

**Untersuchungen zur Vermehrung der coliformen Bakterien  
*Enterobacter* und *Lelliottia* in Trinkwassertalsperren**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

**Dissertation**

von

**M.Sc. Carolin Leister**

**1. Referent:** Prof. Dr. Johannes Gescher

**2. Referent:** Prof. Dr. Harald Horn

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13.12.2021

# Eidesstaatliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 13 Absatz 2 Ziffer 3 der Promotionsordnung des Karlsruher Instituts für Technologie für die KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften:

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

## **Untersuchungen zur Vermehrung der coliformen Bakterien *Enterobacter* und *Lelliottia* in Trinkwassertalsperren**

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

# Danksagung

Diese Arbeit entstand von 2018 bis 2021 am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in der Abteilung Wassermikrobiologie und wurde durch den Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches (DVGW-Förderungsnr. W 201720 und W 201823) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF-Förderungsnr. 02WGR1426A-G, Projekt TRUST) gefördert. In dieser Zeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt, denen ich danken möchte:

- ... dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfaches und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Projekts.
- ... Prof. Dr. Andreas Tiehm und Dr. Beate Hamsch für die Möglichkeit, meine Dissertation am TZW Karlsruhe schreiben zu können.
- ... Johannes Gescher für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation.
- ... Michael Hügler für die Betreuung von Seiten des TZW. Danke für deine fachliche, sowie persönliche Unterstützung, die Gespräche, Motivation, Ideen und deine Zeit. Danke, dass ich so viel von dir lernen durfte!
- ... Andreas Korth und Heike Petzoldt, sowie der gesamten Projektbegleitgruppe für die konstruktiven Rückmeldungen in zahlreichen Besprechungen, sowie bei der Erstellung des Abschlussberichtes. Danke dir, Heike, für den regen Austausch in diesen (fast) vier Jahren.
- ... Gabriele Packroff (Wahnbachtalsperrenverband), Marion Pulte (Wasserverband Siegen-Wittgenstein), Kathleen Seipel (Fernwasserversorgung Elbaue-Ostharz GmbH), Tilo Hegewald (Landestalsperrenverwaltung Sachsen), Margret Wuttig und Gerhard Biber (Zweckverband Wasserversorgung Kleine Kinzig) für das Bereitstellen von Proben und Daten aus den einzelnen Talsperren. Margret und Gerhard, euch danke ich sehr für die offene und freundliche Atmosphäre. Es war immer wie Urlaub, wenn ich bei euch im Schwarzwald Proben nehmen durfte.
- ... meinen Studenten Felix Schwab, Anne Hesselschwerdt und Veronica Sykora, die durch ihre Abschlussarbeit an den Projekten mitgewirkt haben. Vielen Dank für eure Arbeit und Ideen, durch die ihr die Projekte vorangebracht habt.
- ... den Kollegen aus der Abteilung Wassermikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima, eure stete Hilfsbereitschaft, die spaßigen Stammtische und die täglichen Kaffeepausen. Mein besonderer Dank gilt Monika Bösl, Lydia Grabner, Luisa Kurcz und Carolin Schweikart, für eure Hilfe bei der Identifizierung von über 10.000 Isolaten coliformer Bakterien und dem Ausschneiden stapelweiser Colilert-Packungen. Danke für die schöne Zeit mit euch!
- ... meiner Familie und Freunden. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich nicht vergessen lasst, worauf es im Leben ankommt. Allen voran meinen Eltern: Ihr habt mich meinen Weg stets selbst wählen lassen und habt mich immer dabei unterstützt. Dafür bin ich euch von Herzen dankbar!
- ... meinem Ehemann Robin. Ohne dich wäre ich diesen Weg vielleicht nie gegangen. Du hast mich stets motiviert und inspiriert. Danke für alles!

# Bisherige Veröffentlichungen

Hinweis: Im Laufe der Arbeit erfolgte eine Namensänderung von C. Reitter zu C. Leister.

## Veröffentlichungen

**Leister, C.; Petzoldt, H.; Rybicki, M.; Wagner, M.; Korth, A.; Hügler, M. (2021):** Massenentwicklung coliformer Bakterien in Talsperren – Ursachenanalyse und Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. Abschlussbericht zum DVGW-Forschungsprojekt W 201720. In: Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser ISSN 1434-5765, Band 97.

**Reitter, C.; Petzoldt, H.; Korth, A.; Schwab, F.; Stange, C.; Hamsch, B.; Tiehm, A.; Lagkouvardos, I.; Gescher, J.; Hügler, M. (2021):** Seasonal dynamics in the number and composition of coliform bacteria in drinking water reservoirs. In: Sci. Total Environ. 787: 147539. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147539.

**Reitter, C.; Neuhaus, K.; Hügler, M. (2021):** Draft genome sequences of *Enterobacter* spp., *Lelliottia* spp., and *Serratia* spp., coliform bacteria from drinking water reservoirs and lakes. Microbiol Resour Announc 10:e00622-21. doi: 10.1128/MRA.00622-21.

**Hügler, M.; Reitter, C.; Hamsch, B.; Tiehm, A. (2019):** Schnelle Identifizierung von Bakterien. Einsatz der molekularbiologischen Methoden DNA-Sequenzierung und MALDI-TOF MS. In: Sonderpublikation zum 13. Langenauer Wasserforum: 38–40.

## Konferenzbeiträge

**Reitter, C.; Hügler, M. (2021):** Neue Erkenntnisse zur Vermehrung von coliformen Bakterien in Trinkwassertalsperren. In: Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA) (Hg.): Tagungsband. Spurenstoffe und Krankheitserreger im Wasserkreislauf (SUK). Online-Event, 19.-20. April 2021.

**Reitter, C.; Hesselschwerdt, A.; Petzoldt, H.; Gescher, J.; Hügler, M. (2020):** Seasonal differences of coliform bacteria in drinking water reservoirs. In: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM) und Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (Hg.): Abstractbook. 6th Joint Conference of DGHM & VAAM. Leipzig, 8. -11. März 2020.

**Reitter, C.; Schwab, F.; Tiehm, A.; Gescher, J.; Hügler, M. (2020):** Comparison of RAPD-PCR and MALDI-TOF MS for typing and identification of coliform bacteria. In: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM) und Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) (Hg.): Abstractbook. 6th Joint Conference of DGHM & VAAM. Leipzig, 8.-11. März 2020.

**Hügler, M.; Reitter, C.; Hamsch, B.; Tiehm, A. (2019):** MALDI-TOF MS identification of microbial contaminations in drinking water systems. In: International Water Association (IWA) (Hg.): Abstractbook. 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM). Wien, Österreich, 15.-20. September 2019: 151.

**Hügler, M.; Reitter, C.; Petzoldt, H.; Korth, A. (2019):** Proliferation of coliform bacteria in drinking water reservoirs, dams and lakes. In: International Water Association (IWA) (Hg.): Abstractbook. 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM). Wien, Österreich, 15.-20. September 2019: 131.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Bisherige Veröffentlichungen .....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	X
Zusammenfassung .....	XII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivation .....	1
1.2 Trinkwassertalsperren .....	2
1.2.1 Limnologie von Talsperren .....	2
1.2.1.1 Temperatur und Sauerstoff .....	2
1.2.1.2 Phytoplankton .....	3
1.2.1.3 Stickstoff .....	4
1.2.1.4 Phosphat .....	5
1.2.1.5 Klimabedingte Veränderungen .....	5
1.2.2 Eintrag von Verunreinigungen in Oberflächengewässer .....	6
1.2.3 Aufbereitung von Trinkwasser .....	6
1.3 Untersuchung von Trinkwasser .....	7
1.4 Coliforme Bakterien .....	8
1.4.1 <i>Enterobacter</i> .....	11
1.4.2 <i>Lelliottia</i> .....	12
1.4.3 <i>Serratia</i> .....	12
1.4.4 Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien .....	13
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Material .....	16
2.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.2 Primer .....	16
2.1.3 Stämme .....	17
2.2 Medien und Puffer .....	18
2.2.1 Chromocult®-Coliformen-Agar (CCA) .....	18
2.2.2 Galle-Äsculin-Azid-Agar (GÄA-Agar) .....	19
2.2.3 Hirn-Herz-Agar (HH-Agar) .....	19
2.2.4 Mueller-Hinton-Agar (MH-Agar) .....	20
2.2.5 Nähragar nach dem Deutschen Einheitsverfahren (DEV-Agar) .....	20
2.2.6 Reasoner's 2A-Agar (R2A-Agar) .....	21
2.2.7 Slanetz + Bartley-Agar (S+B-Agar) .....	21
2.2.8 Waschpuffer .....	21
2.3 Untersuchungsprogramm .....	22
2.3.1 Untersuchte Trinkwassertalsperren .....	22
2.3.2 Talsperrenmonitoring in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig .....	23
2.3.3 Probenahmekampagne an der Talsperre Klingenberg .....	24
2.3.4 Beprobung der mikrobiellen Gemeinschaft und Fäkalmarker .....	24
2.3.5 Beprobung von anderen Wasserproben .....	25
2.3.6 Beprobung im Wasserwerk .....	26

2.4	Mikrobiologische Methoden .....	27
2.4.1	Membranfiltration .....	27
2.4.1.1	Nachweis von Enterokokken nach der DIN EN ISO 7899-2 (2000)...	27
2.4.1.2	Nachweis von coliformen Bakterien und <i>E. coli</i> nach der DIN EN ISO 9308-1 (2017).....	28
2.4.2	MPN-Methode – Nachweis von coliformen Bakterien und <i>E. coli</i> mit Colilert®-18/Quanti-Tray® nach der DIN EN ISO 9308-2 (2014) .....	28
2.4.3	Gussplattenverfahren – Koloniezahlbestimmung.....	29
2.4.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl .....	30
2.4.5	Stammhaltung .....	30
2.5	MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Typisierung und Identifizierung.....	30
2.5.1	Messung von Isolaten .....	30
2.5.2	Erstellung von Datenbankeinträgen.....	31
2.5.3	Auswertung der Ergebnisse .....	32
2.6	Molekularbiologische Methoden zur Typisierung und Identifizierung.....	33
2.6.1	DNA-Extraktion .....	33
2.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	33
2.6.2.1	MLSA-PCR.....	33
2.6.2.2	RAPD-PCR .....	34
2.6.3	Analytische Trennmethode von PCR-Produkten .....	34
2.6.4	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	35
2.6.5	Sanger-Sequenzierung .....	35
2.6.6	Bioinformatische Analyse .....	35
2.7	Mikrobielle Gemeinschaft und Microbial Source Tracking (MST) .....	36
2.7.1	DNA-Extraktion .....	36
2.7.2	Quantifizierung von Microbial Source Tracking (MST) Markern.....	36
2.7.3	Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft .....	36
2.8	Whole genome sequencing (WGS).....	37
2.8.1	DNA-Extraktion .....	37
2.8.2	Sequenzierung, Assemblierung und Annotation .....	37
2.8.3	Phylogenetische Untersuchung.....	37
2.8.4	Berechnung der durchschnittliche Nukleotididentität (ANI) .....	37
2.8.5	Untersuchung der Stoffwechselwege .....	37
2.8.6	Untersuchung von Antibiotikaresistenzgenen.....	38
2.8.7	Vergleich mit anderen Stämmen .....	38
2.9	Untersuchung der Antibiotikaresistenz.....	38
2.10	Statistische Datenanalyse.....	39
2.11	Berechnung der Diversität .....	40
2.12	Laborversuche zur Vermehrung coliformer Bakterien .....	40
2.12.1	Vorversuche zur Temperaturabhängigkeit .....	40
2.12.2	Vermehrungsversuche.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	Methodenvergleich zur Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien..	43
3.1.1	Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS .....	43
3.1.2	Typisierung mittels RAPD .....	45
3.1.3	Identifizierung mittels MLSA und Genomsequenzierung .....	46
3.1.4	Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS und R nach der Datenbankerweiterung.....	47

