor allem beim Trinken von unbehandeltem Wasser oder aus privaten Brunnenwässern, sowie beim Schwimmen in natürlichen Oberflächengewässern (RAVEL et al., 2016). In einer Studie

aus Finnland wurden sporadisch auftretende Infektionen mit *Campylobacter spp.* untersucht. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass 48 von 100 Personen, welche nachweislich mit *Campylobacter spp.* infiziert waren, zuvor in natürlichen Gewässern geschwommen sind (SCHÖNBERG-NORIO et al., 2004). Bei einer Beprobung von 22 Badestränden an 18 Seen in Kanada über einen Zeitraum von drei Jahren konnte man an jeder der beprobten Stellen thermotolerante *Campylobacter* nachweisen. Bei 21 der 22 Proben handelte es sich hierbei um *Campylobacter jejuni*, mit einer niedrigen nachgewiesenen Konzentration an *Campylobacter spp.* (GUY et al., 2018). Einer anderen Studie zufolge spielt das Schwimmen in Badestrandgewässern jedoch eine untergeordnete Rolle für eine Infektion mit *Campylobacter spp.*. Die Hauptansteckungsquellen für den Menschen stellen hier der Kontakt mit Hühnern sowie Rindern dar (WILSON et al., 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine norwegische Studie aus dem Jahr 2003, welche das Baden in natürlichen Gewässern oder in Pools nicht zu den bedeutenden Risikofaktoren für die Campylobacteriose impliziert. Eine größere Rolle sehen sie im Trinken von nicht ausreichend aufbereitetem Wasser, vor allem in Entwicklungsländern (KAPPERUD et al., 2003).

Bei einer Forschungsarbeit in der von drei Seen im Mittleren Westen der Vereinigten Staaten die Konzentrationen an *E. coli* im Sand vom Badestrand, im Sediment unter Wasser und im Wasser selbst detektiert wurden, zeigte sich, dass die *E. coli*-Konzentrationen im Sand vom Badestrand mit der Nähe zum Wasser zunahmen. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass durch etwaige Wellenaktivität Bakterien, welche im Sandstrand angereichert sind, ins Wasser gespült werden können. Des Weiteren zeigte sich, dass die Konzentrationen an *E. coli* im Sediment höher waren, als im Wasser selbst. Zudem waren in den seichteren Schwimmbereichen die Konzentrationen an *E. coli* höher, als am offenen See. Stiegen die Konzentrationen im küstennahen Sand an, so stiegen gleichzeitig auch die Mengen an gefundener *E. coli* im Schwimmbereich. Der küstennahe Strandbereich konnte somit als Reservoir für *E. coli*, besonders bei warmen Temperaturen erkannt werden (PALMER et al., 2020). Gleichartige Ergebnisse konnten auch in einer anderen Studie beobachtet werden, welche sich mit den *E. coli*-Konzentrationen des Lake Superiors in Nordamerika beschäftigte. Die Konzentrationen an *E. coli* stiegen bei hohen Temperaturen im Wasser an und die größte Dichte wurde ebenso im küstennahen Sand gefunden. Hier wurden zusätzlich 3557 *E. coli*-Isolate untersucht und lediglich bei einem handelte es sich um einen humanpathogenen Keim, nämlich EPEC. Besonders hohe Konzentrationen konnten in den Herbstmonaten, im Vergleich zum Frühling, vermerkt werden (ISHII et al., 2007).

Zu den bedeutendsten Gefahrenquellen für eine Infektion mit *Salmonella* gehören internationale Reisen, die Einnahme von Antazida und Antibiotika, Vorerkrankungen, sowie das Essen von rohen Eiern oder ein Restaurantbesuch. Eine weitere Möglichkeit der Ansteckung ist durch die Umwelt möglich, sei es durch das Trinken von kontaminiertem Wasser oder durch die Aufnahme während dem Schwimmen in Freizeitgewässern (DOMINGUES et al., 2012). In einer Studie aus Argentinien wurden verschiedene Oberflächengewässer, wie Lagunen, Flüsse und Strände auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. In 6 der 68 Wasserproben konnten Salmonellen entdeckt werden. Die gefundenen Salmonellen gehörten zu folgenden Spezies und Serovaren: *S. enterica* Serovar (Ser.) Give, *S. enterica* subspecies IV, *S. enterica* Ser. Bredeney, *S. enterica* Ser. Rubislaw, und *S. enterica* Ser. Enteritidis. Jedoch zeigten die in der Umwelt gefundenen Salmonellen eine niedrigere Invasivität und die Erkrankten wiesen nur milde Symptome auf. Eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein der fäkalen Indikatorbakterien und der Präsenz von Salmonellen konnte nicht nachgewiesen werden. So nimmt man an, dass *E. coli* kein geeigneter Indikator für das Vorhandensein von Salmonellen in Gewässern darstellt (TRACOGNA et al., 2013). Ebenso wurde Sand von vier Salzwasserstränden im Nordwesten und Südwesten von England auf das Vorhandensein von Salmonellen beprobt. Zwei dieser Strände entsprachen jeweils den Standards der Richtlinien für europäische Badegewässer, die restlichen zwei jedoch nicht. Neun der 100 Proben aus dem Nordwesten wiesen Salmonellen auf und aus einer der 82 Proben aus dem Südwesten konnte man ebenfalls Salmonellen isolieren. Von den Stränden, welche nicht den europäischen Standards entsprachen, konnten sechs verschiedene Salmonellen-Serotypen isoliert werden. Im Vergleich dazu konnten von den anderen Stränden nur drei Serovare und zwar *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* und *S. Virchow* nachgewiesen werden (BOLTON et al., 1999).

2.2.5 Antibiotikaresistenzen zoonotischer Erreger

Der Einsatz von Antibiotika ist von besonderer Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Sie werden sowohl zur Behandlung von bakteriellen Infektionen, als auch zur Prävention von solchen eingesetzt. Die steigende Resistenzlage der Bakterien stellt eine große Bedrohung für die Menschheit dar, da eine Infektion mit resistenten Keimen immer mit einem größeren Risiko für die Gesundheit sowie einem Mehraufwand an klinischer Versorgung der Erkrankten einhergeht. Antibiotikaresistenzen spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der

Pflanzenproduktion, der Tierhaltung und der Aquakultur. So kann es durch die Lebensmittelversorgung zu einer weitreichenden Verbreitung von antimikrobiell resistenten Bakterien kommen. Die Umwelt und damit auch Gewässer nehmen bei der Verbreitung von Resistenzen einen besonderen Stellenwert ein, so können sie nicht nur als Empfänger, sondern auch als natürliches Reservoir und Quelle für resistente Erreger dienen. Das Vorhandensein von resistenten Keimen in Oberflächengewässern stellt vor allem eine Gefahr beim Schwimmen und sonstigen Aktivitäten am Wasser dar. So konnten ESBL-produzierende *E. coli* aus Freizeitgewässern im Vereinigten Königreich isoliert werden, welche man anschließend auch im Darm von Surfern vorfand (NAPPIER et al., 2020). Trotz dessen, dass Kläranlagen verschiedenste Verfahren zur Beseitigung oder Inaktivierung von Krankheitserregern anwenden, konnten antibiotikaresistente Rückstände sowohl in Form von antibiotikaresistenten Bakterien, als auch von Antibiotikaresistenzgenen im Abwasser nachgewiesen werden (NAPPIER et al., 2020).

Durch die Erfindung von Antibiotika gelangten diese im Laufe der Zeit entweder durch die humanmedizinische oder veterinärmedizinische Anwendung bzw. auch über Körperpflegeprodukte und die kommerzielle Tierproduktion in die Umwelt. Der Einsatz von Antibiotika führt zu einem Selektionsdruck unter den Bakterien und es kann in weiterer Folge zur Resistenzentwicklung über einen horizontalen Gentransfer oder durch Mutation kommen. Der horizontale Gentransfer kann in den folgenden drei Formen ablaufen: als Transformation, Konjugation oder auch Transduktion. Die Transformation beschreibt die Aufnahme von genetischem Material aus der Umwelt. Als Konjugation bezeichnet man die direkte Übermittlung von genetischem Material von einer Zelle auf die andere und die Transduktion stellt die Übermittlung von genetischem Material durch Bakteriophagen dar. Der Austausch von Resistenzen zwischen Bakterien wird erleichtert durch Plasmide, Prophagen und Integrons. Resistente Keime können auf mehreren Wegen in die Umwelt kommen. Zum einen kann die Verbreitung der resistenten Erreger durch die Verschmutzung der Umwelt mit unbehandeltem Abwasser als Ursache fungieren. Ebenso kann medizinischer Abfall, wie zum Beispiel Ausscheidungen von mit Antibiotika behandelten Patienten, durch eine unzureichende Aufbereitung des Abwassers in Krankenhäusern in die Umwelt gelangen. Neben diesen genannten Eintragungswegen kann jedoch auch bereits behandeltes Wasser eine wichtige Rolle in der Verbreitung von Resistenzen darstellen. Studien konnten darlegen, dass Wasseraufbereitungsanlagen zwar die Konzentrationen an Bakterien senken, jedoch konnten sie dabei keinen merklichen Einfluss auf den Anteil an resistenten Keimen nehmen

und somit konnten sie auch nicht die Verbreitung dieser in die aquatische Umwelt reduzieren. Der Klärschlamm, welcher in solchen Kläranlagen entsteht, wird oftmals als Zusatz in der Landwirtschaft eingesetzt und dient hierbei zur Verbesserung der Bodenbeschaffenheit, wodurch es wiederum zu einer Verbreitung kommen kann. Ebenso spielt der Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft, der Aquakultur und der Tierhaltung eine bedeutende Rolle. Die Bedeutung der Resistenzlage durch die Tierproduktion spiegelt sich im globalen Verbrauch von Antibiotika wider. 73 % aller gekauften Antibiotika finden ihren Nutzen in der Tierproduktion. Wildvögel können ebenso eine Eintragsquelle darstellen, so können sie sowohl als Vektor als auch als Reservoir für antimikrobiell resistente Keime für den Menschen angesehen werden (NAPPIER et al., 2020).

Durch die Überlebensfähigkeit der Antibiotikaresistenzgene in der Umwelt müssen sie als Gefahr für die humane, aber auch tierische Gesundheit angesehen werden. Süßwassergewässer können dabei ein wichtiges Reservoir für antibiotikaresistente Keime darstellen und vor allem in Seen und Flüssen besteht die Möglichkeit, dass die Konzentrationen besonders hoch sind. Vorwiegend findet man in ihnen Resistenzen gegenüber Cefalotin, Penicillin, Tetrazyklin, Ampicillin und Chloramphenicol. Das Vorhandensein bemerkenswerter Konzentrationen an resistenten Bakterien weist auf das Vorkommen von Antibiotika in Seen und Flüssen hin. Im Vergleich zu diesen Wassersystemen, findet man in Staudämmen, Teichen und Quellen eher geringere Mengen an resistenten Erregern. Ein Nachweis der Übertragung von Antibiotikaresistenzen in Süßwasser gestaltet sich als schwierig, jedoch gibt es einige indirekte Hinweise darauf. Der gleichzeitige Nachweis ähnlicher Resistenzgene in Krankheitserregern, Kommensalen und auch in der Umwelt nach der Einführung eines bestimmten Antibiotikums in der Medizin, wären solche Zusammenhänge. Ebenso bekräftigt wird diese Annahme durch den gleichzeitigen Nachweis von mobilen genetischen Elementen von Krankheitserregern in Wasservögeln sowie in deren Lebensräumen. Dies lässt darauf schließen, dass Wildtiere und besonders Vögel an der Resistenzverbreitung in der Umwelt beitragen können. Ein weiteres Indiz für das Entstehen von Antibiotikaresistenzen in Gewässern sind enterale Bakterien, die aus Süßwasser isoliert werden. Da diese in Gewässern meist eine lange Überlebensfähigkeit aufweisen, kann das Auftreten eines horizontalen Gentransfers zwischen den enteralen Erregern und der aquatischen Umwelt begünstigt sein. Überdies fördert die große Speziesvielfalt, welche in Süßwasser gefunden werden kann, die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers. So können natürliche Gewässer, welche zur Erholung genutzt

werden, als Überträger von antimikrobiell resistenten Keimen für den Menschen angesehen werden (NNADOZIE u. ODUME, 2019).

In einer Studie in Beijing in China wurden drei Badeseen beprobt und auf das Vorhandensein von antibiotikaresistenten Erregern untersucht. Bei den Ergebnissen zeigten sich hohe Resistenzraten gegenüber den Antibiotika Penicillin-G, gefolgt von Ampicillin, Vancomycin und Erythromycin. Gegenüber Gentamycin, Chloramphenicol, Ceftriaxon und Tetrazyklin waren die Resistenzraten niedriger. Bei der Mehrheit der gefundenen Bakterien handelte es sich um gramnegative Bakterien, hauptsächlich konnten sie den Proteobakterien zugeordnet werden (FANG et al., 2018).

Eine kanadische Forschungsarbeit beschäftigte sich mit dem Vorkommen von Antibiotikaresistenzen in *E. coli* und *Salmonella* in Wasserproben aus dem Grand River. Beprobt wurden hierbei ausgewählte Wasserstellen, unter anderem auch drei Badestellen während den Sommermonaten. Dabei zeigten sich 51 der 320 gefundenen Salmonellen-Isolate als resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Bei den Serovaren handelte es sich hauptsächlich um *S. Typhimurium*, *S. Thompson* und *S. Newport*. Die *Salmonella* Isolate waren resistent gegenüber Streptomycin, Tetrazyklin, Sulfisoxazol und Ampicillin. Drei der Isolate zeigten Resistenzen gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Ceftriaxon sowie Ceftiofur, wobei eines dieser Isolate aus einem der Badegewässer stammte. Bei den *E. coli*-Isolaten zeigten sich die höchsten Konzentrationen stromabwärts in der Nähe von Kläranlagen. Im Vergleich dazu waren die Konzentrationen an den Badestränden am geringsten. Von den 93 Isolaten waren 20 resistent gegenüber mindestens einem Antibiotikum. Die häufigsten Resistenzen zeigten sich gegenüber Tetrazyklin, Ampicillin, Streptomycin und Sulfisoxazol (KADYKALO et al., 2020).

Ebenso konnten an vier österreichischen Badestellen vier verschiedene antibiotikaresistente Erreger nachgewiesen werden. Dazu zählte unter anderem ein *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat, welches intermediär resistent gegenüber dem Antibiotikum Aztreonam war. Zugleich wurde ein *Enterobacter mori*-Isolat gefunden, welches Resistenzen gegenüber Imipenem, Meropenem, Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure sowie Moxifloxacin aufwies. Des Weiteren konnte ein *Enterobacter cloacae*-Isolat nachgewiesen werden, welches resistent gegenüber Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxime, Ceftazidime, Aztreonam und Fosfomycin war. Das gefundene *E. coli*-Isolat zeigte keine Wirkung gegenüber

Ampicillin, Cefuroxime-Axetil und Cefotaxime und war intermediär resistent gegenüber Cefepime und Aztreonam (LEPUSCHITZ et al., 2019).

