

# Microbial Source Tracking – ein neuer Ansatz, um fäkale Eintragsquellen zu identifizieren

Der Nachweis von Indikatorbakterien wie z. B. *E. coli* zeigt zwar eine **fäkale Belastung im Gewässer an**, erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf den Ursprung dieser Belastung. Mithilfe sogenannter **Microbial-Source-Tracking-Methoden (MST)** ist es möglich, der **Herkunft solcher Verunreinigungen auf die Spur zu kommen**. Der Beitrag erläutert die Funktionsweise dieser Methoden und stellt anhand von ausgewählten Einzugsgebieten dar, welche Erfahrungen damit gemacht werden konnten.

von: Claudia Stange & Prof. Dr. Andreas Tiehm (beide: TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser)

Die **Wasserqualität** von Seen, Flüssen, Grundwässern und anderen Wasserkörpern kann durch fäkale Kontaminationen beeinträchtigt werden; mögliche Kontaminationsquellen sind wildelebende und domestizierte Tiere sowie häusliches Abwasser. Die derzeitige Überwachung der mikrobiologischen Wasserqualität beruht auf dem Nachweis von Indikatorbakterien. Fäkalindikatorbakterien werden von Menschen und Tieren (Warmblütern) in hohen Konzentrationen ausgeschieden und überleben in aquatischen Systemen, abhängig von den Umweltbedingungen, eine bestimmte Zeit (Tage bis Monate). Als verlässliche Indikatoren für fäkale Verunreinigungen im Rohwasser haben sich insbesondere *E. coli* und intestinale Enterokokken bewährt.

Die klassischen mikrobiologischen Methoden erlauben es zwar, den fäkalen Einfluss auf das Wasser nachzuweisen, geben jedoch keinen Aufschluss über die Herkunft dieser Kontami-

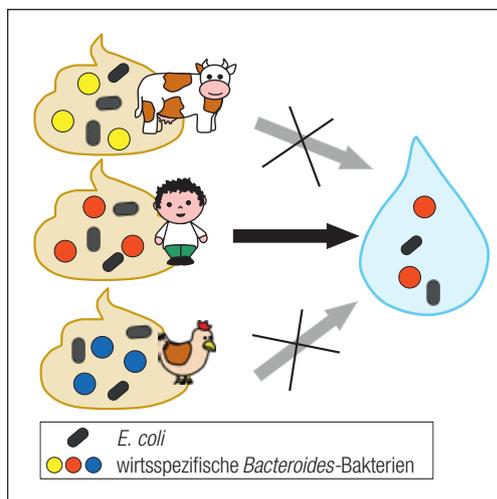
nation, d. h., ob diese menschlichen oder tierischen Ursprungs sind. Detaillierte Informationen über die fäkalen Verunreinigungsquellen sind für Managementstrategien gleichwohl von entscheidender Bedeutung. Neue und vorwiegend molekularbiologische Methoden (**Abb. 1**) haben in diesem Zusammenhang das Potenzial, die Herkunft von Fäkalieinträgen möglichen Quellen zuzuordnen [1, 2].

## Methoden

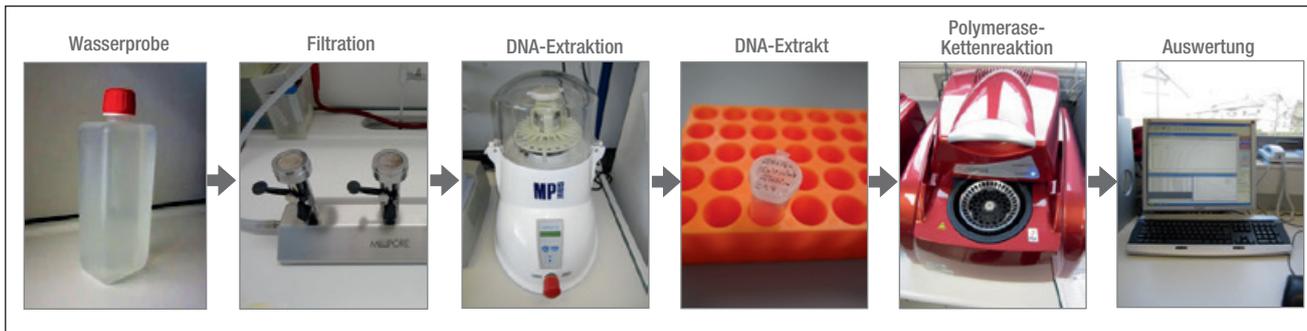
Zum Zwecke des sogenannten „Microbial Source Tracking“ (MST) werden verschiedene mikro- bzw. molekularbiologische Untersuchungsmethoden angewendet. Man unterscheidet diese „Source Tracking“-Verfahren in datenbankabhängige und datenbankunabhängige Methoden [1]. Die datenbankabhängigen Methoden basieren meist auf der Kultivierung von fäkalen Bakterien und dem Nachweis phänotypischer bzw. biochemischer oder genotypischer bzw. molekularer Eigenschaften einzelner Isolate. Die entstandenen „Muster“ werden dann mit Datenbanken verglichen.