3.2	Mikrobiologisches Monitoring in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig ....	50
3.2.1	Mikrobiologische Parameter .....	50
3.2.2	Identifizierung coliformer Bakterien .....	54
3.2.3	Probenahmekampagne in der Talsperre Klingenberg.....	56
3.2.4	Microbial Source Tracking (MST) .....	57
3.2.5	Mikrobielle Gemeinschaft .....	58
3.3	Identifizierung coliformer Bakterien in weiteren Talsperren .....	60
3.4	Identifizierung coliformer Bakterien in anderen Wasserproben .....	62
3.5	Monitoring im Wasserwerk.....	64
3.5.1	Wasserwerk 1 (W1).....	64
3.5.2	Wasserwerk 2 (W2).....	66
3.5.3	Wasserwerk 3 (W3).....	67
3.5.4	Wasserwerk 4 (W4).....	68
3.5.5	Zusammenfassung Untersuchungen Wasserwerke .....	69
3.6	Statistische Datenanalyse zur Ursachenuntersuchung .....	70
3.6.1	Mikrobiologische Daten .....	70
3.6.2	Meteorologische Daten .....	73
3.6.3	Physikochemische Daten .....	74
3.6.3.1	Wassertemperatur .....	75
3.6.3.2	Sauerstoffsättigung .....	76
3.6.3.3	pH-Wert.....	78
3.6.4	Korrelationsanalyse und Hauptkomponentenanalyse (PCA) .....	79
3.6.4.1	Klingenberg Talsperre (R1) .....	79
3.6.4.2	Kleine Kinzig Talsperre (R2).....	81
3.6.4.3	Wahnbach Talsperre (R3) .....	83
3.6.4.4	Breitenbach Talsperre (R4) .....	85
3.6.4.5	Rappbode Talsperre (R5).....	87
3.6.4.6	Zusammenfassung Korrelationsanalyse .....	89
3.6.5	Redundanzanalyse (RDA).....	90
3.7	Laborversuche zur Vermehrung coliformer Bakterien .....	92
3.7.1	Einfluss der Wasserqualität auf die Vermehrung.....	92
3.7.2	Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung .....	94
3.7.3	Einfluss von Sauerstoff auf die Vermehrung.....	96
3.7.4	Einfluss von Nährstoffen auf die Vermehrung .....	97
3.8	Gesamtgenomanalyse .....	99
3.8.1	Genomsequenzierung von coliformen Bakterien aus Talsperren und Seen..	99
3.8.2	Taxonomische Analyse .....	101
3.8.3	Stoffwechselwege von <i>Enterobacter</i> spp. und <i>Lelliottia</i> spp. ....	103
3.8.3.1	Zentraler Kohlenstoff-Kreislauf .....	104
3.8.3.2	Aminosäuren .....	105
3.8.3.3	Stickstoffkreislauf .....	106
3.8.3.4	Phosphatstoffwechsel.....	106
3.8.3.5	Schwefelkreislauf .....	107
3.8.3.6	Eisen- und Manganstoffwechsel.....	107
3.8.3.7	Transporter und Signaltransduktion.....	108
3.8.4	Temperaturadaption .....	108
3.8.5	Kollektives Verhalten und Motilität.....	109
3.8.5.1	Motilität und Flagellen.....	109

3.8.5.2 Chemotaxis .....	109
3.8.5.3 Quorum sensing .....	110
3.8.5.4 Bildung von Biofilmen .....	110
3.8.6 Hygienische Relevanz.....	111
3.8.6.1 Pathogenitätsfaktoren.....	111
3.8.6.2 Antibiotikaresistenzgene.....	113
3.8.6.3 Antibiotikaresistenz .....	115
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>116</b>
4.1 Methodenvergleich zur Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien	116
4.2 Mikrobiologisches Monitoring.....	118
4.2.1 <i>Enterobacter asburiae</i> und <i>Lelliottia</i> spp. dominieren während der Massenvermehrung .....	118
4.2.2 <i>Frankiales</i> und <i>Burkholderiales</i> dominieren die mikrobielle Gemeinschaft..	119
4.2.3 Massenvermehrung als autochthoner Prozess in der Talsperre .....	120
4.3 Ursachen und Lebensraumanpassungen .....	122
4.3.1 Massenvermehrung beginnt im Epi-/Metalimnion zum Zeitpunkt der Sommerstagnation.....	122
4.3.2 Anpassungen an den oligotrophen Lebensraum Talsperre .....	123
4.3.3 Zusammenhang mit dem Absterben des Phytoplanktons.....	124
4.3.4 Kollektives Verhalten und Motilität als Hilfsmittel der raschen Vermehrung	126
4.3.5 Entwicklung einer Modellvorstellung.....	127
4.4 Bewertung der hygienischen Relevanz .....	129
4.4.1 Pathogenitätsfaktoren .....	129
4.4.2 Antibiotikaresistenz .....	130
4.5 Konsequenzen für die Wasserversorgung .....	132
4.6 Ausblick .....	133
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>161</b>



# Abkürzungsverzeichnis

<b>AHL</b>	<i>acyl-homoserine lactone</i>
<b>ANI</b>	<i>average nucleotide identity</i>
<b>CARD</b>	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
<b>CCA</b>	Chromocult®-Coliformen-Agar
<b>CRE</b>	Carbapenem-resistente <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>DEV</b>	Deutsche Einheitsverfahren
<b>DOM</b>	<i>dissolved organic matter</i>
<b>EPS</b>	Exopolysaccharide
<b>ESBL</b>	<i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-Lactamasen</i>
<b>FIB</b>	Fäkalindikatorbakterien
<b>GÄA</b>	Galle-Äsculin-Azid
<b>HH</b>	Hirn-Herz
<b>HNA</b>	<i>high nucleic acid</i>
<b>HPC</b>	<i>heterotrophic plate count</i>
<b>KBE</b>	Kolonie-bildende Einheit
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>LNA</b>	<i>low nucleic acid</i>
<b>LOQ</b>	<i>limit of quantification</i>
<b>MALDI-TOF MS</b>	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry</i>
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>MLSA</b>	<i>multilocus sequence analysis</i>
<b>MPN</b>	<i>most probable number</i>
<b>MST</b>	<i>Microbial Source Tracking</i>
<b>NMDS</b>	<i>nonparametric multidimensional scaling</i>
<b>OTU</b>	<i>operational taxonomic units</i>
<b>PCA</b>	<i>principal component analysis</i>
<b>R2A</b>	Reasoner's 2A
<b>RAPD</b>	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
<b>RASTtk</b>	<i>Rapid Annotations using Subsystems Technology tool kit</i>
<b>RDA</b>	<i>redundancy analysis</i>
<b>S+B</b>	Slanetz + Bartley
<b>SAK</b>	Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm
<b>TCC</b>	<i>total cell count</i>
<b>TOC</b>	<i>total organic carbon</i>
<b>TSC</b>	<i>two component systems</i>
<b>WGS</b>	<i>whole genome sequencing</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Limnologie einer Talsperre. ....	3
Abbildung 1.2	Aquatischer Stickstoffkreislauf. ....	4
Abbildung 1.3	Aufbereitung am Beispiel der Trinkwassertalsperre Kleine Kinzig. ....	7
Abbildung 2.1	Im Rahmen der Datenanalyse untersuchte Trinkwassertalsperren. ....	22
Abbildung 2.2	Übersicht über die Talsperre Kleine Kinzig mit Entnahmeturm. ....	24
Abbildung 2.3	Aufbau der Anreicherungsapparatur. ....	26
Abbildung 3.1	Dendrogramm der MALDI-TOF Spektren. ....	44
Abbildung 3.2	Typisierung der Isolate coliformer Bakterien mittels RAPD. ....	45
Abbildung 3.3	Dendrogramm der MALDI-TOF Spektren nach der Datenbankerweiterung. ....	48
Abbildung 3.4	Clusteranalyse der MALDI-TOF Spektren der Gattung <i>Enterobacter</i> . ....	49
Abbildung 3.5	Clusteranalyse der MALDI-TOF Spektren der Gattung <i>Lelliottia</i> . ....	49
Abbildung 3.6	Mikrobiologische Parameter in der Talsperre Klingenberg, sowie Kleine Kinzig von 2018 bis 2019. ....	50
Abbildung 3.7	Konzentration coliformer Bakterien im Tiefenschnitt der Talsperre Klingenberg von 2018 bis 2019. ....	52
Abbildung 3.8	Unterschiede der mikrobiologischen Parameter zwischen der Talsperre Klingenberg und ihrem Zufluss. ....	53
Abbildung 3.9	Konzentration und Identifizierung coliformer Bakterien in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig von 2018 bis 2019. ....	55
Abbildung 3.10	Probenahmekampagne an der Talsperre Klingenberg. ....	56
Abbildung 3.11	Mikrobielle Gemeinschaft in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig. ....	59
Abbildung 3.12	Phylogenetische Analyse der isolierten Stämme mittels MLSA. ....	61
Abbildung 3.13	Konzentration coliformer Bakterien und <i>E. coli</i> in Abwasser, Flusswasser, Seewasser und Trinkwasser. ....	62
Abbildung 3.14	Identifizierung coliformer Bakterien in Abwasser, Flusswasser, Seewasser und Trinkwasser. ....	63
Abbildung 3.15	Monitoring coliformer Bakterien in W1. ....	64
Abbildung 3.16	Monitoring coliformer Bakterien in W2. ....	66
Abbildung 3.17	Monitoring coliformer Bakterien in W3. ....	67
Abbildung 3.18	Monitoring coliformer Bakterien in W4. ....	68
Abbildung 3.19	Mikrobiologischer Parameter im Rohwasser der fünf Talsperren. ....	71
Abbildung 3.20	Unterschiede der mikrobiologischen Parameter zu Zeitpunkten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien. ....	72
Abbildung 3.21	Ergebnisse der meteorologischen Messungen. ....	73
Abbildung 3.22	Tiefenschnitt der Wassertemperatur in den fünf untersuchten Talsperren. ....	75
Abbildung 3.23	Tiefenschnitt der Sauerstoffsättigung in den fünf untersuchten Talsperren. ....	77
Abbildung 3.24	Tiefenschnitt des pH-Wertes in den fünf untersuchten Talsperren. ....	78
Abbildung 3.25	Regressionsanalyse der Daten der Talsperre Klingenberg (R1). ....	79
Abbildung 3.26	Hauptkomponentenanalyse der Daten der Talsperre Klingenberg (R1). ....	80
Abbildung 3.27	Regressionsanalyse der Daten der Talsperre Kleine Kinzig (R2). ....	81
Abbildung 3.28	Hauptkomponentenanalyse der Daten der Talsperre Kleine Kinzig (R2). ....	82
Abbildung 3.29	Regressionsanalyse der Daten der Wahnbach Talsperre (R3). ....	83
Abbildung 3.30	Hauptkomponentenanalyse der Daten der Wahnbach Talsperre (R3). ....	84