Innerhalb der EU ist die Überwachung der Antibiotikaresistenzen der zoonotischen Erreger Salmonellen, *Campylobacter jejuni* sowie *E. coli* in lebensmittelproduzierenden Tieren, sowie in deren Fleisch verpflichtend durchzuführen. Im Jahr 2018 wiesen hohe Raten an Salmonellen Resistenzen gegenüber den Antibiotika Sulfonamide, Tetrazyklin und Ampicillin auf. Die Resistenzlage ist dabei sehr abhängig vom jeweiligen Serovar. So zeigten sich wenige Resistenzen beim Serovar *S. Enteritidis*, jedoch sehr hohe bei den Serovaren *S. Typhimurium* und *S. Kentucky*. Bei *Campylobacter spp.* ist lediglich die Überwachung von *C. jejuni* verpflichtend, eine Überwachung der Antibiotikaresistenzen von *C. coli* erfolgt auf freiwilliger Basis. Das Monitoring zeigte sehr hohe Levels an Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen und Tetrazyklinen. Resistenzen gegenüber Erythromycin waren in *C. coli* höher als in *C. jejuni*. Bei *E. coli* zeigten sich global gesehen in allen Tierarten hauptsächlich Resistenzen gegenüber Ampicillin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim und Tetrazyklinen. Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin und Nalidixinsäure waren sehr häufig in Masthühnern und Puten zu finden, jedoch nur in geringen Mengen in Kälbern und Schweinen (EFSA, 2020).

Die Resistenzlage zoonotischer Erreger wie *Campylobacter spp.* ist von größter Bedeutsamkeit, denn *Campylobacter* zählt, wie bereits erwähnt, zu dem wichtigsten bakteriellen Krankheitserreger der humanen Gastroenteritis weltweit. Zu den Therapeutika der Wahl bei einem nicht selbstlimitierenden Verlauf der Campylobacteriose, zählen die Antibiotika der Gruppe der Fluorchinolone oder Makrolide. Amerikanischen Studien zufolge wurden im Jahr 2013 bei 24 % der getesteten *Campylobacter*-Isolate Resistenzen gegenüber diesen genannten Antibiotika, genauer gesagt gegenüber Ciprofloxacin und Azithromycin, nachgewiesen. Die Wirkung der Fluorchinolone zielt auf die essentiellen Enzyme der DNA-Gyrase und der Topoisomerase IV ab. Der hauptsächliche Resistenzmechanismus von *Campylobacter spp.* gegenüber Fluorchinolonen besteht in einer Punktmutation im Bereich der Chinolonresistenz bestimmenden Region der Gyrase A. Dabei ist eine einzelne Punktmutation ausreichend um die Anfälligkeit von *Campylobacter spp.* für diese Antibiotika wesentlich zu vermindern. Diese rasante Entwicklung und die Eigenschaft von *Campylobacter* sehr veränderlich zu sein, unterstreicht die Wichtigkeit der Resistenzüberwachung dieses Erregers (SHEN et al., 2018).

2.3 Einbringungswege zoonotischer Erreger in Gewässer

Die Einbringungswege pathogener Erreger in Stillgewässern, wie Seen, sind vielfältig. Hauptsächlich entstehen die Verunreinigungen durch Fäkalerreger, welche durch inadäquat behandeltes Abwasser aus Kläranlagen oder aber auch durch verschiedene Wetterbedingungen, wie Niederschläge und Wind in die Umwelt gelangen können. Ebenso kann die Verunreinigung durch den Abfluss von landwirtschaftlichen Aktivitäten oder durch den Zufluss von kontaminierten Flüssen bedingt sein (siehe Abb. 1). Überdies können Abflüsse von Schiffen oder Hinterlassenschaften von Wild- oder Haustieren Kontaminierungswege für Badegewässer darstellen (O'FLAHERTY et al., 2019).



Abbildung 1: Verunreinigung des Grundwassers durch landwirtschaftliche Aktivitäten

Mit dem Zuwachs der Bevölkerung und dem Voranschreiten des Klimawandels stellt aufbereitetes Abwasser eine immer wichtiger werdende nachhaltige Ressource bei der Wasserversorgung dar. Durch die Sammlung von Abwasser und die Aufbereitung davon, werden pathogene Erreger oder auch andere Verunreinigungen größtenteils beseitigt, wodurch in weiterer Folge ein wiederverwertbares Gut entstehen kann. Jedoch besteht durchwegs die Möglichkeit, dass Krankheitserreger die Aufbereitung des Abwassers überleben und so in nachgelegene Gewässer gespült werden. Eine Studie aus dem Vereinigten Königreich beschäftigte sich mit dem potentiellen Infektionsrisiko mit Pathogenen durch Wasseraktivitäten in Flüssen, welche durch aufbereitetes Wasser verunreinigt sein könnten. Flüsse, aber auch aufbereitetes Abwasser wurden auf das Vorhandensein der

Indikatorbakterien *E. coli* und Enterokokken, sowie von Cryptosporidien, Salmonellen und Adenoviren an verschiedenen Probestellen untersucht. Die beprobten Flussstellen wiesen nach europäischen Standards für Badegewässer eine „exzellente Wasserqualität“ auf, lediglich an zwei der Beprobungsstellen wurde eine „gute“ Qualität ermittelt. Während Resultate in dieser Studie darauf hinweisen, dass das Risiko einer Infektion mit Salmonellen oder Cryptosporidien aufgrund von generell niedrigen Konzentrationen eher vernachlässigbar sei, zeigte sich die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit Adenoviren in Gewässern, welche mit aufbereitetem Abwasser in Kontakt kamen, bei allen Aktivitäten am Wasser, jedoch besonders beim Schwimmen, als sehr hoch (PURNELL et al., 2020).

Neben den Erregern selbst, könnten auch Antibiotikaresistenzgene durch die Aufbereitung und Wiederverwendung von Abwasser in die Umwelt gelangen. Da die meisten antimikrobiellen Wirkstoffe nach ihrer Anwendung nicht vollständig metabolisiert werden, ist es möglich, dass ihre Rückstände über menschliche oder tierische Ausscheidungen in das Abwasser und in weiterer Folge in Kläranlagen gelangen. In diesen können die Antibiotika jedoch nicht vollständig eliminiert werden, was folgend zu einer Verbreitung von antibiotikaresistenten Mikroorganismen in Oberflächengewässern oder im Grundwasser führt (LENART-BOROŃ et al., 2020). Hierbei besteht dann die Gefahr der Übertragung von Resistenzgenen der Umweltbakterien auf humane Krankheitserreger in den Kläranlagen oder später in der aquatischen Umwelt (LENART-BOROŃ et al., 2020).

Eine Forschungsarbeit aus Polen befasste sich mit dem Vorhandensein von Pathogenen und Antibiotika an verschiedenen Stellen des Białka Flusses, welcher ein beliebtes Tourismusziel darstellt. Es wurden jeweils drei Stellen beprobt, zu diesen zählte der Tatra-Nationalpark, eine Abwasserableitungsstelle der örtlichen Kläranlage, sowie eine Stelle etwa 3 km flussabwärts von der Kläranlage entfernt. Bei der Auszählung der Indikatorbakterien zeigte sich im Tatra-Nationalpark eine sehr gute Wasserqualität. Diese entsprach den Anforderungen für Oberflächengewässer. Die Probenstelle an der Abwasserableitung wies hingegen eine signifikante Kontamination mit *E. coli* auf und zeigte dadurch eine schlechte Wasserqualität. Als Maximalwert an dieser Stelle konnten 2 Millionen koloniebildende Einheiten an *E. coli* pro 100 ml festgestellt werden. Diese hohe Dichte an *E. coli* spiegelte sich auch an der Stelle flussabwärts wider. Hier variierte die Wasserqualität im Laufe der Zeit zwischen gut, befriedigend und unbefriedigend. Als Ursache für die Verbreitung von Fäkalerregern aus der Kläranlage, vermutete man die steigende Population an Touristen und in weiterer Folge eine Überlastung der Anlage (LENART-BOROŃ et al., 2020).

Ebenfalls bedeutsam für die Einbringung von Bakterien und deren Antibiotikaresistenzen in Gewässern stellt die Landwirtschaft dar. Große Mengen an Antibiotika werden täglich in der Viehwirtschaft eingesetzt, vor allem in der Intensivtierhaltung (THANNER et al., 2016). Die Ausscheidungen der Produktionstiere werden oftmals als Gülle für die landwirtschaftliche Nutzung herangezogen. Diese stellt einen Hotspot für antibiotikaresistente Bakterien dar (THANNER et al., 2016). So agieren Nutztiere nicht nur als Vehikel der Antibiotikaresistenzen, sondern auch als Endpunkte in der Weitergabe und Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien und deren Resistenzgenen (THANNER et al., 2016). Landwirtschaftlicher Boden stellt hierbei ein natürliches Reservoir für antibiotikaresistente Bakterien dar, welche durch die Einbringung von antimikrobiellen Substanzen oder aber Metallen, Desinfektionsmittel oder Bioziden unter einem Selektionsdruck stehen können. Dadurch kann es in weiterer Folge zu einem horizontalen Gentransfer kommen (THANNER et al., 2016).

Mit der Frage welchen Einfluss die Anwendung von Gülle in der Landwirtschaft hat, beschäftigte sich eine zweiteilige Studie um den Black Hawk Lake in Iowa. Ergebnisse der ersten Studie, welche die Unterschiede zwischen gedüngten und nicht gedüngten Ackerflächen verglich, konnten zeigen, dass die fäkalen Indikatorbakterien *E. coli* und Enterokokken in den Proben der Wasserauslässe der gedüngten Äcker deutlich höher waren, als in den Proben der ungedüngten Flächen. Das Abflusswasser der nicht gedüngten Äcker wies ebenso signifikant weniger Antibiotikaresistenz-Indikatoren auf, als die gedüngten (NEHER et al., 2020b). Der zweite Teil der Studie beschäftigte sich mit den Auswirkungen der Saisonalität auf das Vorhandensein von Indikatorbakterien und deren Resistenzen. Gülle wird hauptsächlich im Frühling und im Herbst nach der Ernte auf die Felder aufgebracht. Die Konzentrationen an *E. coli* und Enterokokken waren in der Wachstumsphase und nach der Ernte deutlich höher als vor der Bepflanzung. Die Autoren vermuten, dass ein höheres Bakterienaufkommen in den Sommermonaten, vermutlich durch eine höhere Wildtieraktivität auf den Ackerflächen und der für das Bakterienwachstum optimalen Temperaturverhältnissen bedingt ist (NEHER et al., 2020a). Die untersuchten Antibiotikaresistenz-Gene waren vor allem in der Phase vor der Bepflanzung und nach der Ernte erhöht, was sich auf die Gülleausbringung zu diesen Jahreszeiten zurückführen lässt. Durch das erhöhte Aufkommen an antibiotikaresistenten Bakterien während der Sommermonate besteht die Gefahr der Verschleppung dieser in Freizeitgewässer, welche vor allem im Sommer von Menschen zahlreich genutzt werden (NEHER et al., 2020a).

Darüber hinaus spielen Umwelteinflüsse eine bedeutende Rolle bei der Eintragung von Erregern in Gewässer. Bei besonders starkem Regen und Stürmen kann es zu einem verstärkten Einfließen von tierischen oder menschlichen Fäkalien in Oberflächengewässer kommen (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003). Durch eine Überlastung der Kläranlagen kann es bei starkem Regen zu undichten Stellen im Filter des Abwassertransportes oder zum Überlaufen der Anlage kommen und dies kann zur Verbreitung von humanpathogenen Erregern führen (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003). Regenfall bzw. die Niederschlagsmenge wird in mm angegeben. Bei Niederschlägen, ab einer Höhe von 25 mm kann die Wasserqualität an Badestränden leiden (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003). Bei Niederschlägen von unter 2,5 mm wurde in dieser Studie kein Einfluss auf den Gehalt von Indikatorbakterien in Badegewässern festgestellt (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003). Die höchste bakterielle Konzentration war nach großen Niederschlagsmengen am darauffolgenden Tag nachweisbar. Bei kleineren Stürmen vernahm man die größte Dichte an Erregern am zweiten Tag nach dem Regenfall, vermutlich bedingt durch die niedrigere Fließgeschwindigkeit bei geringerer Wassermenge (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003). Die Wasserqualität stellte sich innerhalb von fünf Tagen wieder ein. Dies lässt darauf schließen, dass Schwimmen in natürlichen Gewässern, vor allem für Personen mit geschwächtem Immunsystem in den Tagen nach starken Regenfällen, wegen einer erhöhten Infektionsgefahr vermieden werden sollte (ACKERMAN u. WEISBERG, 2003).

Die Art und Weise der Landschaftsnutzung im Nahbereich von Gewässern kann ebenfalls bedeutenden Einfluss auf die jeweilige Wasserqualität einnehmen. Bei einer Forschung in Florida wurden angelegte Seen in drei verschiedenen Kategorien der Landschaftsnutzung in Hinblick auf ihre Wasserqualität verglichen. Hierbei handelte es sich zum einen um unbenutzte Flächen, deren Seen hauptsächlich zur menschlichen Erholung (z.B. zum Fischen) dienten und das natürliche Habitat von Wildtieren darstellten. Die nächste Kategorie beinhaltete Seen in der Nähe von Landschaftsflächen, welche als Rinderweiden genutzt wurden. Bei der dritten Kategorie handelte es sich um Seen in städtischer Umgebung. Bei der Untersuchung von fäkalen Indikatorbakterien konnten im Wasser keine merklichen Unterschiede zwischen den differenten Landschaftsnutzungen festgestellt werden. Gegensätzlich verhielt es sich bei den Sedimentproben. Außerdem war die bakterielle Konzentration im Sediment bedeutend größer, als im Wasser selbst. Die Sedimente wiesen vor allem in städtischer Nähe höhere Keimbelastungen auf (STALEY et al., 2013). Die vorliegenden Ergebnisse lassen wiederum darauf schließen, dass das Sediment ein längerfristiges Reservoir für Erreger darstellt, als das

Wasser selbst (STALEY et al., 2013). Als Marker zur Bestimmung der Herkunft der fäkalen Verschmutzung wurden in dieser Studie Bakterien der Ordnung der *Bacteroidales* herangezogen, welche man im Darmtrakt nahezu aller warmblütigen Säugetiere findet. Während man keine humanspezifischen *Bacteroidales* in dieser Studie finden konnte, zeigten vor allem Seen mit Nähe zu Rinderweiden eine hohe Anzahl an rinderspezifischen *Bacteroidales* an. Die höchsten Überschreitungen fanden sich an jenen Stellen, an welchen Rinder direkten Seezugang hatten. Fäkale Coliforme und Enterokokken waren in den Arealen niedriger, für welche die Rinder den geringsten Seezugang hatten (STALEY et al., 2013). Die Autoren folgerten daraus, dass vor allem durch Rinderhaltung beeinträchtigte Seen eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen können (STALEY et al., 2013).