Die neueren datenbankunabhängigen Methoden sind bis auf einzelne Ausnahmen auch kulturunabhängige Methoden. Diese Verfahren beruhen auf dem molekularen Nachweis von wirtsspezifischen genetischen Markern. Dabei werden Umweltproben auf definierte bakterielle DNA-Abschnitte hin untersucht, die speziell nur aus menschlichem oder tierischem Kot stammen. Die gesuchten DNA-Abschnitte können dann mittels Real-Time-PCR-Analytik quantifiziert werden. Zu den wirtsspezifischen genetischen Markern gehören u. a.:

**Abb. 1:** Prinzip des Microbial Source Trackings. Sowohl *E. coli*-Bakterien (ovale Symbole) als auch *Bacteroides*-Bakterien (runde Symbole) werden durch alle Warmblüter ausgeschieden. *Bacteroides*-Bakterien weisen eindeutige Unterschiede in ihrer genetischen Information auf (dargestellt durch die unterschiedlichen Farben), die eine Herkunftsbestimmung von fäkalen Einträgen in Gewässer ermöglichen.



Quelle: TZW



Quelle: TZW

Abb. 2: Schematischer Ablauf der molekularbiologischen Analytik

- spezifische Gene von anaeroben Bakterien, insbesondere *Bacteroidales* und *Bifidobakterien*,
- Sequenzen von fäkalen Viren wie z. B. humane Adenoviren, Enteroviren, Polyomaviren sowie Adenoviren oder Enteroviren vom Rind,
- Toxin- bzw. Virulenzgene sowie
- Antibiotika-Resistenzgene.

vorangetrieben. Wichtige Vorteile dieser Methoden sind:

- Es sind keine Kultivierungsschritte notwendig.

- Der molekularbiologische Nachweis kann sehr schnell erfolgen (innerhalb eines Arbeitstages).
- Es wird keine große Datenbank zum Vergleich benötigt.

Alle aufgezählten Marker können mithilfe von Real-Time-PCR-Verfahren nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigt werden können. Sie stellt ein zyklisches Verfahren dar, bei dem die Anzahl der DNA-Kopien in jeder Runde verdoppelt wird. Bei Zugabe entsprechender Fluorochrome zu der PCR-Reaktion kann der Amplifikationserfolg über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen in Echtzeit ermittelt werden (Real-Time-PCR). Die Stärke der beim Amplifikationsprozess entstehenden Fluoreszenz ist dabei proportional zur gebildeten DNA-Menge. Der Einsatz der Real-Time-PCR erlaubt eine schnelle und unter Einsatz von DNA-Standards auch quantitative Analyse [3–5].

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass vor allem der molekulare Nachweis von wirtsspezifischen genetischen Markern vielversprechend ist [6], und der Einsatz dieser Methoden gewinnt zunehmend an Popularität. Zurzeit wird vor allem in den USA, aber auch in Australien, Spanien, Portugal und Österreich die Entwicklung der datenbankunabhängigen Verfahren

# Weniger Wartung Mehr Effizienz

## Die neue Elektrolyseanlage Chlorinsitu IIa



Chlorkonzentration  
im Produkt >9 g/l

- Einfache Verfahrensführung und geringer Wartungsaufwand
- Hohe Anlagensicherheit dank integrierter Be- und Entlüftung
- Kompakt und platzsparend
- Chloratgehalt liegt deutlich unter dem EN 901-Grenzwert

**ProMinent®**

Mehr unter [www.prominent.com/elektrolyse](http://www.prominent.com/elektrolyse)



Abb. 3: Überflutung eines Regenrückhaltebeckens

Quelle: Peter Knaus/ZV Wasserversorgung Zollernalb

- Die Proben können nach einer einfachen Aufbereitung über einen längeren Zeitraum gelagert werden.
- Die Methoden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus.
- Es ist eine Unterscheidung von humanen und tierischen Einträgen möglich. Zusätzlich können tierische Einträge noch weiter differenziert werden.