Abbildung 3.31	Regressionsanalyse der Daten der Breitenbach Talsperre (R4). ....	85
Abbildung 3.32	Hauptkomponentenanalyse der Daten der Breitenbach Talsperre (R4). ...	86
Abbildung 3.33	Regressionsanalyse der Daten der Rappbode Talsperre (R5). ....	87
Abbildung 3.34	Hauptkomponentenanalyse der Daten der Rappbode Talsperre (R5). ....	88
Abbildung 3.35	Redundanzanalyse der Daten der Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2). ....	90
Abbildung 3.36	Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose zur Untersuchung des Einflusses der Wasserqualität. ....	93
Abbildung 3.37	Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose bei unterschiedlichen Wassertemperaturen. ....	95
Abbildung 3.38	Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose unter aeroben und anaeroben Bedingungen. ....	97
Abbildung 3.39	Vermehrung coliformer Bakterien mit Mischbiozönose mit dem Zusatz von Pepton. ....	98
Abbildung 3.40	Darstellung der durchschnittlichen Nukleotididentität (ANI) zwischen den sequenzierten Talsperren-Stämmen, sowie Referenzstämmen. ....	101
Abbildung 3.41	Phylogenetische Analyse der Genome der <i>Enterobacter</i> und <i>Lelliottia</i> Stämme. ....	102
Abbildung 3.42	Funktionelle Analyse der Stoffwechselwege mit Hilfe von KEGG. ....	103
Abbildung 3.43	Überblick über die wichtigsten Stoffwechselwege in <i>Enterobacter</i> und <i>Lelliottia</i> . ....	104
Abbildung 3.44	Anzahl der Genkopien im Bereich kollektives Verhalten und Motilität. ....	109
Abbildung 3.45	Antibiotikaresistenzgene der talsperren-relevanten Stämme nach CARD. ....	113
Abbildung 4.1	Modellvorstellung zur Massenvermehrung coliformer Bakterien in Talsperren. ....	128

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Nachweis verschiedener Gattungen coliformer Bakterien abhängig vom Nachweisverfahren, nach Stevens <i>et al.</i> (2003) und UBA (2009). ....	10
Tabelle 2.1	Verwendete Chemikalien und Kits. ....	16
Tabelle 2.2	Verwendete Geräte. ....	16
Tabelle 2.3	Verwendete Primer. ....	16
Tabelle 2.4	Verwendete Stämme aus der Stammsammlung. ....	17
Tabelle 2.5	Verwendete Stämme aus der internen Sammlung. ....	17
Tabelle 2.6	Zusammensetzung des CCA. ....	19
Tabelle 2.7	Zusammensetzung des GÄA-Agars. ....	19
Tabelle 2.8	Zusammensetzung des HH-Mediums. ....	20
Tabelle 2.9	Zusammensetzung des MH-Agars. ....	20
Tabelle 2.10	Zusammensetzung des DEV-Agars. ....	20
Tabelle 2.11	Zusammensetzung des R2A-Agars. ....	21
Tabelle 2.12	Zusammensetzung des S+B-Agars. ....	21
Tabelle 2.13	Informationen über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Talsperren. ....	23
Tabelle 2.14	Überblick über die untersuchten Trink-, See-, Fluss- und Abwässer. ....	25
Tabelle 2.15	Parameter für die statistische Auswertung von MALDI-TOF Spektren mit R. ....	32
Tabelle 2.16	Pipettierschema für die MLSA-PCR. ....	33
Tabelle 2.17	Cycler-Protokoll für die MLSA-PCR. ....	33
Tabelle 2.18	Pipettierschema für die RAPD-PCR. ....	34
Tabelle 2.19	Cycler-Protokoll für die RAPD-PCR. ....	34
Tabelle 2.20	Parameter zum Erstellen eines Alignments mit dem Programm MEGA7. .	35
Tabelle 2.21	Stämme die für den Genomvergleich verwendet wurden. ....	38
Tabelle 2.22	Hemmhöfe der Antibiotika des Antibiogramms zur Erkennung resistenter Bakterien. ....	39
Tabelle 2.23	Verwendete Wässer für die Vermehrungsversuche. ....	41
Tabelle 2.24	Überblick über die durchgeführten Vermehrungsversuche. ....	42
Tabelle 3.1	Identifizierung und Typisierung mit dem MALDI-TOF. ....	43
Tabelle 3.2	Identifizierung mittels MLSA und Genomsequenzierung. ....	46
Tabelle 3.3	Identifizierung und Typisierung mit dem MALDI-TOF nach der Erweiterung der Datenbank. ....	47
Tabelle 3.4	Artenreichtum und Diversität innerhalb der Talsperrenproben zu Zeitpunkten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien. ....	54
Tabelle 3.5	Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtzellzahl (TCC), sowie Genkopien (GC) der 16S rRNA Gene und der Fäkalmarker Gene (in 1 ml), bei hohen und niedrigen Konzentrationen coliformer Bakterien. ....	57
Tabelle 3.6	Artenvielfalt und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft zu Zeiten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien. ....	58
Tabelle 3.7	Trinkwassertalsperren und Seen, in denen ebenfalls hohe Konzentrationen coliformer Bakterien detektiert werden konnte, mit Hintergrunddaten zur Probenahme, sowie maximaler Konzentration coliformer Bakterien im Jahr der Probenahme. ....	60
Tabelle 3.8	Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W1. ....	65

Tabelle 3.9	Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W2. ....	67
Tabelle 3.10	Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W3. ....	67
Tabelle 3.11	Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W4. ....	68
Tabelle 3.12	Mittelwerte der mikrobiologischen Parameter der Jahre 2018–2020, bei hohen Werten coliformer Bakterien ( $\leq 200$ MPN/100 ml) und niedrigen Werten, sowie Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-WhitneyU Test. ....	72
Tabelle 3.13	Korrelationskoeffizient nach Spearman zwischen der Konzentration coliformer Bakterien und mikrobiologischen, sowie physikalisch-chemischen Parametern im Rohwasser der jeweiligen Talsperre. ....	89
Tabelle 3.14	Wachstumsraten der Laborversuche die im Mehrfachansatz getestet wurden. ....	92
Tabelle 3.15	Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung coliformer Bakterien auf Nährmedium. ....	94
Tabelle 3.16	Im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Genome. ....	100
Tabelle 3.17	Überblick über ausgewählte Pathogenitätsfaktoren im Vergleich zwischen talsperren-relevanten Stämmen und Referenzstämmen. ....	111
Tabelle 3.18	Überblick über ausgewählte Antibiotikaresistenzgene im Vergleich zwischen talsperren-relevanten Stämmen und Referenzstämmen. ....	114
Tabelle 3.19	Ergebnisse des Antibiogramms zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz. ....	115

# Zusammenfassung

Weltweit dienen Oberflächengewässer wie Trinkwassertalsperren oder Seen als wichtige Quelle für die Trinkwassergewinnung, insbesondere in Regionen mit Wasserknappheit. Die hygienisch-mikrobiologische Wasserqualität wird anhand verschiedener Indikatorbakterien wie coliformen Bakterien, *Escherichia coli* und Enterokokken untersucht. Bei coliformen Bakterien ist die hygienische Relevanz umstritten, da sie neben Fäkalien auch in Umwelthabitaten, wie in Wasser, Pflanzen und im Boden vorkommen. In den letzten Jahren hat diese Frage zunehmend an Bedeutung gewonnen, da wiederholt hohe Konzentrationen coliformer Bakterien in Oberflächengewässern beobachtet wurden, was die Trinkwasserproduktion vor Herausforderungen stellt. Die Gründe hinter diesem Phänomen waren bislang nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurden zwei Trinkwassertalsperren (Klingenberg und Kleine Kinzig) über einen Zeitraum von zwei Jahren (2018–2019) analysiert. In den Sommermonaten wurde ein plötzlicher Anstieg der coliformen Bakterien bis zu  $2,4 \times 10^4$  Bakterien pro 100 ml festgestellt, was einem Zuwachs um 4  $\log_{10}$ -Stufen im Vergleich zum Winter entspricht. Die Diversität verringerte sich zu diesem Zeitraum auf eine bzw. zwei Arten (*Enterobacter asburiae* bzw. *Lelliottia amnigena* und *Lelliottia aquatilis*), die je nach Talsperre den gesamten Wasserkörper dominierten. Es wurden nahverwandte Stämme in unterschiedlichen Talsperren in ganz Deutschland nachgewiesen. Die mikrobielle Gemeinschaft wurde durch die extreme Zunahme coliformer Bakterien nicht signifikant beeinflusst. Es dominierten die Ordnungen *Frankiales* und *Burkholderiales*. Die Ordnung *Enterobacterales*, zu welcher die coliformen Bakterien zu rechnen sind, stellten lediglich einen Anteil von 0,04 % an der Gemeinschaft dar. Weitere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die hohen Konzentrationen coliformer Bakterien nicht auf eine fäkale Verunreinigung zurückzuführen waren, sondern es sich stattdessen um einen ein autochthonen talsperren-internen Prozess handelte.

Da die Identifizierung coliformer Bakterien nicht immer eindeutig ist, wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene Identifizierungs- und Typisierungsmethoden untereinander verglichen. Hierfür wurde die Datenbank, auf der die Identifizierung mit dem MALDI-TOF beruht, mit neuen Stämmen erweitert, woraufhin die genaue Identifizierung der Arten *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter ludwigii*, *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis* und *Lelliottia nimipressuralis* möglich war. Dies garantierte die korrekte Identifizierung der Isolate im Rahmen des Monitoringprogramms.