Kuhweiden sind durch die Nutzung oftmals spärlich bewachsen. Rinderausscheidungen werden somit leichter in umliegende Gewässer gespült, vor allem bei Niederschlagsereignissen wie Regen. Die Beweidung von Rindern in der Nähe von Flüssen führt zu einem Anstieg an fäkalen Coliformen im Wasser (LINE, 2003). Das Forschungsziel einer Studie aus North Carolina war die Feststellung der Veränderung der Wasserqualität der Long Creek Wasserscheide durch die Verhinderung des direkten Wasserzuganges von Rindern. Dazu wurden entlang der Wasserscheide Zäune aufgestellt und eine alternative Wasserversorgung eingerichtet. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Abfall der Konzentrationen an Enterokokken und fäkalen Coliformen in den Wasserproben (LINE, 2003). Neben fäkalen Indikatorbakterien konnte man auch vermehrt *Campylobacter spp.* in Freizeitgewässern in der Nähe von Rinderstallungen auffinden. Bei einer Beprobung von Seen in Quebec war hauptsächlich *C. jejuni* im Badewasser nachzuweisen. Die Wahrscheinlichkeit *C. jejuni* aus Badegewässern zu isolieren, war im Spätsommer am folgenden Tag nach einem Regenfall und in Gewässern, welche im 5 km Umkreis von Rinderstallungen lagen, besonders hoch (GUY et al., 2018).

Neben Rindern spielen jedoch auch Vögel eine bedeutende Rolle bei der Verbreitung von *Campylobacter spp.* in menschlicher Umgebung. Viele Vögel können mit *Campylobacter spp.* infiziert sein und geben diese kontinuierlich mit ihrem Kot in ihre Umwelt ab (WHELAN et al., 1988). Bei einer Untersuchung von 942 Silbermöwen in Schottland schieden 64 % *Campylobacter spp.* aus. Bei 55 % davon handelte es sich um *C. lariidis*, die restlichen 45 % stellten *C. jejuni* und *C. coli* dar. Eine hohe Anzahl an mit *Campylobacter spp.* infizierten Möwen fand man in der Nähe von Müllhalden in Gebieten mit einer hohen Bevölkerungsdichte. Dies kann durch die Aufnahme von kontaminiertem Müll der Vögel oder durch die

Verschmutzung der Rastplätze der Möwen durch Abwasser erklärt werden. Eine Korrelation der isolierten *Campylobacter*-Sequenzen aus Möwen, mit jenen in Menschen gefundenen, zeigte sich nicht. Die Autoren spekulieren, dass dies vor allem durch die unterschiedliche Überlebensdauer in der Umwelt und im Verdauungstrakt der Vögel bedingt sei (WHELAN et al., 1988). Es besteht daher die Annahme, dass Vögel eher keine Gefahr für die direkte Übertragung von *Campylobacter* auf den Menschen darstellen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sie aufgrund ihres Aufhaltens in der Nähe von Abwässern und dem Fressen von Abfällen als Indikatoren für das Ausmaß der Kontamination der Umwelt durch menschliche Abfallprodukte angesehen werden können (WHELAN et al., 1988).

Trotz schlechter Überlebensfähigkeit von *Campylobacter spp.* außerhalb seines Wirtes, konnten sich spezielle Stämme entwickeln, die sich an die Bedingungen in verschiedensten Umweltnischen angepasst haben (MULDER et al., 2020). So gelingt es diesen Bakterien auch ohne Wirt in lebensfähigem, jedoch nicht kultivierbarem Zustand zu überleben (MULDER et al., 2020). Dadurch stellt die aquatische Umwelt vielmehr ein Vehikel der Übertragung von *Campylobacter* zwischen Tieren, von Tieren auf Menschen, sowie umgekehrt dar. Studien zufolge konnte nachgewiesen werden, dass vor allem *C. coli* aus Oberflächengewässern isoliert werden kann (MULDER et al., 2020). Die höchsten Konzentrationen finden sich in landwirtschaftlich beeinflusstem Wasser, die niedrigsten hingegen in Badegewässern. Des Weiteren zeigten sich saisonale Unterschiede. So waren die Konzentrationen in den Wintermonaten deutlich höher, als in den Sommermonaten, was sich vermutlich auf die stärkere UV-Strahlung und damit die Inaktivierung der Bakterien in diesen Monaten zurückführen lässt (MULDER et al., 2020). Die größte Bedeutung in der Verbreitung von *Campylobacter* in Oberflächengewässern wird den Wildvögeln zugesprochen, gefolgt von Mastgeflügel und Wiederkäuern (MULDER et al., 2020).

Bei dem Vergleich von gesundheitlichen Auswirkungen einer Wasserverschmutzung durch Fäkalien verschiedener Herkunft wurde festgestellt, dass sich das Erkrankungsrisiko für den Menschen, sowohl beim Schwimmen in mit menschlichem Abwasser, als auch mit frischem Rinderkot verschmutztem Gewässer, nicht wesentlich unterscheidet. Das Risiko, an einer Erkrankung des Gastrointestinaltraktes nach dem Schwimmen in Gewässern, die durch den Kot von Möwen, Hühnern oder Schweinen kontaminiert sind, ist jedoch niedriger anzusehen, als in Gewässern, die mit menschlichen Fäkalien verschmutzt sind (SOLLER et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen wiederum darauf schließen, dass vor allem Wiederkäuer eine sehr bedeutende Rolle in der Verbreitung von zoonotischen Erregern in die aquatische Umwelt

spielen. Besonders auch, da ihre Ausscheidungen gelegentlich humanpathogene Erreger, wie beispielsweise *E. coli* O157:H7 oder andere Shigatoxin-bildende *E. coli* beinhalten können (SOLLER et al., 2010). Diese Erreger sind von großer Bedeutung in der Humanmedizin, da sie nicht nur Symptome im Magen-Darm-Trakt auslösen können, sondern auch schwerwiegendere Erkrankungen (SOLLER et al., 2010).

2.4 Bakteriophagen

Unter Bakteriophagen, welche abgekürzt als Phagen bezeichnet werden, versteht man Viren, die Bakterien befallen und infizieren. Die Entdeckung der Bakteriophagen lässt sich auf die Forschungsarbeiten von Twort und d'Herelle zurückführen (ABEDON, 2012). Bereits 1917 beschrieb d'Herelle seine neuartigen Entdeckungen und bezeichnete sie damals noch als unsichtbare antagonistische Mikroben. Er schaffte es, aus dem Kot und Urin von Patienten, welche gerade von der bazillären Dysenterie genesen waren, unsichtbare Mikroben zu isolieren. Diese Mikroben wiesen antagonistische Effekte gegenüber dem Bakterium Shiga-Bazillus auf. Seine Versuche lieferten sichtbare Beweise für das Vorhandensein der mit freiem Auge oder unter dem Lichtmikroskop unsichtbaren Phagen. In seinen Versuchen fügte er zunächst eine Verdünnung einer zuvor lysierten Kultur zu einer Shiga-Kultur hinzu. Diese Kultur wurde auf einen Agar aufgebracht und inkubiert. Nach der Inkubation zeigte sich eine Schicht an Bazillen auf dem Agar, auf welcher man regelmäßige Kreise mit einem Durchmesser von etwa einem mm erkennen konnte, an denen die Kultur nicht mehr sichtbar war (D'HERELLE, 2007).

Bakteriophagen können sich in ihrer Form und Größe sehr unterschiedlich darstellen, jedoch beinhalten sie alle Nukleinsäure und Proteine. Die Nukleinsäure wird dabei umgeben vom Kopf der Phagen, welcher auch als Kapsid bezeichnet wird und sich ebenfalls unterschiedlich groß darstellen kann. Er dient als Schutz der Nukleinsäure und setzt sich aus einem oder mehreren verschiedenen Proteinen zusammen. Die Nukleinsäure kann dabei sowohl als RNA oder auch DNA auftreten, jedoch nicht als beides gleichzeitig. Einige der Phagen besitzen Schwänze, welche an ihrem Kopf angebracht sind, diese dienen der Passage der Nukleinsäure bei der Infektion von Bakterien. Einige komplexere Phagen besitzen zusätzliche Hilfsmittel, wie eine kontraktile Hülle um den Schwanz oder eine Grundplatte am Ende des Schwanzes, welche zur Bindung der Bakteriophagen an die Bakterien dient. Die Infektion der Wirtszelle läuft jeweils in vier Schritten ab. Zunächst erfolgt die Adsorption der Phagen an die Bakterien. Dabei haften die Schwanzfasern an spezifischen Rezeptoren auf der Bakterienzelle. Die Wirtsspezifität der Bakteriophagen wird von der Art der jeweiligen Schwanzfasern bestimmt. Der nächste Schritt ist die irreversible Anhaftung der Phagen an die Bakterien mit Hilfe der Grundplatte oder anderen Mechanismen. Anschließend erfolgt die Hüllenkontraktion und der Phagenschwanz wird durch die Bakterienhülle gestoßen. Den letzten Schritt stellt die Injektion der Nukleinsäure in die Bakterienzelle dar (MAHARAJAN, 2013).

Während man von Bakterien weiß, dass sie in nahezu allen Nischen der Umwelt präsent sind, ist die Verteilung von Bakteriophagen noch nicht vollständig erforscht. Man nimmt jedoch an, dass sie ähnlich weit verbreitet sind, wie Bakterien. Zu finden sind sie in einer Vielzahl an Umgebungen, beispielsweise im Meer oder Süßwasser, in Böden, in der Wüste, aber auch in Polarregionen. Ebenso werden sie durch Aerosole, Tiervektoren oder Wasserströmungen in der Umwelt verteilt. Phagen sind für ihre Reproduktion vollständig abhängig von ihren bakteriellen Wirten, deshalb nimmt man an, sie auch in der Nähe ihrer spezifischen Bakterien zu finden. Es gibt jedoch Hinweise dazu, dass Phagen weiter verbreitet sind, als ihre Wirte. Phagen, die in der Lage sind, mehrere bakterielle Genotypen oder Spezies infizieren zu können, haben einen Überlebensvorteil. Daher wird davon ausgegangen, dass Phagen mehrere verschiedene anfällige Wirte besitzen können. Ein Indiz, das unterstützt wird durch die Tatsache, dass Bakterien oft mit verschiedenen Typen an Phagen infiziert werden können (DÍAZ-MUNOZ u. KOSKELLA, 2014).

Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika stellt ein natürliches Phänomen dar. Zusätzlich hat der vielseitige Einsatz von antibiotischen Arzneimittel an der Entwicklung der heutigen Resistenzlage beigetragen. Es gibt viele natürliche Wege wie aus anfälligen Bakterien resistente werden können, z.B. dem horizontalen Gentransfer. Dieser kann durch verschiedene Prozessen, wie der Konjugation, Transformation oder Transduktion, zustandekommen. Die Transduktion stellt den genetischen Austausch durch Bakteriophagen dar. Die Phagen dienen hierbei als Vektoren für den genetischen Austausch über eine generalisierte oder spezialisierte Transduktion, wobei ein genetisches Merkmal durch Phagenpartikel von einer Spenderbakterienzelle auf eine Empfängerbakterienzelle übertragen wird. Somit spielen Phagen in der Evolution der Bakterien und der Antibiotikaresistenzen eine bedeutende Rolle und sind dazu befähigt genetisches Material zwischen Bakterien auszutauschen. Die genauen Abläufe und Konditionen der Transduktion in der Umwelt sind noch nicht vollständig erforscht (BALCAZAR, 2014).

Der Einsatz von Bakteriophagen zur Therapie gegen bakterielle Infektionen gewinnt durch die steigende Antibiotikaresistenzlage weltweit immer mehr an Bedeutung. Die Idee dahinter begann bereits im Jahr 1919 in Paris, als es d'Herelle gelang, vier an der bakteriellen Dysenterie erkrankte Kinder mit Hilfe von Bakteriophagen zu heilen (LIN et al., 2017). Grundsätzlich unterscheidet man bei Bakteriophagen zwischen lytischen oder auch virulenten und lysogenen oder auch temperenten Phagen. Lytische Phagen binden an Rezeptoren an der Bakterienoberfläche und injizieren genomische Information in das Innere der Bakterien. Im

Zytosol des Bakteriums erfolgt anschließend die virale Replikation. Ist diese abgeschlossen entweichen die neuen Phagenpartikel aus dem Zytoplasma durch die Lyse des Bakteriums. Dieser Prozess wird wiederum von den neu gebildeten Phagenpartikeln wiederholt. Dies weist einen Vorteil in der Behandlung gegen bakterielle Infektionen gegenüber Antibiotika auf, welche keine selbstverstärkenden Eigenschaften aufweisen. Lysogene Phagen hingegen integrieren sich in das Wirtsgenom und werden während der Zellteilung des Bakteriums an die Tochterzelle vererbt. Zu einem späteren Zeitpunkt kann sich der lysogene Phage aus dem bakteriellen Genom herausschneiden und tritt in einen lytischen Infektionszyklus ein. Lytische Phagen ähneln in ihrer Wirkung eher antibiotischen Medikamenten, somit stellen sie die wichtigere Proportion der Phagen, die als Therapeutikum verwendet werden können, dar (KORTRIGHT et al., 2019).