Im Rahmen von Forschungsvorhaben wurden in der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie des TZW: DVGW-Technologiezentrums Wasser verschiedene Werkzeuge zur Identifizierung von fäkalen Einträgen im Einzugsgebietsmaßstab entwickelt und auf ihre Praxistauglichkeit hin überprüft. Diese Methoden basieren zum einen auf dem Nachweis von spezifischen Sequenzen des 16S-rRNA-Gens der Bakteriengattung *Bacteroides*. Bei dieser Gattung handelt es sich um die dominierende Spezies in der Bakterienflora des Intes-

tinaltraktes von Warmblütern. Zum anderen wird das Vorkommen von somatischen Zellen über den Nachweis spezifischer mitochondrialer DNA (mtDNA) erfasst. Insgesamt wurden Methoden zur spezifischen Detektion von fäkalen Einträgen durch Menschen, Rinder (Wiederkäuer), Schweine, Hunde, Schafe, Hühner und Pferde für die Untersuchungen genutzt.

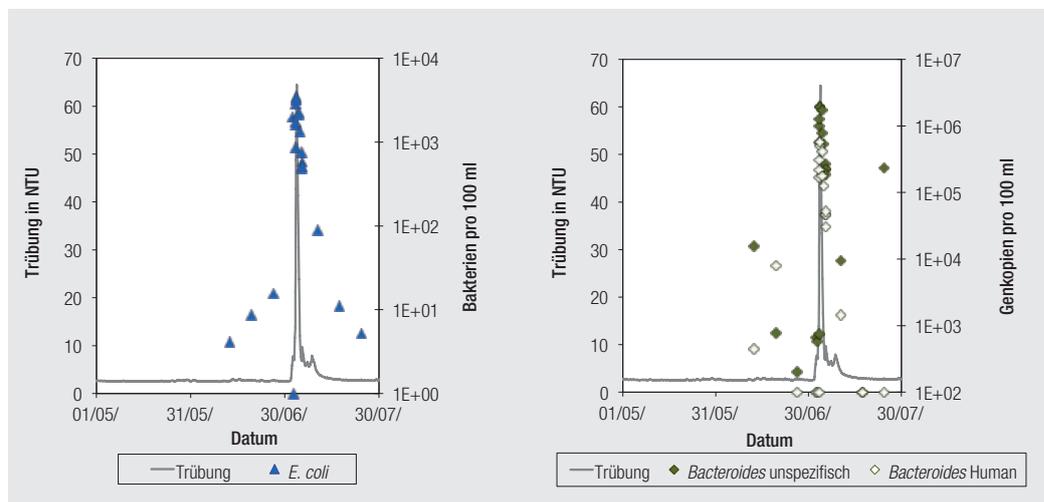
### Spezifität und Sensitivität der Methoden

Um die Spezifität (Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen) und die Sensitivität (Vermeidung von falsch-negativen Ergebnisse) der MST-Verfahren zu ermitteln, wurden Proben möglicher Kontaminationsquellen (Pferde- und Kuhdung, Hühnerkot, Fäkalien von Wildtieren, kommunales Abwasser etc.) in PCR-Analysen mit den wirtsspezifischen Primer-Systemen eingesetzt. Für die *Bacteroides*-basierten Marker lag die Sensitivität bei 85 bis 100 Prozent und die Spezifität bei 73 bis 93 Prozent, für die mtDNA wurde eine Sensitivität von 100 Prozent und eine Spezifität von > 93 Prozent ermittelt. Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass alle eingesetzten PCR-Assays eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Grundsätzlich zeichnen sich die mtDNA-basierten Marker durch eine noch höhere Spezifität und Sensitivität aus als die *Bacteroides*-basierten Marker, allerdings ist ihre Anwendung durch das relativ geringe Ausscheiden von mtDNA durch den Wirt eingeschränkt.