Während dieser Arbeit wurden zudem die Genome von 21 Isolaten coliformer Bakterien aus Talsperren und dem Bodensee sequenziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bakterien als nicht hygienisch relevant einzustufen sind. Sie enthalten keine Gene für das Typ III Sekretionssystem, sowie Cytotoxine oder Hämolsine, welche als Virulenzfaktoren gelten. Die Untersuchung der Antibiotikaresistenzgene zeigte vor allem Effluxpumpen (z. B. AcrAB, AcrAD, EmrAB, MacAB und MdtABC), zudem wurden Klasse C  $\beta$ -Lactamasen (*ampC*) in allen Genomen gefunden. Auffallend war, dass in allen *Enterobacter asburiae*-Isolaten Homologe der aus grampositiven Bakterien bekannten antimikrobiellen Peptidresistenzgene (*dltABCD*) nachgewiesen wurden, deren Funktion in gramnegativen Bakterien bislang nicht ausreichend geklärt ist. Phänotypisch konnte für *Enterobacter* eine natürliche Resistenz gegenüber Fosfomycin (45,5 %), sowie Ceftazidim (9 %) nachgewiesen werden, die für *Lelliottia* nicht vorhanden war. Zudem wurde keine Resistenz gegen Piperacillin, Imipenem, Meropenem, Cefotaxim, Ciprofloxacin, Polymyxin B, Trimethoprim und Chloramphenicol gefunden.

Laborversuche mit Isolaten coliformer Bakterien aus Talsperren zeigten, dass die Vermehrung ab einer Mindesttemperatur von 10 °C möglich war. Zudem waren die Bedingungen im Oberflächenwasser günstiger, verglichen mit dem Rohwasser. In diesen Versuchen konnte eine Vermehrung lediglich in Abwesenheit der Mischbiozönose erreicht werden. Coliforme Bakterien hatten dagegen einen Wachstumsvorteil gegenüber der Mischbiozönose, wenn Pepton – als Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden – dem Wasser zugegeben wurde. Freie, gelöste Aminosäuren sind ein natürlicher Bestandteil oligotropher Gewässer und werden beispielsweise von Algen abgegeben. Die statistische Datenanalyse aus fünf Talsperren (Klingenberg, Kleine Kinzig, Wahnbach, Rappbode, Breitenbach) zeigte, dass bei der Vermehrung Umweltfaktoren (Wassertemperatur, Sauerstoff, pH-Wert, Chlorophyll), sowie Metalle und Nährstoffe (Nitrat, Phosphat, Mangan) eine Rolle spielen, und bestätigten somit die Ergebnisse aus den Laborversuchen. Diese Faktoren deuten besonders auf den geschichteten Zustand der Talsperre zum Zeitpunkt der Vermehrung hin. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass die Massenvermehrung ab einer Wassertemperatur von 10 °C möglich ist, sobald eine geeignete Nährstoffsituation vorliegt. Es wird vermutet, dass diese während der stabilen Sommerschichtung im Epi- oder Metalimnion beginnt und sich dann rasch ausbreitet. Vermutlich sind die coliformen Bakterien den „r-Strategen“ zuzuordnen, die von Algen abgegebene organische Substanzen verwerten können und eine schnelle Vermehrungsrate aufweisen, wodurch sich das massenhafte Auftreten innerhalb kurzer Zeit begründen lässt.

*Enterobacter* und *Lelliottia* spp. sind an die oligotrophen Bedingungen einer Trinkwassertalsperre, sowie sich schnell verändernde Umgebungen angepasst, wie die Genomanalysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten. Sie enthalten Gene, die es ihnen ermöglichen, mit geringen Nitrat- und Phosphatgehalten gut umzugehen (*nrtABC*, *phoRB*, *phoA*). Darüber hinaus sind sie auch an einen niedrigen Schwefel-, sowie Eisengehalt angepasst, indem sie beispielsweise unter Sulfatmangel alternative Schwefelquellen wie Alkansulfonat (*ssuEADCB*) und Taurin (*tauABCD*) nutzen können. Die Bakterien sind in der Lage von Algen abgegebene Substanzen zu nutzen, beispielsweise Aminosäuren, Chitin, Alginat, Rhamnose und Fucose. Zudem verfügen die Bakterien über eine große Anzahl von Genen, die mit kollektivem Verhalten und Motilität verbunden sind (*cheABRVWYZ*, *expRI*).

Weiterhin wurden Untersuchungen im Wasserwerk durchgeführt, um zu testen, inwieweit die Aufbereitung diesen hohen Konzentrationen coliformer Bakterien gewachsen ist. Es wurden in allen untersuchten Wasserwerken noch coliforme Bakterien vor der Abschlussdesinfektion nachgewiesen, wobei es sich um die Arten handelte, die auch die Massenvermehrung im Rohwasser dominierten. Dennoch zeigte sich, dass die Wasseraufbereitung diese hohe Konzentration coliformer Bakterien in der Regel bewältigen kann und im Reinwasser nach Desinfektion der Grenzwert der Trinkwasserverordnung eingehalten wird (<1 MPN/100 ml). Zudem zeigten Laborexperimente, dass sich die Bakterien in behandeltem Wasser bei ausreichender Nährstoffelimination nicht vermehren konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Massenvermehrung coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren nicht um einen Fäkaleintrag, sondern stattdessen um einen talsperren-internen Prozess handelt. Die sich vermehrenden Bakterien (*Enterobacter asburiae*, *Lelliottia* spp.) sind dabei den Umweltcoliformen zuzurechnen, die keine hygienische Relevanz aufweisen, allerdings an ihren oligotrophen Lebensraum angepasst sind. Da die Vermehrung besonders in warmen, trockenen Jahren stattfand, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Phänomen in Zukunft häufiger auftreten wird.

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Wasser ist essentiell für das Leben. Es dient sowohl als Lebensraum, als auch als überlebensnotwendiges Nahrungsmittel. Daher gilt der Zugang zu sauberem Trinkwasser laut der World Health Organisation als ein Grundrecht des Menschen (WHO & UNICEF, 2000). Dennoch hatten im Jahre 2015 etwa 844 Millionen Menschen keinen Zugriff, weswegen wasserbedingte Krankheiten noch immer eine der Haupttodesursachen in Entwicklungsländern sind (UN, 2018). Diese Missstände zu bekämpfen und allen Menschen Zugang zu sauberem und sicherem Trinkwasser zu ermöglichen, stellt eines der Ziele nachhaltiger Entwicklung (SDG, engl. *Sustainable Development Goals*) dar und wurde zudem als Hauptziel der UN-Resolution 64/292 definiert. Um dies zu erreichen hat die EU die EG Trinkwasserrichtlinie erlassen, die dann in nationales Recht umgesetzt wurde (EG Trinkwasserrichtlinie, 1998). In Deutschland regelt die Trinkwasserverordnung (TrinkwV), welchen Anforderungen das Trinkwasser genügen muss. Es sollte „so beschaffen sein, dass durch seinen Genuss oder Gebrauch eine Schädigung der menschlichen Gesundheit insbesondere durch Krankheitserreger nicht zu besorgen ist. Es muss rein und genusstauglich sein“ und wird daher regelmäßig untersucht (TrinkwV, 2001).

Mögliche Kontaminationen des Trinkwassers mit Krankheitserregern gehen meist mit dem Eintrag von Fäkalien aus dem Warmblüterdarm einher (Stevens *et al.*, 2003). Mit diesen werden auch andere Bakterien eingetragen, die in der Trinkwasseruntersuchung als Indikatororganismen gelten, wie coliforme Bakterien, *Escherichia coli* und Enterokokken. Ihr Nachweis lässt Rückschlüsse auf einen fäkalen Eintrag und somit auch auf die mögliche Anwesenheit von Krankheitserregern und die damit verbundene Gesundheitsgefährdung zu, woraufhin geeignete Maßnahmen getroffen werden können. Dieses sogenannte Fäkalindikatorprinzip wird weltweit bei der mikrobiologischen Untersuchung von Trinkwasser angewendet. In der Praxis zeigte sich allerdings, dass nicht alle nachgewiesenen Indikatorbakterien unbedingt fäkalen Ursprungs sein müssen. Stattdessen können diese natürlicherweise auch in Wirbellosen, Pflanzen, Erde oder eben auch in Wasser vorkommen (Byappanahalli *et al.*, 2012; Elliott, 1969; Wiedenmann *et al.*, 1988). Bei diesen Bakterien ist die hygienische Relevanz bisher ungeklärt.

Beim Nachweis von Enterokokken und *E. coli* werden in der Regel Sofortmaßnahmen wie ein Abkochgebot und Desinfektionsmaßnahmen getroffen. Bei coliformen Bakterien ist dies laut den Leitlinien zum Vollzug von §§ 9 und 10 der TrinkwV 2001 allerdings nur notwendig, wenn ein Hinweis auf eine fäkale Belastung vorliegt (Leitlinien BGM & UBA, 2013). Für die Trinkwasseruntersuchung ist daher neben dem Auftreten dieser Bakterien auch deren Herkunft relevant. Nicht nur um im Falle eines Nachweises gezielt handeln zu können, sondern auch um Aufschluss über eine mögliche Gesundheitsgefährdung zu erhalten. Besonders im Falle des Nachweises von coliformen Bakterien herrscht jedoch aktuell bei den Behörden eine große Inkonsistenz bezüglich der Bewertung des Nachweises. So kann es zum einen zu überzogenen Maßnahmen, zum anderen aber auch zu einer möglichen Gefährdung der Bevölkerung aufgrund fehlender Maßnahmen kommen.

Diese Unsicherheit zeigte sich besonders, als es in den vergangenen Jahren immer wieder zur Detektion hoher Konzentrationen coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren und Seen kam (Davis *et al.*, 2005; Exner *et al.*, 2005; Freier *et al.*, 2005; Packroff *et al.*, 2003; Packroff & Clasen, 2005). Diese Gewässer sind von essentieller Bedeutung, insbesondere in Regionen



mit Wasserknappheit, da sie dazu dienen, Oberflächenwasser zu speichern und die Verfügbarkeit von Wasser für die Trinkwassergewinnung zu gewährleisten. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass das Rohwasser, d. h. das für die Trinkwassergewinnung genutzte Wasser, frei ist von chemischer und mikrobiologischer Verunreinigung. Die Ursachen für die hohen Konzentrationen coliformer Bakterien sind noch nicht geklärt (Exner *et al.*, 2005). Die sprunghafte Zunahme trat vor allem in den Spätsommer-Monaten auf und ging von einer Art oder einigen wenigen Arten aus. Derzeit wird angenommen, dass es einigen Arten coliformer Bakterien möglich ist, sich direkt in Oberflächengewässern wie Talsperren oder Seen zu vermehren. Ungeklärt ist, ob dies als Hinweis auf eine Verunreinigung des Trinkwassers zu sehen ist und ob diese coliformen Bakterien eine hygienische Relevanz für die Trinkwassergewinnung aufweisen.