Den Nachweis des Erfolgs des Einsatzes von Bakteriophagen gegen bakterielle Infektionen wurde und wird vor allem in zahlreichen Tierversuchen dargestellt. Die besten Resultate einer Phagentherapie konnten bei der gleichzeitigen Applikation der Phagen parallel zur Infektion mit Bakterien beobachtet werden. Ein solches Szenario lässt sich in der Klinik jedoch realistisch nicht umsetzen. Mehrere Studien an Mäusen oder anderen Tierarten, wie Insekten, stellten die Wirksamkeit der Phagentherapie dar. Es zeigte sich, dass diese vor allem abhängig vom Applikationszeitpunkt, dem Applikationsort und der verabreichten Dosis ist. Bei den weniger vorhandenen klinischen Studien über die Wirksamkeit von Phagen im Einsatz bei bakteriellen Infektionen beim Menschen, findet man widersprüchliche und sehr differente Ergebnisse (KORTRIGHT et al., 2019). Die Effizienz einer Phagentherapie ist nur dann gegeben, wenn genügend Phagen zu den Bakterien gelangen und diese töten können. In der Humanmedizin wurden hauptsächlich die Routen der topischen, intravenösen und oralen Applikation erforscht. Die topische Anwendung von Phagen zeigte vor allem bei Ulzera an den Füßen von Diabetikern positive Wirkungen. Ebenso konnte die Inhalation von Phagenlösungen bei Lungeninfektionen sowohl im Tiermodell, als auch bei der Anwendung am Menschen heilende Effekte aufzeigen. Die intravenöse Applikation von Bakteriophagen spielt vor allem bei einer Bakteriämie oder anderen weitläufigen Infektionen eine Rolle. Die Gefahr dieser Applikationsart stellt jedoch die Freisetzung großer Mengen an Endotoxinen, durch die Lyse von Bakterien, direkt in die Blutbahn dar. Dieser Prozess bedingt in weiterer Folge die Opportunität einer starken Immunreaktion und einer Anaphylaxe des Patienten. Diese Art der Anwendung eröffnet einen weiteren Kritikpunkt, nämlich die Entfernung der Phagen aus dem Blut. Studien konnten nachweisen, dass Phagen nicht nur im Blut verdünnt

werden, sondern auch durch Antikörper gegen sie neutralisiert werden können, wodurch ihre Wirkung schwindet. Die orale Applikationsart hat zur Folge, dass sie mit einer Passage durch den Gastrointestinaltrakt verbunden ist. Somit stellt sich die Frage, ob Phagen diese Passage, durch das vorherrschende saure Milieu, überleben können. Ebenso können hier wiederum Endotoxine im Darmtrakt aufgenommen werden und in weiterer Folge wieder in die Blutbahn gelangen (BRIX et al., 2020). Anders als einige Antibiotika sind Phagen als Therapie für intrazelluläre Erreger ungeeignet, da sie keinen zuverlässigen Mechanismus für den Eintritt in eukariotische Zellen aufweisen. Realistisch gesehen, werden Bakteriophagen somit Antibiotika niemals vollständig ersetzen können. Es werden jedoch zahlreiche Vorteile in der gemeinsamen Nutzung von Bakteriophagen zusammen mit Antibiotika vermutet. Eine Methode der Erweiterung der Spannbreite der Wirte der Phagen stellt das Zusammenstellen eines so genannten Phagencocktails dar, welcher eine Kombination aus mehreren Phagen beinhaltet (KORTRIGHT et al., 2019).

Phagen werden auch in der Tierhaltung eingesetzt. Infektionen mit *Campylobacter* zählen zu den häufigsten durch Lebensmittel hervorgerufenen Magen-Darm-Erkrankungen beim Menschen weltweit. Hauptrisikofaktor für eine Infektion mit *Campylobacter* stellt dabei die Aufnahme von kontaminiertem Geflügelfleisch dar. *Campylobacter* spp., besonders *C. jejuni* und in geringeren Anteilen auch *C. coli* finden sich im Darmtrakt von Masthühnern. Während der Schlachtung oder der Verarbeitung kann es zu einer Kontamination der Schlachtkörper kommen. Durch den Einsatz von Bakteriophagen, sowohl in lebenden Herden, als auch an verarbeiteten Produkten, wurde eine Reduktion der *Campylobacter*-Zahlen auf dem gewonnenen Geflügelfleisch aufgezeigt. Hierbei ist vor allem die Auswahl der optimalen Phagen aus einem Pool, die auf die jeweilige *Campylobacter*-Spezies spezialisiert ist, der Schlüssel zu einer erfolgreichen Entwicklung. Studien wiesen nach, dass meist zwei bis vier Phagen in einem Cocktail die besten Ergebnisse erzielten (CHINIVASAGAM et al., 2020).

Eine bedeutende Rolle wird den Bakteriophagen auch in Hygienekontrollen in der Lebensmittelindustrie zugeschrieben. Krankheitserreger, wie *E. coli*, Salmonellen, *Campylobacter* oder *Listeria monocytogenes* können durch kontaminierte Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden und verursachen dadurch weltweit sehr hohe Kosten, sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Gesundheitsversorgung. Als Nachweis dieser Erreger in Lebensmitteln stellen immer noch kulturbasierte Verfahren den Goldstandard dar. Diese Verfahren erwiesen sich am sensitivsten und haben des Weiteren den Vorteil, dass die Kolonien zusätzlichen Tests unterzogen werden können und nach ihrem Ursprung

geforscht werden kann. Nachteilig wirkt sich sowohl die Zeit-, als auch die Arbeitsintensität aus. Hierbei haben Bakteriophagen, die ebenfalls als Nachweis dieser Erreger dienen können, den wesentlichen Vorteil, dass der komplette Infektionszyklus lediglich zwischen einer und zwei Stunden andauert. Ebenso können aufgrund der viralen Replikation in der Wirtszelle langwierige Voranreicherungsprozesse verkürzt werden oder sogar entfallen (SCHMELCHER u. LOESSNER, 2014).

Neben den bereits genannten Gebieten werden Bakteriophagen auch als Indikatoren zur Bestimmung der Wasserqualität herangezogen. Von besonderer Bedeutung sind hier die Coliphagen, darunter versteht man Phagen, welche coliforme Bakterien infizieren. Man nimmt an, dass sie aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen und dem Überleben in der aquatischen Umwelt den menschlichen Viren mehr ähneln, als die standardgemäß genutzten fäkalen Indikatorbakterien. Grundsätzlich unterscheidet man bei den Coliphagen zwischen den somatischen Coliphagen und den F-RNA-Phagen. Vorteile in der Nutzung von Coliphagen zur Bestimmung von fäkalen Wasserverschmutzung sind die einfache, schnelle und kostengünstige Anwendung. Der Nachweis erfolgt dabei durch sogenannte Phagen-Plaques-Assays. Somatische Coliphagen übertreffen die Anzahl an F-RNA-Phagen und der menschlichen Viren in Abwasser und Rohwasser und werden dadurch zur Beurteilung des Verhaltens möglicherweise enthaltener enteraler Viren in aquatischen Umgebungen, wie Salz- oder Süßwasser, Trinkwasser und Abwasser, herangezogen. Die Studien zum Einsatz von Phagen als Indikator differieren. Auf der einen Seite, seien somatische Coliphagen in Abwässern und anderen durch Fäkalien kontaminierten Gewässern gleichzusetzen mit der Anzahl an enteralen Viren. Auf der anderen werden sie als ungeeignete Parameter angesehen, da autochtone Coliphagen auch in unkontaminierten Gewässern vorkommen können. F-RNA-Phagen können unterteilt werden in vier Serogruppen, wobei die Serogruppen 2 und 3 hauptsächlich in menschlichem Abwasser und die Serogruppen 1 und 4 hauptsächlich in tierischen Abfällen gefunden werden können. Nach ihrer Detektion besteht die Möglichkeit der Charakterisierung des menschlichen oder tierischen Ursprunges (LIN u. GANESH, 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

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

3.1.2 Geräte und sonstige Materialien

- 500 ml sterile Weithalsflaschen (Aqua-Laborservice)
- Kühlakkus
- Kühltasche, Kühlbox
- Autoklaven
- Automatische Pipettierhilfe (Greiner Bio-One)
- Bunsenbrenner
- Deckelketten (Greiner Bio-One; 373270)
- Drigalskispatel
- Erlenmeyerkolben 250 ml
- Gefriertruhe
- Gelelektrophoresekammer: MultiSUB Maxi (Cleaver; MSMAXI20)
- Glasflaschen
- Glaspipetten
- Glasröhrchen
- Heatblock (Henry Troemner; 460-3201)
- Inkubatoren
- Kühlschrank

- Sterile Einmal – Pipetten (Greiner BioOne)
 - 100-1000µl (686290)
 - 10-100µl (772288)
 - 0,5-10µl (765288)
- Magnetrührer (IKA KMO 2 electronic; Janke & Kunkel)
- Metallbehälter
- Mikroskop
- Mikrowelle (Clatronic; MW 749)
- Ösen
- PCR-Streifen (Greiner BioOne; 673210)
- pH-Messgerät FE20 FiveEasy (Mettler Toledo; 51302916)
- Pipetten:
 - Eppendorf Research Plus Pipette 10µl (Eppendorf; 3120 000.020)
 - Eppendorf Research Plus Pipette 100µl (Eppendorf; 3120 000.046)
 - Eppendorf Research Plus Pipette 1000µl (Eppendorf; 3120 000.062)
- Pipettenspitzen (Greiner Bio-One)
 - 100-1000 µl (686290)
 - 10-200 µl (685290)
 - 0,5-10 µl (765290)
- Pipettierhelfer für Glas- und Kunststoffpipetten von 1 bis 100 ml Powerpette Plus (VWR; 613-4442P)
- Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One)
 - 1,5ml (616201)
 - 2ml (623201)
- Spritzen (Braun)
 - 2ml (4606027V)

- Spritzenvorsatzfilter 0,2µm (VWR International; 514-0073)
- sterile Petrischale (LabXperts; STM 101VR20)
- Sterile Wattestäbchen (Heinz Herenz; 1030419)
- Thermoschüttler (Eppendorf; New Brunswick™ Innova 40/40R Incubator Shaker 40)
- Thermocycler (Eppendorf; nexus GX2)
- UV Transilluminator (MWG BIOTECH; TFX-20M)
- Vortexer (IKA MS2 Minishaker)
- Zentrifugenröhrchen 50ml (Greiner Bio-One; 210261)
- Zentrifuge (Eppendorf; 5417C)
- Zentrifuge (Sigma; 3K30)

3.1.3 Bakterien

- *E.coli* DSM12242
- *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14028s
- *Campylobacter jejuni* 81-176

3.1.4 Chemikalien und Primer

- AccuStart II Gel Track PCR Super Mix (2X) (Quanta Bio-Science; 95136-500)
- Agarose (VWR International; 732-2789) peqGOLD Universal Agarose
- Antibiotika-Testblättchen (Oxoid; CT0004B, CT0013B, CT0025B, CT0031B, CT0048B, CT0059B, CT0054B, CT0076B)
- Calciumchlorid (Sigma-Aldrich; C3881)
- DNA/RNA-Farbstoff peqGREEN (VWR International; 732-2960)
- DNA-Leiter, 1 kb (peqGOLD; 25-2030)
- EDTA (Merck; 1.08418.0250)

- Essigsäure (Carl Roth; 3738.5)
- Loading buffer (6x) (peqGOLD; 25-2021)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Merck; 5833.0250)
- Magnesiumsulfat (VWR; 1.058.861.000)
- Natriumchlorid (Merck; 1.06404.0500)
- Nuclease-Free Water (Carl Roth; T143.4)
- Polyethylenglycol (VWR; J19972.A1)
- Primer (Microsynth) (MAYRHOFER et al., 2004)
 - stxI forward 5'-GTG GTT GCG AAG GAA TTT ACC-3'
 - stxI reverse 5'-ACT GAT CCC TGC AAC ACG CTG-3'
 - stxII forward 5'-ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G-3'
 - stxII reverse 5'-GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C-3'
- SM Buffer (Prophagen-Induktionspuffer)
 - 100mM NaCl,
 - 10mM MgSO₄
 - 50mM TrisHCl (pH 7,5)
- PerfeCTa® SYBR® Green SuperMixes und FastMixes™ (VWR; 733-1381)
- TAE-Puffer (pH: 8,5)
 - 2 M Tris
 - 1 M Essigsäure
 - 0,05M EDTA
 - Bi-destilliertes Wasser

- Testreagenzien zum Screening:
 - Anti-Salmonella (A-67 + Vi), omnivalent (Sifin; TR 1105)
 - Anti-Salmonella Groupe B (Sifin; TR 1201)

3.1.5 Nährmedien

- Bakteriologischer Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; 10351303)
- Bolton Bouillon (Oxoid; CM0983B)
- Bi-destilliertes Wasser
- CampyGen (Oxoid; CN0025A)
- Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (Oxoid; CM0739)
- CCDA-Agar (Oxoid; CM0739)
- CCDA Selective Supplement (Oxoid; SR0155)
- Coli-ID-Agar (bioMerieux; 42017)
- Gepuffertes Peptonwasser (Oxoid; CM0509B)
- GKZ-Agar (Merck; 1.05463.0500)
- LB-Agar (Thermo Scientific™ Oxoid™; Agar Bacteriological; 10351303)
- LB Broth (Thermo Scientific Oxoid; Luria Bertani Broth (Miller)-Oxoid; CM0996B)
- MSRV-Agar (Oxoid; CM0910)
- Mueller Hinton Broth (Oxoid; CM0405)
- NZCYM-Agar (VWR Life Science; J865-500G)
- NZCYM Broth (VWR; J865-500G)
- PI-Buffer (Prophage Induction Buffer):
 - 10mM CaCl₂
 - 10mM MgCl₂

- 2mM H₂O₂
 - Mueller Hinton Broth (Oxoid; CM0405) 21g in 1 Liter Bidestillierten Wasser
- Plate Count Agar (Merck; 1054630500)
- ssLB-Agar (Semi-solid LB Agar 0.8% Agar)
- XLD-Agar (Oxoid; CM0469)

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme

Die Probenziehung fand im August 2020 statt. Es wurden jeweils fünf Seen in der Steiermark (Altausseer See, Grundlsee, Öedensee, Teichalmsee und Toplitzsee) sowie fünf Seen in Kärnten (Faaker See, Millstätter See, Ossiacher See, Weissensee und Wörthersee) beprobt. An jedem See wurden fünf bzw. vier (Weissensee) unterschiedliche Entnahmestellen für die Wasseruntersuchung ausgewählt. Insgesamt wurden an 49 verschiedenen Stellen jeweils 500 ml Seewasser zuzüglich 0,5-3 g Sediment ufernahe etwa 30 cm unterhalb der Oberfläche mit sterilen Weithalsflaschen entnommen. Bei den ausgewählten Entnahmestellen handelte es sich vorwiegend um Seebäder, aber auch um öffentlich zugängliche Seebereiche (siehe Abb. 2 bis 11). Die Proben wurden unter ständiger Kühlung in das Labor des Institutes für Lebensmittelsicherheit, Abteilung für Hygiene und Technologie, an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien zur weiteren Analyse transportiert. Im Zeitraum vom 17.08.2020 bis zum 20.11.2020 erfolgten die Laboruntersuchungen.



Abbildung 2: Probenentnahmestelle Faaker See



Abbildung 3: Probenentnahmestelle Millstätter See



Abbildung 4: Probenentnahmestelle Ossiacher See



Abbildung 5: Probenentnahmestelle Weissensee



Abbildung 6: Probenentnahmestelle Wörthersee



Abbildung 7: Probenentnahmestelle Altausseer See



Abbildung 8: Probenentnahmestelle Grundlsee



Abbildung 9: Probenentnahmestelle Oedensee



Abbildung 10: Probenentnahmestelle Teichalmsee



Abbildung 11: Probenentnahmestelle Toplitzsee

3.2.2 Herstellung der Medien

3.2.2.1 LB-Agarplatten

Zur Herstellung der LB-Agarplatten wurden 7,5 g Agar und 12,5 g LB Broth in 500 ml Wasser eingewogen. Die Suspension wurde dann in einer Glasflasche mittels eines Magnetrührers homogenisiert. Die Suspension wurde autoklaviert und anschließend wurden jeweils 20 ml dieses LB-Agars in sterile Petrischalen gegossen. Zur Verfestigung des Agars wurden die Petrischalen geschwenkt und stehengelassen.