### Einzugsgebiet 1

Als erster Modellstandort wurde das Einzugsgebiet einer Karstquelle ausgewählt, die für die Trinkwassergewinnung genutzt wird. Die vor-

Abb. 4: Ergebnisse der Untersuchungen im Einzugsgebiet einer Karstquelle nach einem Starkregenereignis



Quelle: TZW

herrschende Form der Landnutzung im Einzugsgebiet ist Wald (55 Prozent), gefolgt von der landwirtschaftlichen Nutzung (27 Prozent) und Grünland (15 Prozent). Außerdem sind zwei Gemeinden mit zusammen ca. 4.000 Einwohnern im Einzugsgebiet (3 Prozent der gesamten Landnutzung) gelegen. Ein Regenrückhaltebecken (Regen und Abwasser) mit Überlauf befindet sich etwa 9 km von der Quelle entfernt und gehört zum kombinierten Abwasserentsorgungssystem der beiden Gemeinden im Einzugsgebiet (Abb. 3). Dieses Mischwasserbecken entwässert direkt in ein Trocken-tal. Durch ein ereignisorientiertes Monitoring an der Karstquelle wurde das Regenrückhaltebecken als wichtigste Eintragsquelle für fäkale Kontaminationen ermittelt (Abb. 4).

### Einzugsgebiet 2

Als weiteres Gebiet wurde ein Talsperren-Einzugsgebiet untersucht. Dieses Einzugsgebiet besteht zum Großteil aus Waldgebieten sowie Acker- und Grünlandwirtschaftsflächen. In der Vergangenheit wurden bereits mehrfach fäkale Verunreinigungen nachgewiesen. Proben konnten an verschiedenen Zuläufen der Stauseen entnommen werden. Insgesamt wurde eine mittlere fäkale Belastung von  $1,8 \cdot 10^2$  bis  $1,7 \cdot 10^5$  Kopien pro ml des unspezifischen *Bacteroides*-Markers ermittelt. Durch die MST-Untersuchungen wurden Hunde, Rinder und menschliches Abwasser als fäkale Eintragsquellen identifiziert.



Abb. 5: Hundekot – fäkale Eintragsquellen in städtischen Einzugsgebieten und Talsperren?

Quelle: Carolin Schweikart/TZW

### Einzugsgebiet 3

Neben den ländlich geprägten Gebieten wurde auch ein urbanes Einzugsgebiet untersucht. Dabei wurden einerseits das entsprechende Oberflächengewässer, andererseits aber auch damit assoziierte Brunnengalerien, die zur Trinkwassergewinnung genutzt werden, beprobt. Das Einzugsgebiet ist durch den Ablauf eines Klärwerks und verschiedene Mischkanal- und Regenwasserüberläufe geprägt. Darüber hinaus besteht ein Einfluss durch nicht schutzzonengerecht ausgebaute Straßen, die über keine Entwässerungsanlagen verfügen.

Insgesamt wurde für das Oberflächengewässer eine hohe fäkale Belastung mit Konzentrationen von  $1,0 \cdot 10^1$  bis  $1,6 \cdot 10^6$  Kopien pro ml des unspezifischen *Bacteroides*-Markers ermittelt.

Sowohl Menschen als auch Hunde konnten als Kontaminationsquellen identifiziert werden (Abb. 5).

Neben den Schöpfwasserproben aus dem Oberflächengewässer wurden auch Proben untersucht, die aus Brunnen stammen. Diese Uferfiltrate beinhalten je nach Witterung unterschiedliche Anteile an Fluss-/Seewasser und Grundwasser. Durch die Versickerung Richtung Brunnen wird das Oberflächenwasser teilweise gereinigt. In diesen Proben konnten entsprechend weder *E. coli*-Bakterien noch MST-Marker nachgewiesen werden.

### Fazit

Der Schutz der Wassereinzugsgebiete ist eine wesentliche Voraussetzung für eine sichere und qualitativ hochwertige



Die SHT, Sanitär- und Heizungstechnik Ausgabe 4-2019, enthält Beiträge zu den Themen Sanitär-, Heizungs- sowie Lüftungstechnik und stellt Referenzobjekte sowie neue Produkte und Normen aus diesen Bereichen vor. Lesen Sie darüber hinaus u.a. mehr zu den Themen:

- **Kindertagesstätte**  
Sanitärausstattung: Waschtischrondelle für Kinder
- **Planung**  
Fußbodenheizung: System- und Kostenvergleich
- **ISH Gesehen**  
Rückschau: Highlights und neue Produkte (Teil 1)

Weitere Nachrichten, Termine und Informationen unter [www.sht-online.de](http://www.sht-online.de).  
Kostenloses Probeheft unter [vertrieb@krammerag.de](mailto:vertrieb@krammerag.de).