Ziel dieser Arbeit ist es, zukünftige Befunde einordnen zu können und die aktuell vorherrschenden Probleme bei der Bewertung zu lösen. Es soll geklärt werden, was es überhaupt bedeutet, dass Bakterien aus der Umwelt in Trinkwasserspeichern nachgewiesen werden und inwieweit tatsächlich eine Gefährdung der Gesundheit vorliegt. Hiermit soll der derzeitige vorherrschende Unsicherheit, gerade in Bezug auf coliforme Bakterien, begegnet werden können.

## **1.2 Trinkwassertalsperren**

Weltweit ist Oberflächenwasser eine der Hauptquellen für die Trinkwassergewinnung, die geschätzt etwa 50 % des weltweiten Bedarfs deckt (WHO, 2016). In Deutschland werden etwa 12 % der Trinkwasserversorgung durch die Nutzung von Oberflächenwasser aus Seen und Talsperren gedeckt (Statistisches Bundesamt, 2018).

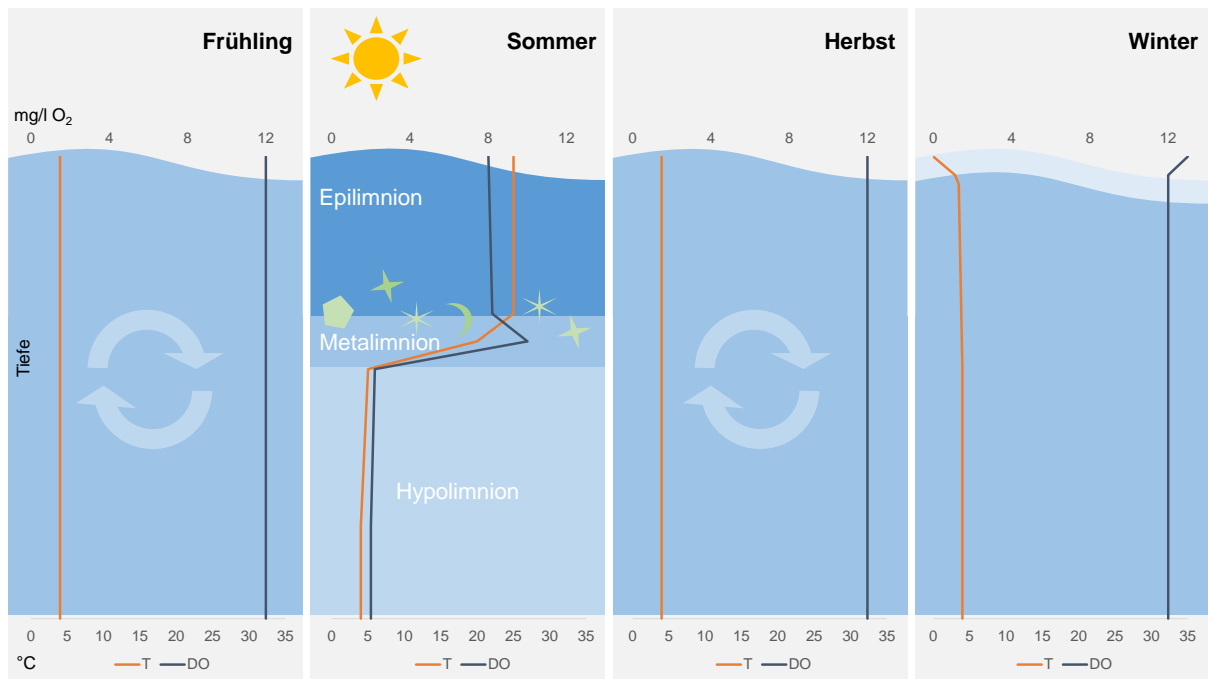
### **1.2.1 Limnologie von Talsperren**

Talsperren entstehen durch Aufstauen eines Flusses in einem Tal, sie verfügen meist über eine Vorsperre, die dazu dient den größten Schmutz zurückzuhalten. Aus limnologischer Sicht können Talsperren als eine Mischung aus See und Fluss betrachtet werden. Je näher das Gewässer sich an der Staumauer befindet, desto lakustrischer wird es. Im Vergleich zu vielen Seen ist die Verweilzeit des Wassers dagegen deutlich kürzer, zudem erfolgt der Ablauf einer Talsperre nicht an der Oberfläche, sondern im Tiefenwasser (Uhlmann & Horn, 2006).

Für die Bewertung der Wasserbeschaffenheit wird in Talsperren, ebenso wie in Seen, die Trophie verwendet. Hierfür ist besonders der Phosphorgehalt relevant, da dieser Nährstoff am ehesten das Pflanzenwachstum begrenzt, sowie die Trübung und der Chlorophyllgehalt (Hoehn, 2011; Hoehn, 2013; Uhlmann & Horn, 2006). In der Regel sind Trinkwassertalsperren nährstoffarme, das heißt oligotrophe bis schwach mesotrophe Gewässer.

#### **1.2.1.1 Temperatur und Sauerstoff**

Wie in den meisten Seen der gemäßigten Breiten, kommt es auch in Talsperren im Sommer zu einer Schichtung durch die verminderte Dichte des Wassers bei steigender Temperatur, mit der Ausbildung des Epilimnions (Warmwasserschicht), dem darunterliegenden Hypolimnion (Kaltwasserschicht) und dem Metalimnion (Sprungschicht) dazwischen (Abbildung 1.1). Im Herbst kommt es dann, bedingt durch die Angleichung der Wassertemperatur der verschiedenen Schichten und zudem gefördert durch Winde, zu einer Durchmischung. Die Herbstzirkulation tritt in Talsperren, bedingt durch die hypolimnische Tiefenwasserentnahme, früher auf verglichen mit Seen (Uhlmann & Horn, 2006). Im Winter kann eine inverse



**Abbildung 1.1 Limnologie einer Talsperre.**

Jahreszeitlicher Verlauf einer Talsperre mit Temperatur- (T) und Sauerstoffprofil (DO). Im Frühjahr und Herbst sind Temperatur und Sauerstoffgehalt in allen Tiefenschichten gleich. Im Sommer kommt es zur Schichtung mit der Ausbildung von Epi-, Meta- und Hypolimnion. Im Metalimnion kommt es zu einem Sauerstoffmaximum (heterograde Verlauf) bedingt durch das Phytoplankton. Im Winter kann durch die Eisbedeckung eine inverse Schichtung auftreten. Grafik nach Wetzel (2001).

Schichtung auftreten. Die Schichtung beeinflusst die Verteilung der Nährstoffe im Gewässer, da eine Durchmischung nicht mehr stattfindet. In der Folge kann es durch Sauerstoffverbrauch im Hypolimnion zur Lösung von Metallen (z. B. Mangan) und Nährstoffen aus dem Sediment kommen.

### 1.2.1.2 Phytoplankton

Nicht nur Temperatur und Sauerstoff wirken sich auf den jahreszeitlichen Zyklus einer Talsperre aus, auch das einfallende Licht und die Nährstoffsituation spielen eine große Rolle, da sich diese Faktoren direkt auf das Phytoplankton auswirken.

Dies bedingt, dass sich im Winter nur sehr wenig Phytoplankton im Gewässer befindet. Durch erhöhtes Lichtaufkommen im Frühjahr kommt es dann zu einer Vermehrung von Diatomeen (*Bacillariophyta*), in der Regel dominiert von *Asterionella* (Horn, 2003; Wetzel, 2001). Deren Vermehrung endet meist mit dem Auftreten der Sommer-Stratifizierung, sowie einer Limitierung der Nährstoffe Phosphor und Silikat (Wetzel, 2001; Zhang *et al.*, 2019).

Der weitere Verlauf der Phytoplankton-Entwicklung wird bestimmt durch die Nährstoffsituation innerhalb des Gewässers. In nährstoffreichen Gewässern haben im Sommer Chlorophyceen, Chrysophyceen, Cryptophyceen oder Cyanobakterien (z. B. *Planktothrix*) einen Wachstumsvorteil (Wentzky *et al.*, 2019; Wetzel, 2001). In nährstoffärmeren Gewässern sind im Sommer zu wenige Nährstoffe verblieben, weswegen es erst im Herbst, gemeinsam mit der Herbstzirkulation, wieder zu einer Diatomeenvermehrung (*Fragilaria*) kommt (Horn, 2003; Wetzel, 2001). Das photosynthetische Maximum wird in der Regel im Metalimnion gemessen.

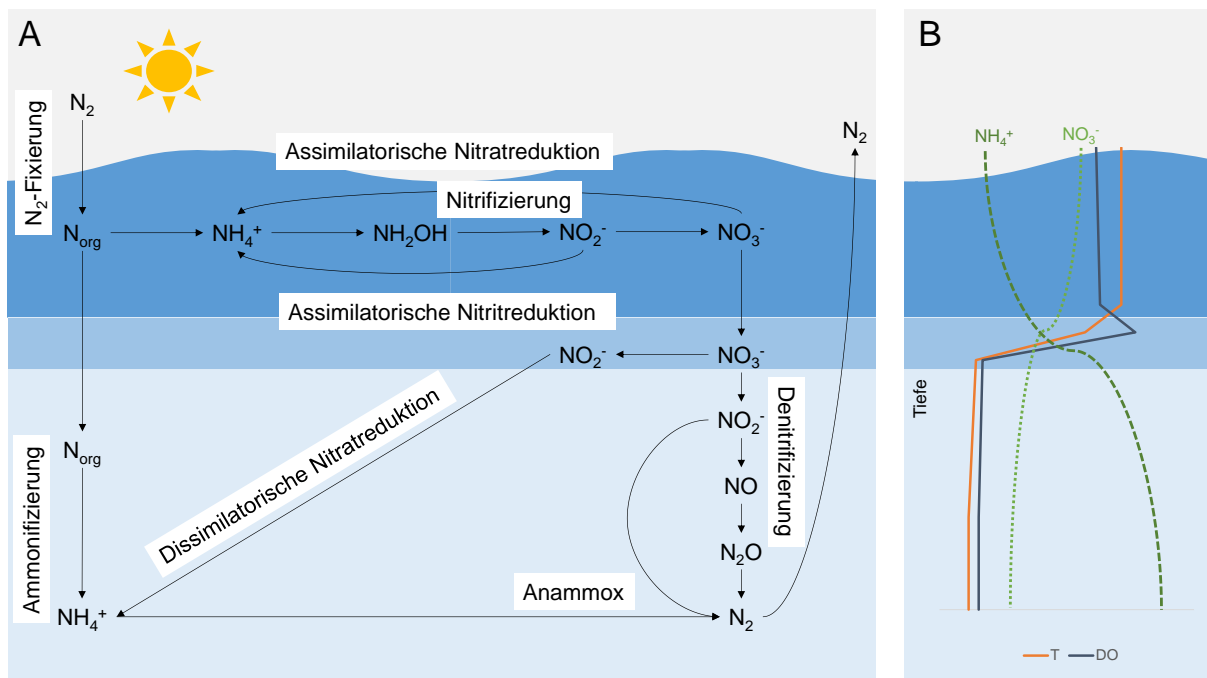
### 1.2.1.3 Stickstoff

In Süßwasser-Ökosystemen sind Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphor (P) und Siliziumdioxid (Si) Hauptnährstoffe, die zur Förderung der Primärproduktion durch höhere Pflanzen und Algen benötigt werden (Durand *et al.*, 2011; Wetzel, 2001). Auch für Bakterien stellt Stickstoff eine essentielle Substanz zum Überleben dar (Korajkic *et al.*, 2019).