3.2.2.2 CCDA-Agarplatten

Zur Herstellung der CCDA-Platten wurde jeweils 22,75 g *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base eingewogen, mit 500 ml bi-distilliertem Wasser vermengt und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen der CCDA-Lösung auf 50 °C wurde das CCDA Selective Supplement beigefügt. Die Lösung mit dem Supplement wurde anschließend in sterile

Petrischalen gegossen und geschwenkt. Für die spätere Verwendung wurden die Petrischalen stehengelassen, damit sich der Agar verfestigen konnte.

3.2.2.3 Mueller-Hinton (MH)-Agarplatten

Zur Herstellung der Mueller-Hinton-Agarplatten wurden 26,6 g MH-Agar eingewogen und mit 700 ml bi-destilliertem Wasser vermengt. Diese Suspension wurde dann mittels eines Magnetrührers durchmischt und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde der flüssige Agar in sterile Petrischalen gegossen und bis zur weiteren Verwendung zum Auskühlen stehengelassen.

3.2.2.4 LB Broth

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 12,5 g LB Broth in 500 ml bi-destilliertem Wasser gelöst. Hierfür wurde wie auch bei den Agarplatten ein Magnetrührer verwendet. Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 10 ml des Mediums in sterile Glasröhrchen mit einer sterilen 10 ml Glaspipette aliquotiert. Nach Verschließen der Röhrchen erfolgte die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung in Metallbehältern unter Kühlung (3 °C).

3.2.2.5 MH Broth

Als Verdünnungsmedium für *Campylobacter spp.* fungierte MH Broth. Für die Herstellung von 500 ml dieses Verdünnungsmediums wurden 10,5 g MH Broth mit 500 ml bi-destilliertem Wasser vermengt und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden wie bei dem LB-Medium je 10 ml in sterile Glasröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung gekühlt (3 °C) aufbewahrt.

3.2.2.6 semisolider Agar (ss-Agar)

Für den Bakteriophagen-Nachweis in *E. coli*- bzw. *Salmonella*-Stämmen agierte ein semisolider LB-Agar. Hierfür wurden 7,5 g LB Broth und 2,4 g bakteriologischer Agar eingewogen, in 300 ml bi-destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

3.2.2.7 ssNZCYM-Agar

Für den Bakteriophagen Nachweis in *Campylobacter jejuni* wurde ssNZCYM-Agar verwendet. Dazu wurde 6,9 g NZCYM Broth und 2,4 g bakteriologischem Agar in 300 ml bi-destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 4 ml des semisoliden Agars in sterile Glasröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur und eine Aufbewahrung im Kühlschrank bis auf weiteres.

3.2.2.8 Gesamtkeimzahlagar (GKZ)

Zur Anzucht von *E. coli* für die weiteren Untersuchungen wurden GKZ-Agarplatten herangezogen. Für die Herstellung dieser wurden 22,5 g Plate Count Agar eingewogen und mit einem Liter bi-destilliertem Wasser vermengt. Diese Suspension wurde danach homogenisiert und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde sie auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt und in sterile Petrischalen gegossen.

3.2.3 Anzüchten der Wirtsstämme für die Phagenisolation

Als Wirtsstamm für *E. coli* bzw. Salmonellen diente der Stamm *E. coli* DSM12242 bzw. *Salmonella* ATCC 14028s. Die Rezipienten-Stämme wurden zunächst auf LB-Agarplatten angezüchtet. Danach wurde von jedem Stamm jeweils eine bakterielle Kolonie in 10 ml LB Broth überführt, anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37 °C. Am darauffolgenden Tag wurden 10 µl der bakteriellen Übernachtskultur in 10 ml LB Broth gelöst und wiederum für zirka zwei Stunden bei 250 rpm und 37 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Einstellung der Dichte der bakteriellen Suspension erfolgte auf einen McFarland von 0,5 (10^8 CFU/ml). Für *Campylobacter* agierte *Campylobacter jejuni* 81-176 als Wirtsstamm. Dafür wurde eine bakterielle Kolonie auf vier CCDA-Platten mit Supplement ausgestrichen. Danach folgte eine 48-stündige Inkubation unter Einhaltung eines mikroaerophilen Milieus bei 42 °C. Anschließend erfolgte die Abschwemmung der Kolonien mit 2 ml MH Broth pro Platte. Die abgeschwemmten Kolonien wurden dann so weit mit MH Broth verdünnt bis die Dichte einen McFarland von 5 erreicht hatte.

3.2.4 Anreicherung und Anzucht der Bakterien

Für die Anreicherung der Bakterien wurde zunächst von jeder gezogenen Wasserstelle 50 ml bzw. 62 ml (Weissensee) Seewasser aus den sterilen Weithalsflaschen entnommen und zu einer gepoolten Sammelprobe in einen Erlenmeyerkolben für jeden See überführt. Demnach befanden sich in allen Erlenmeyerkolben 250 ml Seewasser. Für die Anreicherung von *E. coli* und Salmonellen wurde 27,8 ml 10 x gepuffertes Peptonwasser, für die Anreicherung von *Campylobacter spp.* 27,8 ml 10 x Bolton Bouillon zu den gepoolten Proben zugefügt. Die Inkubation der Sammelproben mit gepuffertem Peptonwasser erfolgte danach für 24 h bei 37

°C. Die Proben mit Bolton Bouillon (zum Nachweis von *Campylobacter* spp.) wurden für 48 h bei 42 °C unter mikroaerophilem Milieu inkubiert. Von den mit gepufferten Peptonwasser inkubierten Proben wurden am nächsten Tag jeweils 100 µl mit sterilen Glaspipetten entnommen und auf Coli-ID- und XLD-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Für die Anzüchtung auf den MSRV-Agarplatten erfolgte die Entnahme von jeweils drei Tropfen zu je 100 µl aus der Voranreicherung und die Aufbringung auf drei gleichmäßig voneinander entfernten Stellen auf den MSRV-Agarplatten. Die Coli-ID- und MSRV-Agarplatten wurden anschließend bei 42 °C für 24 h bzw. 16-20 h, die XLD-Agarplatten bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die mit Bolton Bouillon versetzten Anreicherungen wurden nach 48 h Inkubationszeit auf CCDA-Agar aufgebracht. Dafür wurden von jeder Probe 100 µl abpipettiert und auf die CCDA-Agarplatten über einen Filter (0,45 µm; Durchlässigkeit für die kleinen beweglichen *Campylobacter* ist gegeben) aufgetropft. Die Entfernung der Filter erfolgte nach einer Stunde und die Platten wurden gemeinsam mit einem CampyGen-Beutel, für die Herstellung eines mikroaerophilen Milieus, in zwei Säckchen verpackt und danach bei 42 °C für 48 h inkubiert.

3.2.5 pH-Wert-Messung

Zur Bestimmung der pH-Werte der entnommenen Wasserproben wurde von jeder entnommenen Wasserstelle eine Wasserprobe in ein Glasröhrchen umgefüllt. In diesen Glasröhrchen erfolgte dann die pH-Wert-Messung mittels einer Elektrode und einem pH-Messgerät bei Raumtemperatur (ca. 20°C).

3.2.6 PEG-Präzipitation

Für die PEG-Präzipitation erfolgte die Entnahme von jeweils 25 ml Seewasser von jeder Probestelle und die Überführung in ein Zentrifugenröhrchen. Zu diesen wurden dann je 25 ml 20%ige PEG-8000/2.5 M NaCl Lösung hinzupipettiert. Im Anschluss wurde die Suspension 15 s lang gevortext und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben für 20 min bei 10.000 x g und einer Temperatur von 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das übriggebliebene Pellet wurde in 1 ml SM Puffer aufgelöst und danach mit einer Pipette in ein 2 ml Eppendorf Röhrchen aliquotiert. Zu diesen Röhrchen wurde dann jeweils 10 µl Chloroform zupipettiert, um die unerwünschte bakterielle Mikroflora abzutöten.

Die Probe mit Chloroform wurde danach 15 s gevortext, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 2 min lang bei 10.000 x g zentrifugiert, um die Schmutzpartikel zu pellettieren. Der Überstand, welcher zirka 900 µl umfasste, fungierte zum Nachweis der Bakteriophagen.

3.2.7 Bakteriophagen Nachweis

Für den Nachweis der Bakteriophagen wurde der semi-solide Agar (ssAgar) durch Aufkochen verflüssigt. Danach erfolgte die Überführung der Glasröhrchen mit je 4 ml ssAgar in einen 50 °C-Inkubator zum Abkühlen. Zu diesen 4 ml ssAgar wurden dann jeweils 24 µl 1 M CaCl₂-Lösung hinzupipettiert und anschließend wurden die Röhrchen gevortext. Im Anschluss wurden 1000 µl der bakteriellen Suspension zu den je 900 µl in SM Puffer gelösten PEG-Präzipitaten beigefügt und die Röhrchen wurden ein weiteres Mal gevortext. Die Dichte der bakteriellen Suspension für *E. coli* und Salmonellen besaß einen McFarland von 0,5, die Dichte der bakteriellen Suspension für *Campylobacter* einen McFarland von 5. Als Negativkontrolle für *E. coli* wurde der Stamm DSM 12242, für *Salmonella* der Stamm ATCC 14028s und für *Campylobacter* der Stamm *Campylobacter jejuni* 81-176 herangezogen. Diese Negativkontrollen enthielten jeweils 1000 µl der bakteriellen Stammkultur und 900 µl SM Puffer. Die bakterielle Suspension mit dem Präzipitat wurde dann jeweils zu 4 ml komplementierter ssAgar-Lösung zupipettiert und auf die dementsprechende Agarplatte ausgegossen und gleichmäßig verteilt. Die Verwendung von LB-Agarplatten erfolgte für *E. coli* und Salmonellen. Für den Nachweis von *Campylobacter*-Phagen wurden NZCYM-Agarplatten eingesetzt. Nach dem Polymerisieren erfolgte die Inkubation der Agarplatten. Die LB-Agarplatten wurden aerob bei 30 °C für 16 h, die NZCYM-Agarplatten bei 37 °C für 48 h unter Einhaltung einer mikroaerophilen Atmosphäre mit Hilfe eines CampyGen-Beutels inkubiert.

3.2.8 Auswertung der Platten

Die Auswertung der Platten erfolgte jeweils nach 16 h für den Nachweis von *E. coli*- und Salmonellen-Phagen bzw. nach 48 h für den Nachweis von *Campylobacter*-Phagen. Danach erfolgte die Auszählung der Plaques auf den Platten und die Umrechnung in PFU/ml („plaque forming units“ per ml). Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Plaques auch unter einem Mikroskop begutachtet. Die gefundenen Plaques wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von den Platten entnommen und in 2000 µl SM Puffer gelöst. Anschließend wurden sie 2 min lang

bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Filtrierung des Überstandes erfolgte mithilfe eines sterilen 0,2 µm PES-Spritzenvorsatzfilters in ein Eppendorf Röhrchen. Bis auf weiteres wurden die Phagenlysate im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Testung der angezüchteten *E. coli*-Kolonien auf die Virulenzgene *stxI* und *stxII* erfolgte mit einer PCR. Zur Herstellung der bakteriellen Suspension wurden zunächst mehrere, der zuvor auf Coli-ID-Agarplatten angezüchteten, *E. coli*-Kolonien mit einer Öse entnommen und in 1,5 ml LB-Agar überführt. Diese Röhrchen wurden danach gevortext und bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Pro Probe wurde 1 µl bakterielle Suspension verwendet. Der SuperMix für die PCR bestand aus 12,5 µl AccuStart™II GelTrack™PCR SuperMix, je 0,10 µl des virulenzgenspezifischen forward bzw. reverse Primers und 11,3 µl autoklaviertem bi-distillierten Wasser (siehe Tab. 1). Mit dem Eppendorf MasterCycler erfolgte die initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min. Danach folgten 35 Wiederholungen folgender Zyklen: Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Annealing bei 53 °C für 30 s sowie die Elongation bei 72 °C für 1 min. Anschließend erfolgte die finale Elongation für 5 min bei einer Temperatur von 72 °C. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

Tabelle 1: PCR- Reaktionskomponenten

PCR-Reaktionskomponenten	Volumen für 20-µl Reaktion	Endkonzentration
AccuStart II GelTrack PCR SuperMix (2X)	12,5 µl	1x
Forward Primer (100mM)	0,1µl	500 nM
Reverse Primer (100mM)	0,1µl	500 nM
Nuclease-free water	11,3µl	
Kolonien gelöst in 1000µl LB	1µl	
Reaktionsvolumen (µl)	20µl	

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Als Gel- und Laufpuffer für die Gelelektrophorese wurde 1%iger TAE-Puffer mit dem DNA/RNA-Farbstoff peqGREEN verwendet. Zur Herstellung des 1%igen TAE-Puffers wurden 20 ml 50%igen TAE-Puffers in einem Liter bi-destilliertem Wasser gelöst. Für die Herstellung eines 1%igen Agarose-Gels wurden anschließend 4 g Agarose in 400 ml 1%igem TAE-Puffer gelöst. Zum Kochen der Lösung wurde sie für 5 min in eine Mikrowelle gestellt. Nach dem Erreichen einer glasklaren Konsistenz wurde die Lösung bis auf eine Temperatur von 50 °C abgekühlt. Zu dieser Suspension wurden anschließend 24 µl des DNA/RNA-Farbstoffs peqGREEN beigefügt. Danach wurde sie in eine Gelelektrophoresekammer gegossen und bis zum vollständigen Polymerisieren und für zirka 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zum Aufladen auf das Agarose-Gel wurden 10 µl des amplifizierten PCR-Produkts verwendet. Als Marker wurde 1 kb DNA-Leiter verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1%igem Agarose-Gel für 45 min und einer Spannung von 150 V. Anschließend wurden die Fragmente mittels UV-Licht auf einem UV-Transilluminator identifiziert.