**Tabelle 1: Stärke der fäkalen Belastung der unterschiedlichen Einzugsgebiete, ermittelt über *Bacteroides*-Marker (+++ stark beeinflusst, ++ beeinflusst, + schwach beeinflusst, - nicht beeinflusst, n. a. = nicht analysiert)**

	unspezifischer Nachweis von <i>Bacteroides</i>	spezifischer Nachweis			
		Mensch	Hund	Wiederkäuer	Schwein
Einzugsgebiet 1	+++	+++	n. a.	-	n. a.
Einzugsgebiet 2	++	+	+	++	-
Einzugsgebiet 3	+++	++	+	-	-

Quelle: TZW

ge Trinkwasserversorgung. Je geringer die genutzten Gewässer belastet sind, desto sicherer ist der Betrieb der Anlagen zur Gewinnung und Aufbereitung. Auch bei Badegewässern stellen mikrobielle Kontaminationen ein Gesundheitsrisiko für den Menschen dar.

Um effiziente und gleichzeitig kostengünstige Maßnahmen zur Verbesserung der mikrobiologischen Wasserqualität und zur Reduzierung gesundheitlicher Risiken umsetzen zu können, müssen sowohl die Herkunft als auch das Ausmaß fäkaler Verunreinigungen bestimmt werden. Je mehr Information über das Einzugsgebiet sowie die fäkalen Verunreinigungen vorliegt, um so gezielter können administrative oder technische Maßnahmen ergriffen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass mit den vorgestellten Microbial-Source-Tracking-Verfahren spezifische Werkzeuge für die Identifizierung von fäkalen Einträgen im Einzugsgebietsmaßstab zur Verfügung stehen.

Die quantitativen PCR-Methoden ermöglichen es, fäkale Einträge auch in komplexen Einzugsgebieten eindeutig zu identifizieren. Die entwickelten Analyseverfahren stehen nun für die Untersuchung von weiteren Einzugsgebieten zur Verfügung. Durch die Erfassung von MST-Markern ist es nun möglich, Aussagen über das Auftreten und die Stärke von spezifischen fäkalen Belastungen in unterschiedlichen Einzugsgebieten treffen zu können (Tab. 1). Kontaminationsquellen wurden identifiziert und Vorschläge für gezielte Managementmaßnahmen im Einzugsgebiet abgeleitet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse sowohl die Praxistauglichkeit als auch das Potenzial der molekularbiologischen Microbial-Source-Tracking-Methoden.

**Danksagung**

Die Forschungsvorhaben wurden durch den DVGW (Projekt „MicSource“, Förder-Nr. W 07-02-14, vormals W 201423) und das Bundesmi-

nisterium für Bildung und Forschung (Projekt „AGRO“, 02WRS1277C, Fördermaßnahme „Nachhaltiges Wassermanagement – Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“) finanziell gefördert. Die Autoren danken den beteiligten Wasserversorgern für die Bereitstellung von Wasserproben, Informationen und die gute Zusammenarbeit. ■

**Literatur**

- [1] Hagedorn, C., Blanch, A. R., Harwood, V. J. (2011): Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies.
- [2] Harwood, V. J., Staley, B. C., Badgley, B. D., Borges K., Korajkic A. (2014): Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 38 (1): 11–40.
- [3] Preuß, G., Tiehm, A. (2012): Mikrobiologische Methoden, in: Grundwasserbiologie – Grundlagen und Anwendungen, DVGW-Information Wasser Nr. 75.
- [4] Otto, J., Jurzik, L., Schneider, M., Stange, C., Hamza Ewess, I., Preuß, G., Tiehm, A. (2015): Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygiene relevanten Bakterien und Viren im Wasser, in: DVGW energie | wasser-praxis, Heft 10/2015, 58–62.
- [5] Stange, C., Yin, D., Xu, T., Guo, X., Schäfer, C., Tiehm, A. (2019): Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. Science of the Total Environment 655: 337–346.
- [6] Stange, C., Tiehm, A. (2014): Molekularbiologische Identifizierung fäkaler Eintragsquellen in einem Karst-Einzugsgebiet. Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, ISSN 1434-5765, Band 65: 35–50.

**Die Autoren**

**Dipl.-Ing. (FH) Claudia Stange** ist wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

**Prof. Dr. Andreas Tiehm** ist Leiter der Abteilung Mikrobiologie und Molekularbiologie am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Kontakt:  
 Claudia Stange  
 TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser  
 Karlsruher Str. 84, 76139 Karlsruhe  
 Tel.: 0721 9678-134  
 E-Mail: Claudia.Stange@tzw.de  
 Internet: www.tzw.de