Stickstoff kann über eine Reihe von Wegen in Süßgewässer gelangen, einer davon ist die Stickstofffixierung, zu der einige Cyanobakterien fähig sind. Bei diesem lichtabhängigen Prozess wird der Luftstickstoff ( $N_2$ ) zu Ammoniak ( $NH_4^+$ ) reduziert (Abbildung 1.2A) (Durand *et al.*, 2011). Sie spielt vor allem in produktiveren Gewässern eine Rolle, da hier vermehrt Cyanobakterien vorherrschen (Wetzel, 2001). In oligotrophen Gewässern spielt die Stickstofffixierung dagegen eine geringere Rolle, stattdessen stellen hier Nitrat und gelöster organischer Stickstoff eine Hauptquelle für den Stickstoff-Eintrag dar (Wetzel, 2001). Dieser gelöste organische Stickstoff wird vom Phytoplankton extrazellulär abgegeben und kann von heterotrophen Bakterien verwertet werden, zumeist in Form von Aminosäuren (Bouteleux *et al.*, 2005; Rosenstock & Simon, 1993; Wetzel, 2001).

Gebundener Stickstoff kommt dagegen in Form von Nitrat ( $NO_3^-$ ), Nitrit ( $NO_2^-$ ), Ammoniak ( $NH_4^+$ ) und gelöstem organischen Stickstoff vor. Diese Formen können direkt von Pflanzen aufgenommen werden, aus diesem Grund begünstigen sie die Produktivität sowohl in den Algen- als auch in den höheren Pflanzengemeinschaften (Durand *et al.*, 2011).

Ammoniak entsteht bei der Nitratreduktion (Abbildung 1.2A), sowie als Endprodukt beim Abbau von organischem Material (Böhlke *et al.*, 2006; Wetzel, 2001). Die Nitratreduktion nimmt im Spätsommer, vor der Umwälzung, zu (Wetzel, 2001). Ammoniak erreicht seine höchste Konzentration zu Zeiten der Schichtung im Hypolimnion oder Sediment (Abbildung 1.2B). In oligotrophen Gewässern ist die Konzentration an Ammoniak relativ gering, es wird



**Abbildung 1.2 Aquatischer Stickstoffkreislauf.**

**(A)** Überblick über den aquatischen Stickstoffkreislauf mit einer oxischen (oben) und anoxischen Zone (unten) nach Arrigo (2005). **(B)** Vertikale Verteilung von Nitrat ( $NO_3^-$ ) und Ammoniak ( $NH_4^+$ ), sowie Temperatur- (T) und Sauerstoffprofil (DO) nach Wetzel (2001).  $N_{org}$  = organischer Stickstoff.

meist direkt von Pflanzen assimiliert, oder im Rahmen der bakteriellen Nitrifizierung oxidiert (Wetzel, 2001).

Nitrit kommt ebenfalls nur in sehr geringen Konzentrationen vor, wenn überhaupt kommt es im Metalimnion zu einer leichten Akkumulation des Stoffes. Nitrat wird assimiliert und in organische Stickstoffverbindungen umgebaut, es erreicht seine höchste Konzentration im Epilimnion und Metalimnion (Abbildung 1.2A). Die Nitratkonzentration ist zudem im Frühjahr höher, sie nimmt im Sommer aufgrund des Pflanzenwachstums ab und steigt nach der Stratifikationsperiode wieder an (Diao *et al.*, 2018). Bei der Denitrifizierung wird Nitrat zu Stickstoff reduziert, dies geschieht vor allem im anoxischen Hypolimnion oder Sediment.

#### 1.2.1.4 Phosphat

Phosphat ist ein weiterer essenzieller Nährstoff, der für das Wachstum von Bakterien und Phytoplankton notwendig ist und in aquatischen Umgebungen begrenzt sein kann (Durand *et al.*, 2011; Korajkic *et al.*, 2019). Es wird davon ausgegangen, dass Phosphat der entscheidende limitierende Nährstoff für das Bakterienwachstum ist, insbesondere in oligotrophen Umgebungen (Šimek *et al.*, 2006; Wetzel, 2001), da es hier weniger häufig ist als Stickstoff und Kohlenstoff (Wetzel, 2001). In diesen Umgebungen sind heterotrophe Bakterien der Hauptkonkurrent des Phytoplanktons um Phosphor (Šimek *et al.*, 2006).

Die wichtigste anorganische Form des Phosphats ist ortho-Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Wetzel, 2001). Allerdings liegen mehr als 90 % des Phosphats in Gewässern in organischer Form vor. In oligotrophen Gewässern ist die Verteilung von Phosphat über den Jahresverlauf in allen Tiefen in etwa vergleichbar. In produktiveren Gewässern dagegen kommt es im tieferen Hypolimnion zu einer Zunahme des Phosphors, besonders zu Zeiten der Schichtung und besonders in Sedimentnähe.

#### 1.2.1.5 Klimabedingte Veränderungen

In den letzten Jahrzehnten haben sich Talsperren durch den Klimawandel stark verändert. Einer der Hauptfaktoren ist die Temperatur. In Seen hat die Wassertemperatur in den letzten 40 Jahren um 0,1 bis 1,5 °C zugenommen (Bates *et al.*, 2008). Selbst das kalte hypolimnische Wasser zeigt einen Temperaturanstieg von etwa 0,1 bis 0,2 °C pro Jahrzehnt (Dokulil *et al.*, 2006). In Talsperren in Deutschland konnte der gleiche Effekt in den oberen Wasserschichten festgestellt werden (Willmitzer *et al.*, 2015), weswegen die Veränderung der Wassertemperatur in Talsperren bedingt durch den Klimawandel Gegenstand aktueller Forschung ist (Mi *et al.*, 2020).

Die Temperatur beeinflusst viele physikochemische Parameter und führt global gesehen zu einem Anstieg des pH-Wertes und einer Abnahme von gelösten Gasen wie Sauerstoff in tieferen Schichten (Bates *et al.*, 2008; Delpla *et al.*, 2009). In einigen Trinkwasserseen konnte zudem eine Zunahme von ortho-Phosphat, sowie Chlorophyll a beobachtet werden (Hintz *et al.*, 2020). Darüber hinaus hat sich aufgrund der globalen Erwärmung die Schichtungsperiode in Seen der nördlichen Hemisphäre um 2 bis 3 Wochen verlängert und die thermische Stabilität erhöht (Bates *et al.*, 2008), was auf eine frühere Erwärmung des Wassers und einer geringeren Eisbedeckung im Winter zurückzuführen ist (Magnuson *et al.*, 2000).

## 1.2.2 Eintrag von Verunreinigungen in Oberflächengewässer

Im Gegensatz zum Grundwasser, das durch die darüber liegenden Böden geschützt ist, sind Oberflächengewässer anfällig für verschiedene Verunreinigungen und weisen häufig mikrobielle, fäkale Verunreinigungen auf, die die Trinkwassergewinnung beeinträchtigen (Hamsch, 2010). Diese stellen ein mögliches Gesundheitsrisiko für den Menschen dar, weswegen das Trinkwasser regelmäßig auf sogenannte Indikatororganismen untersucht wird. Auf die Untersuchung von Trinkwasser und mögliche Gesundheitsrisiken durch Fäkaleinträge wird in Kapitel 1.3 genauer eingegangen, in diesem Kapitel sollen vor allem die Ursachen für einen solchen Eintrag in Oberflächengewässern genauer betrachtet werden.

Eine solche Kontamination kann unterschiedliche Ursachen haben. Das Wasser kann durch Abwasser oder Abflüsse aus Siedlungen verunreinigt werden (Byappanahalli *et al.*, 2012). Auch die Landwirtschaft stellt eine mögliche Eintragsquelle dar (Rogers & Haines, 2005). Doch nicht nur Nutzvieh trägt zur Verunreinigung bei, auch wildlebende Tiere wie beispielsweise Vögel oder Invertebraten können der Ursprung für Verunreinigungen sein (Byappanahalli *et al.*, 2012; Hügler *et al.*, 2014; Korth *et al.*, 2013). Da einige Indikatororganismen neben Fäkalien auch in Umwelthabitaten wie Sediment, Sand und Pflanzen gefunden werden können, ist dieser Eintragspfad ebenfalls denkbar (Byappanahalli *et al.*, 2012; Stevens *et al.*, 2003). Der Eintrag kann dabei direkt erfolgen, indem Faeces oder ein anderes von den Bakterien bevölkertes Habitat in das Oberflächenwasser gelangt. Aber auch ein indirekter Eintrag ist möglich, beispielsweise bedingt durch Regen und Hochwasser.