3.2.11 Antibiotogramm

Zur Bestimmung der Antibiotikaresistenzen (nach CLSI Standardmethode) wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt. Hierfür wurden zu Beginn jeweils drei, der zuvor auf Coli-ID-Agarplatten angezüchteten *E. coli*-Kolonien mit einer sterilen Metallöse entnommen und auf eine gedrittelte GKZ-Agarplatte ausgestrichen. Die GKZ-Agarplatten wurden dann bei 37 °C für 24 h inkubiert. Zur Bestimmung der Antibiotikaresistenzen der in den Seen gefundener *E. coli*-Isolate wurden daraufhin 1,5 ml Eppendorf Röhrchen mit 650 µl MH befüllt. Mit einer Pipettenspitze wurde jeweils eine einzelne Kolonie, der zuvor auf den GKZ-Agarplatten angezüchteten *E. coli*, entnommen, in die mit MH befüllten Eppendorf Röhrchen abgestreift und gevortext sodass in diesem eine Bakteriendichte McFarland von 0,5 eingestellt worden ist. Zur Übertragung der Suspension auf MH-Agarplatten wurden sterile Wattestäbchen zum Ausstreichen verwendet. Mit den Wattestäbchen wurde die Suspension aufgenommen und dann auf den MH-Agarplatten so ausgestrichen, dass die gesamte Platte benetzt war. Insgesamt wurde auf eine Resistenz gegenüber folgender acht Antibiotika getestet: Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin und Trimethoprim. Für die einzelnen Antibiotika wurden dabei folgende Plättchenkonzentrationen

verwendet: für Ampicillin 25 µg, für Chloramphenicol 30 µg, für Kanamycin 30 µg, für Nalidixinsäure 30 µg, für Streptomycin 25 µg, für Sulfonamide 300 µg, für Tetrazyklin 30 µg und für Trimethoprim 5 µg. Diese Agarplatten wurden anschließend bei 35 °C für 24 h inkubiert und danach erfolgte die Auswertung und Abmessung der Hemmhofdurchmesser in mm.

3.2.12 Salmonellen-Agglutinationstest

Zur Überprüfung des Vorhandenseins von Salmonellen auf den Selektivagarplatten wurde eine Objektträgeragglutination durchgeführt. Zuvor wurde die Anreicherung des Seewassers mit gepuffertem Peptonwasser auf eine XLD-Agarplatte ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Mit einer Metallöse wurden dann die verdächtigen schwarzen Kolonien von der Agarplatte entnommen und auf einen Objektträger mit einem Tropfen omnivalentem Testserum vermengt. Anschließend wurde der Objektträger geschwenkt und das Ergebnis beurteilt. Gleichzeitig wurde diese Kolonie auf einem Wuchagar angezüchtet, um die Objektträgeragglutination ohne den störenden Einfluss des XLD-Agars zu verifizieren.

4 Ergebnisse

4.1 pH-Wert-Messung

Tabelle 2: pH-Werte

See	Wasserprobe	pH-Wert
Altaussee See	AL1	8,04
Altaussee See	AL2	8,1
Altaussee See	AL3	7,84
Altaussee See	AL4	7,88
Altaussee See	AL5	7,89
Faaker See	F1	8,04
Faaker See	F2	7,9
Faaker See	F3	7,99
Faaker See	F4	7,93
Faaker See	F5	7,84
Grundlsee	GR1	7,74
Grundlsee	GR2	7,94
Grundlsee	GR3	8,08
Grundlsee	GR4	8,03
Grundlsee	GR5	7,98
Millstätter See	M1	7,79
Millstätter See	M2	7,97
Millstätter See	M3	7,98
Millstätter See	M4	8,1
Millstätter See	M5	7,98
Ossiacher See	O1	8,05
Ossiacher See	O2	8,15
Ossiacher See	O3	7,96
Ossiacher See	O4	7,89
Ossiacher See	O5	8,04
Ödensee	ÖD1	7,79
Ödensee	ÖD2	7,81
Ödensee	ÖD3	7,71
Ödensee	ÖD4	7,74
Ödensee	ÖD5	7,82
Teichalmsee	TAS1	8,27
Teichalmsee	TAS2	8,25
Teichalmsee	TAS3	8,15
Teichalmsee	TAS4	7,99
Teichalmsee	TAS5	8,11
Topplitzsee	TO1	7,93
Topplitzsee	TO2	7,88
Topplitzsee	TO3	7,74
Topplitzsee	TO4	7,76
Topplitzsee	TO5	7,78
Weißensee	WE1	8,41
Weißensee	WE2	8,07
Weißensee	WE3	8,05
Weißensee	WE4	7,97
Wörthersee	WÖ1	7,93
Wörthersee	WÖ2	8,12
Wörthersee	WÖ3	7,89
Wörthersee	WÖ4	8,19
Wörthersee	WÖ5	8,1

4.2 Anzüchtung der Bakterien

Die Auswertung der mit gepuffertem Peptonwasser angereicherten und auf Coli-ID- und MSRV-Agarplatten ausgestrichenen bzw. aufgetropften Proben erfolgte nach einer 16-24-stündigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von 42 °C. Dabei zeigte sich auf allen der ausgestrichenen Coli-ID-Agarplatten ein Wachstum mit roten Kolonien. Zur besseren Beurteilbarkeit und zum Nachweis der bakteriellen Reinkultur wurden für jeden See einzelne Kolonien von diesen Platten entnommen und erneut auf Coli-ID-Agarplatten ausplattiert und inkubiert. Auch auf diesen Platten zeigten sich am darauffolgenden Tag rote *E. coli*-Kolonien. Demnach zeigte sich ein Vorhandensein von *E. coli* in jedem der beprobten Seen.

Die MSRV-Agarplatten wurden nach 16-20 h beurteilt. Hierbei zeigte sich eine fragliche Migrationszone bei den Platten vom Ossiacher See sowie vom Grundlsee. Durch das nicht vorhandene aussagekräftige Schwärmverhalten auf den Agarplatten wurden diese jedoch als negativ gewertet. Die Auswertung der XLD-Agarplatten zeigte schwarze Kolonien bei den Proben vom Grundlsee und Toplitzsee. Diese schwarzen Kolonien wurden aufgrund der undeutlichen Abgrenzbarkeit und der Überwucherung von anderen Kolonien nochmals auf XLD-Agarplatten ausgestrichen. Dies wurde für mehrere Tage wiederholt, da eine deutliche Abgrenzung der Kolonien schwierig zu erzielen war. Ebenfalls wurde ein Salmonellen-Agglutinationstest mit den vermuteten schwarzen Salmonellen-Kolonien durchgeführt. Die schwarzen Kolonien wurden gleichzeitig auf GKZ-Agar ausgestrichen und diese Kolonien wurden ebenfalls mit omnivalentem Serum agglutiniert.

Die Überprüfung nach dem Vorhandensein von *Campylobacter* in den beprobten Seen verlief negativ und es konnten keine *Campylobacter*-Kolonien auf den CCDA-Agarplatten dokumentiert werden.

4.3 Salmonellen-Agglutinationstest

Die Objektträgeragglutination zeigte keine Agglutination, somit konnten keine Salmonellen in den beprobten Seen bestätigt werden.

4.4 Bakteriophagennachweis

Die Auswertung der LB-Agarplatten zum Nachweis von *E. coli*-Phagen erfolgte jeweils am darauffolgenden Tag nach dem Ausgießen. Bei der Auswertung wurde auf das Vorhandensein von Plaques auf den Agarplatten geachtet. Wenn nötig wurden die Platten auch mikroskopisch begutachtet und anschließend wurden die Plaques auf jeder Platte ausgezählt und in PFU pro Milliliter umgerechnet. Bei den Proben des Teichalmsees konnten an jeder der fünf entnommenen Stellen Plaques auf den Platten und demnach Coliphagen nachgewiesen werden (siehe Tab. 3). Ebenso konnte im Wörthersee und im Ödensee jeweils an einer entnommenen Probestelle eine Plaque auf den Agarplatten dokumentiert werden (siehe Tab. 4).

Tabelle 3: Phagen Teichalmsee

Probe	Plaques in 6 ml	PFU/ml
TAS 1	20	3,333
TAS 2	29	4,833
TAS 3	23	3,833
TAS 4	18	3
TAS 5	11	1,83

Tabelle 4: Phagen Ödensee und Wörthersee

Probe	Plaques in 25 ml	PFU/ml
ÖD 1	1	0,04
WÖ 1	1	0,04

Bei der Überprüfung nach Salmonella-Phagen konnten keine Plaques für keinen der beprobten Seen auf den Agarplatten festgestellt werden.

Ebenfalls wiesen die beprobten Seen keine *Campylobacter*-Phagen auf.

4.5 Nachweis der Virulenzgene *stxI* und *stxII*

Für den Nachweis der Virulenzgene *stxI* und *stxII* wurden eine PCR und anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor in den See gefundene *E. coli*-Kolonien beprobt. Bei der Gelelektrophorese konnte man bei einer Probe *stxI* nachweisen.

Diese Probe stammte aus dem Weissensee. Für die restlichen Seen verlief die Überprüfung auf Virulenzgene für *stxI* und *stxII* negativ.

4.6 Antibiogramme

Für die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen der in den Seen gefundener *E. coli* wurden zunächst drei Kolonien von den Coli-ID-Agarplatten mit einer Metallöse auf GKZ-Agarplatten ausgestrichen und inkubiert. Die angezüchteten *E. coli*-Kolonien stammten jeweils aus einer gepoolten Probe jedes jeweiligen Sees. Die drei Ergebnisse, wie in der Tabelle angeführt, geben daher nur einen Rückschluss auf das Vorhandensein von antibiotikaresistenten Erregern des entsprechenden Sees, aber nicht auf die Entnahmestelle. Die mit *E. coli*-Kulturen benetzten und mit Antibiotikatestplättchen bedruckten MH-Agarplatten wurden für 24 h bei 35 °C inkubiert. Danach erfolgte die Abmessung der Hemmhöfe in mm. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die CLSI-Richtlinien der jeweiligen angewendeten Antibiotika herangezogen (siehe Tab. 6).

Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis Antibiotika

Abkürzung	Antibiotikum
Amp	Ampicillin
C	Chloramphenicol
K	Kanamycin
NA	Nalidixinsäure
S	Streptomycin
S3	Sulfonamide
TE	Tetrazyklin
W	Trimethoprim

Tabelle 6: Ergebnisse Agardiffusionstest

See	Wasserprobe	Hemmhof in mm							
		Amp 25	C 30	K 30	NA 30	S 25	S3 300	TE 30	W 5
Altaussee See	AL1	12	25	19	30	18	23	25	30
Altaussee See	AL2	6	21	12	15	19	31	21	6
Altaussee See	AL3	6	20	11	15	19	27	20	6
Faaker See	F1	11	26	21	27	10	22	25	30
Faaker See	F2	6	11	20	18	17	6	7	6
Faaker See	F3	6	12	20	18	17	6	7	6
Grundlsee	GR1	18	27	18	29	13	20	25	29
Grundlsee	GR2	10	26	19	30	16	24	25	32
Grundlsee	GR3	12	25	18	30	6	22	24	31
Millstätter See	M1	13	27	19	30	18	20	25	30
Millstätter See	M2	13	25	20	29	18	6	23	34
Millstätter See	M3	12	25	19	28	18	24	23	30
Ossiacher See	O1	19	25	21	29	19	17	8	25
Ossiacher See	O2	12	28	20	30	19	27	25	35
Ossiacher See	O3	13	22	21	28	6	23	7	23
Ödensee	ÖD1	10	25	19	27	18	21	25	30
Ödensee	ÖD2	11	25	19	28	17	24	8	26
Ödensee	ÖD3	8	24	20	27	19	22	23	26
Teichalmsee	TAS1	22	28	18	26	17	20	20	30
Teichalmsee	TAS2	24	27	19	26	18	6	25	29
Teichalmsee	TAS3	23	24	21	26	6	25	28	28
Toplitzsee	TO1	11	26	20	29	19	21	24	27
Toplitzsee	TO2	10	26	19	29	17	24	25	27
Toplitzsee	TO3	10	24	20	26	6	19	23	28
Weissensee	WE1	12	25	18	28	16	20	24	31
Weissensee	WE2	8	25	18	27	17	21	21	28
Weissensee	WE3	11	24	19	27	16	20	25	30
Wörthersee	WÖ1	8	25	19	27	17	20	26	28
Wörthersee	WÖ2	13	26	20	29	18	25	26	33
Wörthersee	WÖ3	6	21	11	19	16	31	20	10

■ rot= resistent

■ orange= intermediär resistent

■ grün= sensibel

Von den getesteten *E. coli*-Kolonien wiesen 25 der 30 Proben Resistenzen gegenüber Ampicillin auf. Dabei konnten in jedem der beprobten Seen, bis auf den Teichalmsee, Ampicillin-resistente *E. coli* vermerkt werden. Lediglich fünf der Proben waren sensibel gegenüber diesem Antibiotikum. Davon stammten drei Proben aus dem Teichalmsee, eine aus dem Grundlsee und wiederum eine aus dem Ossiacher See.

Gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol konnten nur zwei resistente Proben beobachtet werden. Diese beiden hatten ihren Ursprung im Faaker See. Die restlichen Proben waren sensibel gegenüber Chloramphenicol.

Resistenzen gegenüber Kanamycin wurden in drei der Proben festgestellt. Davon waren zwei aus dem Altaussee See und eine aus dem Wörthersee. Der Rest der Proben erwies sich als sensibel.

Nalidixinsäure zeigte bei 26 der 30 Proben eine Wirksamkeit. Es konnten jedoch vier intermediär resistente Proben nachgewiesen werden. Zwei davon stammten aus dem Altausseer See und zwei aus dem Faaker See.

In fünf der Proben konnten streptomycinresistente *E. coli* detektiert werden. Davon stammte eine aus dem Faaker See, eine aus dem Grundlsee, eine aus dem Ossiacher See, eine aus dem Teichalmsee und eine aus dem Toplitzsee. Eine der Proben aus dem Grundlsee war intermediär resistent gegenüber Streptomycin. Die restlichen Proben erwiesen sich als sensibel.

Bei der Testung gegen Resistenzen gegenüber Sulfonamiden, fand man vier resistente Proben. Zwei davon waren aus dem Faaker See, eine aus dem Millstätter See und wiederum eine aus dem Teichalmsee. Der Rest der Proben war sensibel.

Gegenüber Tetrazyklin wiesen fünf der Proben Resistenzen auf. Zwei davon stammten aus dem Faaker See, zwei aus dem Ossiacher See und eine aus dem Ödensee. Die restlichen Proben waren sensibel.

Fünf der Proben zeigten eine Resistenz gegenüber Trimethoprim, davon zwei aus dem Altausseer See, zwei aus dem Faaker See und eine aus dem Wörthersee. Die restlichen Proben waren gegenüber Trimethoprim sensibel.

5 Diskussion

Österreichs Badegewässer, dazu werden Seen und Flüsse gezählt, welche als solche gemeldet sind, werden regelmäßig vor jeder Badesaison auf ihre Wasserqualität überprüft. Im Jahr 2020 entsprachen 99,6 % der österreichischen Badegewässer den Mindestqualitätsstandards. 97,7 % der Badegewässer wiesen sogar eine exzellente Wasserqualität auf (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2021).

In dieser Arbeit wurden zehn österreichische Badeseen beprobt, jeweils fünf aus der Steiermark und fünf aus Kärnten. Bei jedem der Seen wurden fünf (bzw. vier beim Weissensee) Probenentnahmestellen ausgewählt. Insgesamt wurden demnach 49 Wasserproben gesammelt. Dazu zählten sowohl Badestrände als auch öffentlich zugängliche Seeplätze. Die Probenentnahme erfolgte dabei im Sommermonat August und die Badeplätze waren reichlich besucht. Ebenso konnte man an nahezu allen Probenentnahmestellen Wassergeflügel wie Enten, Schwäne oder Blässhühner beobachten (siehe Abb. 12 und 13). Neben diesen wurden manche der Seebereiche auch als Badestellen für Hunde genutzt. Überprüft wurden diese Probenentnahmestellen jeweils auf das Vorhandensein zoonotischer Erreger wie *Campylobacter*, *E. coli* und Salmonellen, deren Bakteriophagen und die pH-Werte der entnommenen Wasserproben wurden bestimmt.



Abbildung 12: Wassergeflügel am Badestrand Millstätter See



Abbildung 13: Wassergeflügel am Badestrand Weissensee

Der pH-Wert des Wassers stellt einen entscheidenden Umweltfaktor dar. Er bestimmt die bakterielle Besiedelung von Wasser und Boden. Der pH-Wert kann vor allem in der aquatischen Umwelt stark variieren. Wasser aus Seen oder Flüssen kann selbst innerhalb kleiner geografischer Gebiete pH-Werte zwischen unter 4 und über 9 aufweisen. Auch durch Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel starker Regenfall, kann der pH-Wert eines Wassers bereits innerhalb von Stunden absinken. Ein Anstieg des pH-Wertes eines Gewässers hingegen, kann durch warme Temperaturen und viele Sonnenstrahlen begründet sein. Somit kann man oftmals tageszeitlich bedingte Änderungen des pH-Wertes um bis zu zwei pH-Wert-Einheiten beobachten (BAATH u. KRITZBERG, 2015). Die entnommenen Wasserproben wiesen bei der Messung der pH-Werte eine Spannbreite von 7,71 bis 8,41 auf (siehe Tab. 2).

Bei der Beprobung der Seen auf die zoonotischen Erreger *Campylobacter spp.*, *E. coli* und Salmonellen konnten in jedem See *E. coli* nachgewiesen werden. Die gefundenen *E. coli*-Kolonien wurden daraufhin mittels einer PCR auf die Virulenzgene für *stxI* und *stxII* überprüft. Bei einer Probe konnte das Virulenzgen für *stxI* nachgewiesen werden. Diese Probe konnte dem Weissensee zugeordnet werden.

Shigatoxin-produzierende *E. coli* besiedeln häufig den Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern. Diese wiederum stellen eine der Hauptansteckungsquellen für den Menschen mit humanpathogenen *E. coli*-Stämmen, wie zum Beispiel EHEC dar. Die Infektion erfolgt dabei durch die orale Aufnahme des Menschen von mit Rinderfäkalien kontaminierten Lebensmittel oder Wasser (MENGE, 2020). Diese Rinderfäkalien können über landwirtschaftliche Aktivitäten sowie durch Niederschlagsereignisse in das Grundwasser und in umliegende Gewässer gespült werden, in denen Menschen in späterer Folge in Kontakt mit diesen Erregern treten und sich infizieren können (LINE, 2003; STALEY et al., 2013). Es kann vermutet werden, dass die im Weissensee gefundenen Shigatoxin-bildenden *E. coli* durch landwirtschaftliche Aktivitäten oder durch die Abschwemmung von Rinderweiden nach Niederschlagsereignisse in den See gelangen konnten.

Die restlichen der nicht Shigatoxin-bildenden *E. coli* können ebenfalls durch Niederschlagsereignisse, landwirtschaftliche Aktivitäten, unzureichend aufbereitetem Abwasser oder durch Hinterlassenschaften von Wildtieren in die Gewässer gelangt sein (O'FLAHERTY et al., 2019).

Die Beprobung der Seen auf das Vorhandensein von *Campylobacter spp.* und Salmonellen verlief negativ und es konnten keine dieser Bakterien nachgewiesen werden.

Grundsätzlich findet man die höchsten Konzentrationen an *Campylobacter* in landwirtschaftlich beeinflussten Gewässern, die niedrigsten hingegen in Badegewässern (MULDER et al., 2020). Ebenso kann man saisonale Unterschiede im Auftreten von *Campylobacter* in der aquatischen Umwelt beobachten. So sind die Konzentrationen in den Wintermonaten im Vergleich zum Sommer höher. Als Ursache vermutet man hierbei die Inaktivierung von *Campylobacter* durch die stärkere UV-Strahlung in den Sommermonaten (MULDER et al., 2020). Des Weiteren nimmt man an, dass Salmonellen im Seewasser durchschnittlich schneller absterben als *E. coli* (PACHEPSKY et al., 2014). Diese Forschungsergebnisse korrelieren mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen.

Neben dem Vorhandensein der zoonotischen Erreger *Campylobacter spp.*, *E. coli* und Salmonellen wurden die Probenentnahmestellen auch auf das Vorhandensein ihrer zugehörigen Bakteriophagen untersucht. Dabei konnten lediglich *E. coli*-Phagen nachgewiesen werden. Bei den Proben des Teichalmsees konnte an jeder der fünf beprobten Stellen Coliphagen aufgefunden werden. Ebenso konnte man an einer beprobten Stelle des Ödensees und einer des Würthersees Coliphagen nachweisen.

Die Verbreitung von Bakteriophagen in der Umwelt ist noch nicht vollständig erforscht. Jedoch nimmt man an, dass sie aufgrund ihrer Abhängigkeit von ihren bakteriellen Wirten ähnlich weit verbreitet sind wie Bakterien (DÍAZ-MUNOZ u. KOSKELLA, 2014). Diese Annahme spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie wider. So konnte man zu den gefundenen *E. coli* auch Coliphagen nachweisen. Im Gegenzug verlief die Beprobung auf das Vorhandensein von *Campylobacter* und Salmonellen negativ und man konnte auch keine zugehörigen Phagen nachweisen.

Die Umwelt und in diesem Sinne auch Gewässer nehmen einen bedeutenden Stellenwert in der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen ein (NAPPIER et al., 2020). Eine Eintragung antibiotikaresistenter Keime in die aquatische Umwelt kann bedingt sein durch die Landwirtschaft, die Haltung und Produktion von Nutztieren oder aber auch durch Wildvögel (NAPPIER et al., 2020). Durch die Überlebensfähigkeit von Antibiotikaresistenzgenen in Gewässern können diese eine Gefahr für die menschliche und tierische Gesundheit darstellen (NNADOZIE u. ODUME, 2019).

In dieser Studie wurden die Wasserproben der österreichischen Seen ebenfalls auf das Auftreten von antibiotikaresistenten Keimen überprüft. Da lediglich *E. coli* in den Gewässern nachgewiesen werden konnten, wurden auch nur diese auf Antibiotikaresistenzen überprüft. Dabei zeigte sich die höchste Dichte an Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin. 25 der 30 Proben wiesen Resistenzen gegenüber Ampicillin auf und in jedem der beprobten Seen, mit Ausnahme des Teichalmsees, konnten Ampicillin-resistente *E. coli* nachgewiesen werden. Gegenüber Streptomycin, Tetrazyklin und Trimethoprim zeigten jeweils fünf Proben Resistenzen auf. Gegenüber Sulfonamide waren es vier Proben, bei Kanamycin drei und gegenüber Chloramphenicol waren es lediglich zwei resistente Proben.

Die meisten Resistenzen gegenüber den untersuchten Antibiotika wies der Faaker See auf. Es konnten dabei resistente *E. coli* gegenüber allen untersuchten Antibiotika nachgewiesen werden, mit der Ausnahme von Kanamycin. Die zweithäufigsten Resistenzen konnten im Altausseer See nachgewiesen werden. Die Proben zeigten hierbei Resistenzen gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Trimethoprim sowie intermediäre Resistenzen gegenüber Nalidixinsäure. Die wenigsten Resistenzen wies der Weissensee auf, in welchem lediglich Resistenzen gegenüber Ampicillin gefunden werden konnten.

Im Vergleich zeigte ebenfalls eine österreichische Studie aus dem Jahr 2019 auf, dass ein gefundenes *E. coli*-Isolat resistent gegenüber Ampicillin, Cefuroxime-Axetil und Cefotaxime war (LEPUSCHITZ et al., 2019).

In einer kanadischen Forschungsarbeit zeigten sich bei den *E. coli*-Isolaten ebenso die häufigsten Resistenzen gegenüber Ampicillin, Streptomycin, Sulfisoxazol und Tetrazyklin (KADYKALO et al., 2020).

Bei der Überwachung der Antibiotikaresistenzen der zoonotischen Erreger wie *E. coli* in lebensmittelproduzierenden Tieren zeigten sich global die häufigsten Resistenzen gegenüber Ampicillin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim und Tetrazyklin (EFSA, 2020).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten ein Vorhandensein an *E. coli* an jedem der beprobten Seen. Ebenso konnte in einer Wasserprobe des Weissensees humanpathogene Shigatoxin-bildende *E. coli* nachgewiesen werden. Die gefundenen *E. coli*-Isolate zeigten des Weiteren Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika auf.

Ein Vorhandensein von *Campylobacter spp.* oder Salmonellen in den österreichischen Badegewässern im Sommer 2020 konnte jedoch nicht aufgezeigt werden.

Man kann also davon ausgehen, dass das Baden in österreichischen Seen nicht zu den bedeutenden Infektionsquellen des Menschen für eine Infektion mit den zoonotischen Erregern *Campylobacter spp.*, *E. coli* oder Salmonellen zählt, insofern der Badende ein intaktes Immunsystem besitzt.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es zu bestimmen, ob zoonotische Erreger wie *Campylobacter spp.*, *E. coli* oder Salmonellen eine Gefahr für den Menschen beim Schwimmen in ausgewählten österreichischen Seen darstellen. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob man die dazugehörigen Bakteriophagen zu den jeweiligen Bakterien auffinden kann. Hierfür wurden jeweils fünf Seen aus der Steiermark und fünf Seen aus Kärnten ausgewählt und jeweils an fünf (bzw. vier beim Weissensee) Stellen im August 2020 beprobt.

Campylobacter spp., *E. coli* und Salmonellen zählen zu den bedeutendsten Zoonoseerregern des Menschen weltweit. Die häufigste Übertragung mit diesen Erregern erfolgt über nicht ausreichend aufbereitete Lebensmittel oder Wasser. Sie können jedoch auch bedingt durch verschiedenste Umwelteinflüsse wie Starkregen, landwirtschaftliche Ackerwirtschaft oder Wildtiere in Gewässer gelangen, in denen sich Menschen vor allem in den Sommermonaten aufhalten. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Menschen bei Wassersportarten und vor allem beim Schwimmen eine gewisse Menge an Wasser verschlucken und so pathogene Erreger aufnehmen können.

Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten ein Vorhandensein von *E. coli* in jedem der zehn beprobten Seen. Des Weiteren konnten Shigatoxin-bildende *E. coli* aus dem Weissensee isoliert werden. Die zugehörigen Coliphagen konnten an jeder Entnahmestelle des Teichalmsees, an einer des Ödensees und einer des Wörthersees nachgewiesen werden.

Die Beprobung auf die restlichen zwei der zoonotischen Erreger *Campylobacter spp.* und Salmonellen verlief negativ und ihre zugehörigen Bakteriophagen konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Die Überprüfung auf Antibiotikaresistenzen der gefundenen *E. coli*-Isolate zeigte hauptsächlich eine Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Streptomycin, Tetrazyklin und Trimethoprim. Diese Ergebnisse korrelieren mit den häufigsten Resistenzen von aus Gewässern isolierter *E. coli*.

Die Hypothese, dass das Vorhandensein von *Campylobacter spp.*, Salmonellen und pathogenen *Escherichia coli* und deren Phagen in österreichischen Badegewässern in den Sommermonaten nicht zu bedeutenden Infektionsquellen des Menschen zählt, konnte belegt werden. Demnach bieten österreichische Seen eine ausgezeichnete Wasserqualität und man kann in ihnen bedenkenlos schwimmen, insofern man ein intaktes Immunsystem besitzt.

7 Summary

In this Diploma thesis it was analysed if swimming in certain lakes in Austria could be dangerous in regard to infections with zoonotic pathogens like *Campylobacter spp.*, *E. coli* and *Salmonella*. Furthermore, bacteriophages of these pathogens were isolated from the sampled water. Therefore, in August 2020 five different lakes in Styria and Carinthia were selected and sampled at five (four at Weissensee) different sampling sites.

Campylobacter spp., *E. coli* and *Salmonella* are the most important zoonotic bacterial pathogens worldwide. Infections are mainly due to contaminated food and drinking water. These zoonotic pathogens can find their way into lakes, where people like to spend summer time, by animal and human fecal contamination. Different environmental conditions like heavy rainfall, farming and animals living in the wild can also impact on this contamination. In different studies it has been shown that people can be infected by taking up certain amounts of water performing different types of aquatic sports or swimming in lakes.

E. coli was found in each of the sampled lakes (by enrichment); in one lake (Weissensee) shiga-toxin positive *E. coli* was isolated. Coliphages were identified in three lakes, Teichalmsee, where all five sampling sites tested positive, in Oedensee and in Woerthersee. No *Campylobacter spp.* nor *Salmonella* could be detected in any of the water samples. Antimicrobial resistance testing in isolated *E. coli* showed that resistance against ampicillin, streptomycin, tetracycline and trimethoprim was found most often. These results confirm study results from lakes in other countries.

Zoonotic bacterial infections like campylobacteriosis, salmonellosis and infections caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli* by performing aquatic activities in Austrian lakes during summer months are not very likely.