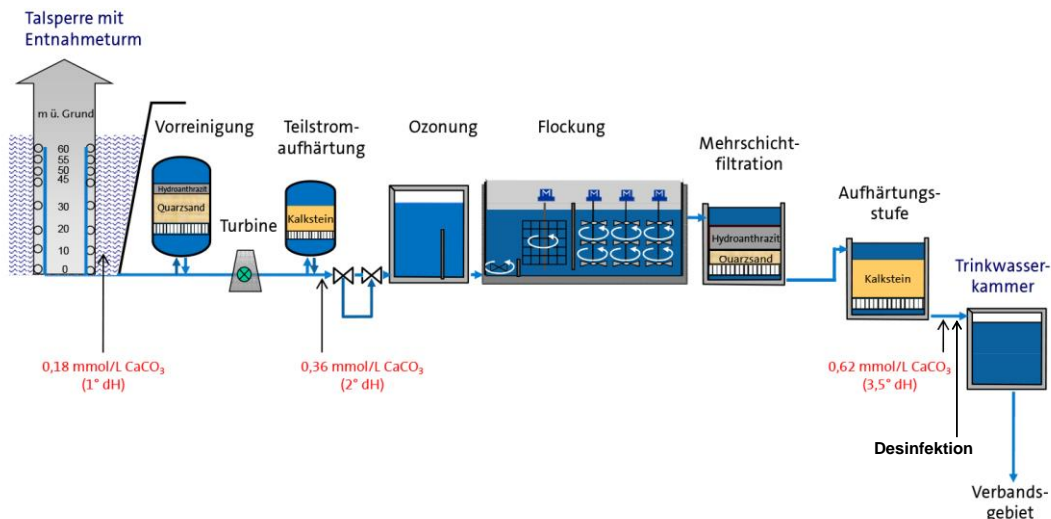
Da die fäkale Verunreinigung des Rohwassers eine große Herausforderung für Wasserversorger darstellt (Gunnarsdottir *et al.*, 2020), ist für sie, ebenso wie für Gesundheitsbehörden, eine der essentiellen Frage, ob die beobachtete mikrobiellen Belastungen mit einem Fäkaleintrag zusammenhängen (siehe Kapitel 1.3), was möglicherweise ein Gesundheitsrisiko bedeuten würde. Aus diesem Grund ist die mikrobiologische Überwachung bei der Beurteilung der Wasserqualität von Talsperren, die für die Trinkwassergewinnung genutzt werden, unerlässlich (Kirschner *et al.*, 2017; Kistemann *et al.*, 2002; Paruch *et al.*, 2019).

## 1.2.3 Aufbereitung von Trinkwasser

Um die hohe Qualität des Trinkwassers aus Oberflächengewässern zu garantieren, wird auf ein Multibarriersystem gesetzt (Lambert *et al.*, 2010). Dies bedeutet, dass Wasserressourcen an unterschiedlichen Stellen vom Einzugsgebiet bis zur Aufbereitung geschützt werden. So verfügen Talsperren beispielsweise über eine Vorsperre vor der eigentlichen Hauptsperre, die zu einer Verminderung von Schwebstoffen führt und Einträge beispielsweise nach Regenereignissen minimiert. Zusätzlich wird eine Talsperre von einem Wasserschutzgebiet umgeben, welches Einträge von außen auf einem möglichst minimalen Niveau halten soll.

Bei der Aufbereitung des Rohwassers, kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Es wird zwischen physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren unterschieden (Karger *et al.*, 2008). Bei der Aufbereitung von Rohwasser aus Talsperren kommt in der Regel eine Flockenfiltration, sowie eine Abschlussdesinfektion zum Einsatz (Abbildung 1.3). Diese kann durch eine vorangestellte Ozonung ergänzt werden.

Die Filtration dient der Vorbehandlung des Rohwassers und der Verminderung der Partikelkonzentration (Karger *et al.*, 2008). Bei Oberflächengewässern kommen in der Regel Mehrschichtfilter zum Einsatz, bei welchen die obere Schicht aus Aktivkohle und die untere Schicht aus Sand besteht.



**Abbildung 1.3 Aufbereitung am Beispiel der Trinkwassertalsperre Kleine Kinzig.**

Bei dieser Talsperre erfolgt die Vorreinigung des Rohwassers über einen Kohle-Sand-Filter, gefolgt von einem Ozonungsschritt und einer Flockung. Im Anschluss an die Flockung befinden sich zwei Mehrschicht-Filter. Zur Abschlussdesinfektion wird Chlor verwendet, bevor es in die Trinkwasserkammer gelangt. Nach ZVWKK (2012).

Im Oberflächenwasser liegen auch nach der Vorbehandlung noch Feststoffe vor, wie beispielsweise Plankton (Karger *et al.*, 2008). Um diese Partikel zu entfernen, wird die Flockung in Kombination mit einer abschließenden Filtration verwendet. Diese dient dazu, die Partikel zu binden und anschließend zu fällen. Hierbei wird sich die negative Ladung der Partikel zu Nutze gemacht, während das Flockungsmittel positiv geladen ist. Als Flockungsmittel dienen überwiegend Aluminium- oder Eisensalze ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Nach der Bildung der Flocken können diese mittels Filtration aus dem Wasser entfernt werden.

Nach der Flockungsfiltration wird das Trinkwasser desinfiziert, um eventuell vorhandene Mikroorganismen abzutöten. Zur Desinfektion gibt es verschiedene Verfahren, wie die UV-Desinfektion oder die Zugabe von Desinfektionsmitteln wie Ozon ( $\text{O}_3$ ), Chlor ( $\text{Cl}_2$ ) oder Chlordioxid ( $\text{ClO}_2$ ). Ziel der Desinfektion ist eine Abtötung von mindestens 4  $\log_{10}$ -Stufen (UBA, 2010), diese Eliminationsleistung kann bei coliformen Bakterien bereits nach kurzer Zeit erreicht werden (Hamsch *et al.*, 2016).

### 1.3 Untersuchung von Trinkwasser

Laut TrinkwV muss Trinkwasser rein und genusstauglich sein (TrinkwV, 2001). Dennoch ist es als Produkt der Natur auch nach seiner Aufbereitung nicht steril (Hügler, 2016; van Lieverloo *et al.*, 2012). Es enthält sowohl Bakterien, Viren, Protozoen, aber auch Metazoen. Diese finden im Trinkwasser ihren Lebensraum, sind aber in der Regel nicht gesundheitsschädlich.

Dennoch kann es theoretisch dazu kommen, dass pathogene Erreger ins Trinkwasser übertragen werden, wie Bakterien (*Campylobacter*, pathogene enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*), Viren (Adenovirus, Norovirus) oder Protozoen (*Cryptosporidium*, *Giardia*) (Ashbolt, 2004; Hügler & Hamsch, 2012; Pandey *et al.*, 2014; WHO, 2017). Meist ist dies der Fall, wenn menschliche oder tierische Fäkalien in die aquatische Umwelt gelangen, welche anschließend für die Gewinnung von Trinkwasser genutzt wird. Mit ihnen werden auch andere Bakterien eingetragen, wie beispielsweise *E. coli* und Enterokokken (WHO, 2001).

Dies macht man sich in der Trinkwasseranalyse zu Nutze, indem man sich sogenannter Indikatororganismen bedient, die Aufschluss über eine potentielle fäkale Verunreinigung und eine damit verbundene mögliche Anwesenheit von Krankheitserregern geben sollen (Baldauf *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2020; WHO, 2017). Dieses Prinzip geht ursprünglich auf Robert Koch zurück (Koch, 1893). Da die mikrobielle Analyse lediglich anzeigt, welche Organismen zur Zeit der Beprobung vorhanden sind, ist eine regelmäßige Kontrolle einiger weniger Indikatororganismen sicherer, als eine nur selten durchgeführte Untersuchung aller möglichen Humanpathogene. Außerdem ist sie kostengünstiger und weniger zeitaufwendig. Bei der Wahl geeigneter Indikatoren werden einige Anforderungen an den Organismus gestellt. So sollte er aus der gleichen Quelle stammen, wie der potentielle Erreger. Er sollte häufiger anzutreffen sein, dabei aber ähnlich lange überleben und ähnlich resistent sein. Außerdem sollte er selbst nicht krankheitserregend sein und sein Nachweis sollte einfach und kostengünstig sein.

Da ein einzelner Organismus dies nicht erfüllen kann, wurden verschiedene Parameter als Indikatoren festgelegt, wie die Koloniezahl bei 22 °C und 36 °C, *Clostridium perfringens*, coliforme Bakterien, *E. coli* und Enterokokken (TrinkwV, 2001). Der Umfang der Untersuchungen ist in Anlage 4 der TrinkwV geregelt. Einige Parameter sind routinemäßig zu testen, andere sind nur im Rahmen umfassender Untersuchungen zu beproben. Die Indikatoren sollen Hinweise auf mögliche pathogene Erreger geben. Besonders Enterokokken und *E. coli* sind hierbei als mikrobiologische Parameter hervorzuheben, die als Fäkalindikatorbakterien (FIB) angesehen werden. Kommen sie im Trinkwasser vor, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch Humanpathogene vorkommen, die mit ausgeschieden werden. Für diese herrscht ein Grenzwert vor, der laut TrinkwV § 5 Absatz 2 nicht überschritten werden darf. So dürfen Enterokokken und *E. coli* in 100 ml nicht nachweisbar sein.

Für coliforme Bakterien wurde dieses Konzept 2011 relativiert, seitdem zählen sie nicht mehr als mikrobiologische Parameter, sondern als Indikatorparameter (TrinkwV, 2001). Für diese gilt ebenfalls ein Grenzwert, der nach TrinkwV § 7 Absatz 1 eingehalten werden muss. Allerdings ist hier nicht auf eine fäkale Kontamination zurückzuschließen, da coliforme Bakterien auch in der Umwelt vorkommen können, ihre hygienische Relevanz wird daher in der Fachwelt noch immer diskutiert (Leclerc *et al.*, 2001; Octavia & Lan, 2014; Stevens *et al.*, 2003; WHO, 2001; WHO, 2017). Die Bewertung ist im Einzelfall häufig schwierig (Gerhardy, 2019). Dennoch sind sie als Indiz für die allgemeine Wasserqualität des Trinkwassers sowie einen nicht ordnungsgemäßen Zustand im Verteilungssystem unerlässlich (Hügler & Hamsch, 2012; Leitlinien BGM & UBA, 2013; UBA, 2009; WHO, 2017).

## 1.4 Coliforme Bakterien

Coliforme Bakterien stellen keine taxonomische Gruppe dar. Sie werden vielmehr anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und dem verwendeten Nachweisverfahren eingeteilt. Sie sind gramnegative, fakultativ anaerobe, nicht-sporulierende Stäbchenbakterien (Stevens *et al.*, 2003; UBA, 2009; WHO, 2017). Ihr Nachweis erfolgt über das von ihnen gebildete Enzym  $\beta$ -D-Galactosidase und über eine negative Oxidasereaktion (Fiksdal & Tryland, 2008; Kilian & Bulow, 1976). Zum Nachweis von *E. coli* wird zusätzlich das Enzym  $\beta$ -D-Glucuronidase getestet. Per Definition gehören coliforme Bakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae* (UBA, 2009), die bis vor kurzem als einzige Familie innerhalb der Ordnung *Enterobacterales* galt (Adeolu *et al.*, 2016; Alnajar & Gupta, 2017). Da diese Ordnung mittlerweile allerdings einer Reklassifizierung unterzogen wurde, was zur Auftrennung in sieben verschiedene Familien

führte (Adeolu *et al.*, 2016), sind die coliformen Bakterien korrekterweise der gesamten Ordnung *Enterobacterales* zuzurechnen. Die Gruppe der coliformen Bakterien umfasst unter anderem Vertreter der Gattungen *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* und *Serratia* (Stevens *et al.*, 2003; UBA, 2009; WHO, 2017).