8 Abkürzungsverzeichnis

AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
C.	<i>Campylobacter</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
DAEC	Diffus adhärenzte <i>E. coli</i>
E.	<i>Escherichia</i>
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
ETEC	Enterotoxinbildende <i>E. coli</i>
GKZ	Gesamtkeimzahl
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
LB	Luria-Bertani
LT	Hitzelabiles Toxin
MH	Mueller-Hinton
MRSV	Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis
NaCl	Natriumchlorid
PEG	Polyethylenglycol
PFU	Plaque Forming Units
PI-Buffer	Prophage Induction-Buffer
ss	Semisolid
S.	<i>Salmonella</i>
ser.	Serovar
spp.	Spezies (Plural)
ST	Hitzestabiles Toxin
Stx	Shigatoxin
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
VT	Verotoxin
WHO	World Health Organisation
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat

9 Literaturverzeichnis

- ABEDON, S.T. (2012): Phages. In: HYMAN P., ABEDON S.T. (Hrsg.): Bacteriophages in health and disease. 1. Aufl., CABI, Wallingford, 1-5.
- ACKERMAN, D., WEISBERG, S.B. (2003): Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. J. Water Health **1**, 85-89. doi: 10.2166/wh.2003.0010
- AGES (2018): Zoonosen und ihre Erreger in Österreich. Bericht 2018; https://www.ages.at/download/0/0/c38f0d95e095fe7e74162ddae9052a4c532450db/fileadmin/AGES2015/Themen/Krankheitserreger_Dateien/Zoonosen/Zoonosenbroschuere_2018_1o_Din-A4_BF.pdf, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- AGES (2020): Badegewässermonitoring; <https://www.ages.at/themen/umwelt/wasser/badegewaesser/>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- BAATH, E., KRITZBERG, E. (2015): pH tolerance in freshwater bacterioplankton: trait variation of the community as measured by leucine incorporation. Appl. Environ. Microb. **81**, 7411-7418. doi: 10.1128/AEM.02236-15
- BALCAZAR, J.L. (2014): Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. PLoS Pathog. **10**, 1-4. doi: 10.1371/journal.ppat.1004219
- BAUERFEIND, R., GRAEVENITZ, A., KIMMIG, P., SCHIEFER, H.G., SCHWARZ, T., SLENCZKA, W., ZAHNER, H. (2015): Zoonosen. 4. Aufl., ASM Press, New York, XV.
- BOLTON, F.J., SURMAN, S.B., MARTIN, K., WAREING, D.R., HUMPHREY, T.J. (1999): Presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in sand from bathing beaches. Epidemiol. Infect. **122**, 7-12. doi 10.1017/s0950268898001915
- BRIX, A., CAFORA, M., AURELI, M., PISTOCCHI, A. (2020): Animal Models to Translate Phage Therapy to Human Medicine. Int. J. Mol. Sci. **21**, 1-13. doi: 10.3390/ijms21103715
- CHINIVASAGAM, H.N., ESTELLA, W., MADDOCK, L., MAYER, D.G., WEYAND, C., CONNERTON, P.L., CONNERTON, I.F. (2020): Bacteriophages to Control *Campylobacter* in Commercially Farmed Broiler Chickens, in Australia. Front. Microbiol. **11**, 1-7. doi: 10.3389/fmicb.2020.00632
- D'HERELLE, F. (2007): On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. Res. Microbiol. **158**, 553-554. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005
- DÍAZ-MUNOZ, S.L., KOSKELLA, B. (2014): Bacteria-phage interactions in natural environments. Adv. Appl. Microbiol. **89**, 137-145. doi: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4
- Die Presse (2019): Gefährliche Keime in Seen gefunden; <https://www.diepresse.com/5714691/gefaehrliche-keime-in-seen-gefunden>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- DOMINGUES, A.R., PIRES, S.M., HALASA, T., HALD, T. (2012): Source attribution of human salmonellosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. Epidemiol. Infect. **140**, 959-966. doi: 10.1017/S0950268811002172

- DUFOUR, A.P., EVANS, O., BEHYMER, T.D., CANTÚ, R. (2006): Water ingestion during swimming activities in a pool: a pilot study. *J. Water Health* **4**, 425-429. doi: 10.2166/wh.2006.0026
- EFSA (2020): The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA* **18**, 3-91. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6007
- EUROPÄISCHE UMWELTAGENTUR (2020): Qualität europäischer Badegewässer 2019; <https://www.eea.europa.eu/de/publications/qualitaet-der-europaeischen-badegewaesser-2019>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY (2021): Austrian bathing water quality in 2020; <https://www.eea.europa.eu/themes/water/europes-seas-and-coasts/assessments/state-of-bathing-water/country-reports-2020-bathing-season/austrian-bathing-water-quality-in-2020/view>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- FANG, T., WANG, H., CUI, Q., ROGERS, M., DONG, P. (2018): Diversity of potential antibiotic-resistant bacterial pathogens and the effect of suspended particles on the spread of antibiotic resistance in urban recreational water. *Water Res.* **145**, 543-550. doi: 10.1016/j.watres.2018.08.042
- GUY, R.A., ARSENAULT, J., KOTCHI, S.O., GOSSELIN-THÉBERGE, M., CHAMPAGNE, M.-J., BERTHIAUME, P. (2018): *Campylobacter* in recreational lake water in southern Quebec, Canada: presence, concentration, and association with precipitation and ruminant farm proximity. *J. Water Health* **16**, 516-527. doi: 10.2166/wh.2018.222
- HATVANI, I.G., KIRSCHNER, A.K.T., FARNLEITNER, A.H., TANOS, P., HERZIG, A. (2018): Hotspots and main drivers of fecal pollution in Neusiedler See, a large shallow lake in Central Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 28885-28896. doi: 10.1007/s11356-018-2783-7
- ISHII, S., HANSEN, D.L., HICKS, R.E., SADOWSKY, M.J. (2007): Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 2203-2208. doi: 10.1021/es0623156
- ISHII, S., SADOWSKY, M.J. (2008): *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes Environ.* **23**, 101-105. doi: 10.1264/jsme2.23.101
- KADYKALO, S., THOMAS, J., PARMLEY, E.J., PINTAR, K., FLEURY, M. (2020): Antimicrobial resistance of *Salmonella* and generic *Escherichia coli* isolated from surface water samples used for recreation and a source of drinking water in southwestern Ontario, Canada. *Zoonoses Public Health* **67**, 567-574. doi: 10.1111/zph.12720
- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123-137. doi: 10.1038/nrmicro818
- KAPPERUD, G., ESPELAND, G., WAHL, E., WALDE, A., HERIKSTAD, H., GUSTAVSEN, S. et al. (2003): Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *Am. J. Epidemiol.* **3**, 2616-2618. doi: 10.1093/aje/kwg139.

- KORTRIGHT, K.E., CHAN, B.K., KOFF, J.L., TURNER, P.E. (2019): Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* **25**, 219-229. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014
- LENART-BORONÍ, A., PRAJSNAR, J., GUZIK, M., BORONÍ, P., CHMIEL, M. (2020): How much of antibiotics can enter surface water with treated wastewater and how it affects the resistance of waterborne bacteria: A case study of the Białka river sewage treatment plant. *Environ. Res.* **191**, 1-9. doi: 10.1016/j.envres.2020.110037
- 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. *Bodenkultur* **70**, 82.86. doi: 10.2478/boku-2019-0007
- LIN, D.M., KOSKELLA, B., LIN, H.C. (2017): Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *WJGPT* **8**, 162-170. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162
- LIN, J., GANESH, A. (2013): Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int. J. Environ. Health Res.* **23**, 1-13. doi: 10.1080/09603123.2013.769201
- LINE, D.E. (2003): Changes in a stream's physical and biological conditions following livestock exclusion. *Trans ASAE* **46**, 287-292. doi: 10.13031/2013.12979
- MAHARAJAN, A. (2013): Bacteriophages. In: MAHARAJAN A. (Hrsg.): *Virology*. Daya Publishing House, New Dehli, 65–67.
- MAYRHOFFER S., PAULSEN P., SMULDERS, F.J.M., HILBERT F. (2004): Antimicrobial resistance profile of five major foodborne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 23– 29. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.006
- MCKEE, A.M., CRUZ, M.A. (2021): Microbial and Viral Indicators of Pathogens and Human Health Risks from Recreational Exposure to Waters Impaired by Fecal Contamination. *J. Sustainable Water Built Environ.* **7**, 1-11. doi: 10.1061/JSWBAY.0000936
- MENGE, C. (2020): The Role of *Escherichia coli* Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle. *Toxins* **12**, 2-23. doi: 10.3390/toxins12090607
- MOORE, J.E., CORCORAN, D., DOOLEY, J.S.G., FANNING, S., LUCEY, B., MATSUDA, M. et al. (2005): *Campylobacter*. *Vet. Res.* **36**, 1956-1962. doi: 10.1051/vetres:2005012
- MULDER, A.C., FRANZ, E., RIJK, S., VERSLUIS, M.A.J., COIPAN, C., BUIJ, R. et al. (2020): Tracing the animal sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Water Res.* **187**, 1-11. doi: 10.1016/j.watres.2020.116421
- NAPPIER, S.P., LIGUORI, K., ICHIDA, A.M., STEWART, J.R., JONES, K.R. (2020): Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *Int. J. Env. Res. Public Health* **17**, 1-15. doi: 10.3390/ijerph17218034
- NATARO, J.P., KAPER, J.B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 144-180. doi: 10.1128/CMR.11.1.142
- NEHER, T.P., MA, L., MOORMAN, T.B., HOWE, A., SOUPIR, M.L. (2020a): Seasonal variations in export of antibiotic resistance genes and bacteria in runoff from an agricultural watershed in Iowa. *Sci. Total Environ.* **738**, 2-10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140224

- NEHER, T.P., MA, L., MOORMAN, T.B., HOWE, A.C., SOUPIR, M.L. (2020b): Catchment-scale export of antibiotic resistance genes and bacteria from an agricultural watershed in central Iowa. *PLoS one* **15**, 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0227136
- NNADOZIE, C.F., ODUME, O.N. (2019): Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environ. Pollut.* **254**, 1-11. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113067
- O'FLAHERTY, E., SOLIMINI, A., PANTANELLA, F., CUMMINS, E. (2019): The potential human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through recreational water. *Sci. Total Environ.* **650**, 786-794. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.018
- ORF (2019): Krankenhauskeime in Badeseen gefunden; <https://oesterreich.orf.at/stories/3019516/>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.
- PACHEPSKY, Y.A., BLAUSTEIN, R.A., WHELAN, G., SHELTON, D.R. (2014): Comparing temperature effects on *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Enterococcus* survival in surface waters. *Lett. Appl. Microbiol.* **59**, 278-282. doi: 10.1111/lam.12272
- PALMER, J.A., LAW, J.-Y., SOUPIR, M.L. (2020): Spatial and temporal distribution of *E. coli* contamination on three inland lake and recreational beach systems in the upper Midwestern United States. *Sci. Total Environ.* **722**, 1-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137846
- PERKINS, A., TRIMMIER, M. (2017): Recreational Waterborne Illnesses: Recognition, Treatment, and Prevention. *Am. Fam. Physician* **95**, 554-559.
- PURNELL, S., HALLIDAY, A., NEWMAN, F., SINCLAIR, C., EBDON, J. (2020): Pathogen infection risk to recreational water users, associated with surface waters impacted by de facto and indirect potable reuse activities. *Sci. Total Environ.* **722**, 1-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137799
- RAVEL, A., PINTAR, K., NESBIT, A., POLLARI, F. (2016): Non food-related risk factors of campylobacteriosis in Canada: a matched case-control study. *BMC Public Health* **16**, 1-10. doi: 10.1186/s12889-016-3679-4
- RUSSO, G.S., EFTIM, S.E., GOLDSTONE, A.E., DUFOUR, A.P., NAPPIER, S.P., WADE, T.J. (2020): Evaluating health risks associated with exposure to ambient surface waters during recreational activities: A systematic review and meta-analysis. *Water Res.* **176**, 2-22. doi: 10.1016/j.watres.2020.115729
- SÁNCHEZ-VARGAS, F.M., ABU-EL-HAIJA, M.A., GÓMEZ-DUARTE, O.G. (2011): *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* **9**, 263-271. doi: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
- SCHMELCHER, M., LOESSNER, M.J. (2014): Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* **4**, 1-11. doi: 10.4161/bact.28137
- SCHÖNBERG-NORIO, D., TAKKINEN, J., HÄNNINEN, M.-L., KATILA, M.-L., KAUKORANTA, S.-S., MATTILA, L., RAUTELIN, H. (2004): Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1474-1476. doi: 10.3201/eid1008.030924
- SHEN, Z., WANG, Y., ZHANG, Q., SHEN, J. (2018): Antimicrobial Resistance in *Campylobacter spp.* *Microbiol. Spectr.* **6**, 1-8. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0013-2017

- SOLLER, J.A., SCHOEN, M.E., BARTRAND, T., RAVENSCROFT, J.E., ASHBOLT, N.J. (2010): Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Res.* **44**, 4674-4687. doi: 10.1016/j.watres.2010.06.049
- STALEY, Z. R., CHASE, E., MITRAKI, C., CRISMAN, T. L., HARWOOD, V. J. (2013): Microbial water quality in freshwater lakes with different land use J. Appl. Microbiol. **115**, 1240-1247. doi: 10.1111/jam.12312
- THANNER, S., DRISSNER, D., WALSH, F.(2016): Antimicrobial Resistance in Agriculture. *Mbio.* **7**, 1-4. doi: 10.1128/mBio.02227-15
- TRACOGNA, M. F., LÖSCH, L. S., ALONSO, J. M., MERINO, L. A. (2013): Detection and characterization of *Salmonella spp.* in recreational aquatic environments in the Northeast of Argentina. *Rev. Ambiente Agua* **8**, 19-23. doi: 10.4136/ambi-agua.1145
- WHELAN, C. D., Monaghan, P., GIRDWOOD, R. W., FRICKER, C. R. (1988): The significance of wild birds (*Larus sp.*) in the epidemiology of *Campylobacter* infections in humans. *Epidemiol. Infect.* **101**, 259-266. doi: 10.1017/s0950268800054170
- WILSON, D. J., GABRIEL, E., LEATHERBARROW, A. J. H.; CHEESBROUGH, J., GEE, S., BOLTON, E. et al. (2008): Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genet.* **4**, 1-8. doi: 10.1371/journal.pgen.1000203
- WORLD HEALTH ORGANISATION (2020): Zoonoses; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>, zuletzt geprüft am 06.09.2021.

Rechtsnormen

RICHTLINIE 2006/7/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 15. Februar 2006 über die Qualität der Badegewässer und deren Bewirtschaftung und zur Aufhebung der Richtlinie 76/160/EWG.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verunreinigung des Grundwassers durch landwirtschaftliche Aktivitäten

Abbildung 2: Probenentnahmestelle Faaker See

Abbildung 3: Probenentnahmestelle Millstätter See

Abbildung 4: Probenentnahmestelle Ossiacher See

Abbildung 5: Probenentnahmestelle Weissensee

Abbildung 6: Probenentnahmestelle Wörthersee

Abbildung 7: Probenentnahmestelle Altaussee See

Abbildung 8: Probenentnahmestelle Grundlsee

Abbildung 9: Probenentnahmestelle Ödensee

Abbildung 10: Probenentnahmestelle Teichalmsee

Abbildung 11: Probenentnahmestelle Toplitzsee

Abbildung 12: Wassergeflügel am Badestrand Millstätter See

Abbildung 13: Wassergeflügel am Badestrand Weissensee

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Reaktionskomponenten

Tabelle 2: pH-Werte

Tabelle 3: Phagen Teichalmsee

Tabelle 4: Phagen Ödensee und Wörthersee

Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis Antibiotika

Tabelle 6: Ergebnisse Agardiffusionstest