Für coliforme Bakterien ist laut TrinkwV ein Grenzwert von 0 Kolonien pro 100 ml festgelegt (TrinkwV, 2001). Die genaue Bewertung eines Nachweises coliformer Bakterien ist allerdings nicht ganz eindeutig, da für Indikatorparameter Ausnahmeregelungen gelten können, zudem sind die getroffenen Maßnahmen in einem solchen Fall abhängig vom Gesundheitsamt (Leitlinien BGM & UBA, 2013). Dieses muss entscheiden, inwieweit eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit zu besorgen ist. So ist beispielsweise ein Abkochgebot lediglich von Nöten, wenn ein Hinweis auf fäkale Belastungen vorliegt. Nach einer Prüfung kann allerdings auch von der Anordnung von Maßnahmen abgesehen werden, sowie eine Grenzwertüberschreitung für einen festgelegten Zeitraum toleriert werden. Diese Entscheidung wird von Gesundheitsbehörden oft sehr unterschiedlich getroffen (Nienhüser&Packroff, 2006).

Die Beurteilung der hygienischen Qualität wird dadurch erschwert, dass den coliformen Bakterien sowohl Arten zugerechnet werden, die fäkalen Ursprungs sind, als auch Arten, die außerhalb des Darms von Mensch und Tier in der Umwelt vertreten sind und daher als Umweltcoliforme bezeichnet werden (Leitlinien BGM & UBA, 2013; Stevens *et al.*, 2003). Vertreter aus der aquatischen Umwelt wie *Rahnella aqualis*, *Pantoea kluuyvera* und *Serratia fonticola* können nicht als Fäkalindikator angesehen werden (Leclerc *et al.*, 2001; Nienhüser & Packroff, 2006). Besonders seit der Umstellung des Nachweisverfahrens für coliforme Bakterien durch die TrinkwV (2001) ist ein deutlicher Anstieg an Nachweisen coliformer Bakterien aus der Umwelt festzustellen (Tabelle 1.1) (Kämpfer *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2003; UBA, 2009). Deren hygienische Relevanz ist nach aktuellen Erkenntnissen nicht geklärt (Leclerc *et al.*, 2001; Octavia & Lan, 2014; Stevens *et al.*, 2003; WHO, 2001; WHO, 2017). Daher gibt ihr Auftreten nur bedingt einen Hinweis auf fäkale Verunreinigungen. Auch das Vermehrungspotential coliformer Bakterien in Verteilungssystemen zeigt, dass mit ihrem Nachweis nicht ausschließlich auf eine ungenügende Aufbereitung zu schließen ist (Camper, 1993; Chen *et al.*, 2019; Edberg *et al.*, 1994; Hamsch *et al.*, 2012; LeChevallier, 1990).

Vielmehr sind sie als Indikator für eine mögliche oberflächlich eingetragene Verunreinigung des Trinkwassers und als Indiz für die Wasserqualität des Trinkwassers anzusehen (Hügler & Hamsch, 2012; Leitlinien BGM & UBA, 2013; UBA, 2009; WHO, 2017). Ihr Nachweis stellt in jedem Fall eine unerwünschte Belastung des Trinkwassers dar (UBA, 2009), da sie auf einen nicht bestimmungsgemäßen Zustand des Trinkwassers hinweisen. In einem solchen Fall müssen die Ursachen geklärt und weitere Kontrollen durchgeführt werden.

Ausschließlich fäkalen Ursprungs ist nach bisherigen Erkenntnissen nur *E. coli*. Diese Bakterien sind ein natürlicher Bestandteil der Darmflora des Menschen und anderen Warmblütern, sie kommen in Fäkalien mit einer Konzentration von  $10^9$  Zellen pro Gramm vor. Der Nachweis dieses Parameters gibt Rückschlüsse auf eine kurz zurückliegende Kontamination, da *E. coli* nur für kurze Zeit in der Umwelt überlebensfähig ist. Nach Edberg *et al.* (2000) stellt dieser Organismus den besten Indikatororganismus für die Sicherung der menschlichen Gesundheit dar. Ihr Nachweis gibt einen eindeutigen Hinweis auf einen fäkalen Eintrag, bei dem auch mit der Anwesenheit von Pathogenen gerechnet werden muss (Leitlinien BGM & UBA, 2013). In einem solchen Falle sind Sofortmaßnahmen zu treffen, beispielsweise in Form einer Desinfektion oder eines Abkochgebots.



**Tabelle 1.1 Nachweis verschiedener Gattungen coliformer Bakterien abhängig vom Nachweisverfahren, nach Stevens *et al.* (2003) und UBA (2009).**

Methode nach TrinkwV 1990 (Laktose zu Säure und Gas)	Methode nach DIN EN ISO 9308-1, TrinkwV 2001 (Laktose zu Säure)	Alternativverfahren nach TrinkwV 2001, Colilert (β-D-Galactosidase)
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i>
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia</i>
	<u><i>Pantoea</i></u>	<u><i>Pantoea</i></u>
	<u><i>Kluyvera</i></u>	<u><i>Kluyvera</i></u>
		<u><i>Cedecea</i></u>
		<u><i>Ewingella</i></u>
		<u><i>Moellerella</i></u>
		<u><i>Leclercia</i></u>
		<u><i>Rahnella</i></u>
		<u><i>Yokenella</i></u>

**Fett:** coliforme Bakterien, die sowohl in der Umwelt als auch in menschlichen Fäkalien vorkommen

**Fett und unterstrichen:** coliforme Bakterien, die primär als Umweltbakterien angesehen werden

Obwohl laut der TrinkwV (2001) eine Vermehrung coliformer Bakterien nur in Ausnahmefällen zu erwarten ist, werden immer wieder hohe Konzentrationen coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren und Seen beobachtet (Atherholt *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2005; Exner *et al.*, 2005; Freier *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2010; Packroff & Clasen, 2005). Diese Problematik wurde von den Wasserversorgern in Zusammenhang mit der Umstellung der Nachweismethoden für coliforme Bakterien festgestellt, die auf dem Vorhandensein von β-Galaktosidase basieren, wie z. B. das Colilert®-18/Quanti-Tray®-System, da diese Methoden ein breiteres Spezies-Spektrum von coliformen Bakterien nachweisen (Kämpfer *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2003).

Erste Identifizierungsergebnisse deuten auf *Enterobacter asburiae* hin, die Teil des *Enterobacter cloacae*-Komplexes ist, einer Gruppe, deren Taxonomie in der Fachwelt nicht eindeutig geklärt ist und die häufigen Änderungen unterliegt (Freier *et al.*, 2005; Hoffmann & Roggenkamp, 2003), worauf in Kapitel 1.4.1 genauer eingegangen wird. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass auch die Arten *Lelliottia amnigena* und *Serratia fonticola* zu einer solchen Vermehrung fähig sein könnten. Beide Arten werden – anders als *Enterobacter asburiae* – regelmäßig in Trinkwassersystemen nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass diese hohen Konzentrationen coliformer Bakterien in Talsperren vor allem im Spätsommer bis Frühherbst auftreten und durch lediglich eine oder einige wenige Arten ausgelöst werden, was es genauer zu untersuchen gilt.

Wieso es allerdings zu hohen Konzentrationen der coliformen Bakterien in Talsperren kommt, ist noch Gegenstand aktueller Forschung (Exner *et al.*, 2005). Zusammenhänge mit äußeren Einflüssen konnten jedoch nicht beobachtet werden, weswegen Freier *et al.* (2005) einen allochthonen Eintrag ausschlossen und auf talsperren-interne Prozesse verwiesen. Bei einem ähnlichen Fall einer massenhaften Vermehrung in den USA wurde *Enterobacter cloacae* im Verteilungsnetz nachgewiesen, wobei auch hier die Autoren Fehler in der Aufbereitung ausschlossen und von system-internen Prozessen ausgingen (Edberg *et al.*, 1994). Mögliche Faktoren stellen nach LeChevallier *et al.* (1996) z. B. der assimilierbare organische Kohlenstoff (AOC, engl. *assimilable organic carbon*) und die Temperatur dar. Außerdem

spielen vermutlich Nährstoffe eine Rolle, so haben beispielsweise  $\gamma$ -Proteobakterien einen Wachstumsvorteil, wenn Stickstoff oder Phosphat in ausreichender Menge vorhanden ist (Newton *et al.*, 2011). Eine genaue Ursachenanalyse ist von großer Bedeutung für die Einordnung der Befunde.

### 1.4.1 *Enterobacter*

*Enterobacter* wurde erstmals von Hormaeche & Edwards (1960) beschrieben. Der Gattung werden aktuell 20 Arten und 7 Unterarten zugerechnet (LPSN, 2021; Parte, 2018). Die Identifizierung dieser Arten ist allerdings nicht immer einfach, da diese teilweise sehr eng miteinander verwandt sind (Hoffmann *et al.*, 2005a). So wird *Enterobacter asburiae* dem *Enterobacter cloacae*-Komplex zugeordnet (Mezzatesta *et al.*, 2012). Die Taxonomie dieser Gruppe ist in der Fachwelt nicht eindeutig geklärt und unterliegt häufigen Änderungen (Freier *et al.*, 2005; Hoffmann & Roggenkamp, 2003). Zugerechnet werden ihr nach aktuellem Stand die Arten *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei* und *Enterobacter ludwigii* (Annavaiahala *et al.*, 2019).

*Enterobacter* sind fakultativ anaerobe Bakterien (Brady *et al.*, 2013), die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Diese Familie kann in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Fermentationswegen unterteilt werden. Gattungen wie *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella* nutzen die gemischte Säuregärung, bei der Glucose zu Säuren (Acetat, Laktat, Succinat und Formiat), Kohlendioxid und Ethanol vergärt wird, jedoch ohne Butandiolproduktion (Müller, 2008; van Houdt *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu nutzen *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Serratia* die Butandiol-Fermentation, wobei sie Glucose hauptsächlich zu Butandiol vergären und weniger Säure produzieren (Ji *et al.*, 2011; Müller, 2008; Taghavi *et al.*, 2010). Diese Gruppen können durch die Voges-Proskauer-Reaktion unterschieden werden, wobei ein positives Ergebnis auf die Bildung von Acetoin hinweist, welches Teil der Butandiol-Fermentation ist. So ist von *Enterobacter* bekannt, dass sie überwiegend Voges-Proskauer-positiv sind (Brady *et al.*, 2008; Brady *et al.*, 2013; Brenner *et al.*, 1986; Hoffmann *et al.*, 2005a). Zudem ist *Enterobacter asburiae* negativ für die Indolproduktion (Brenner *et al.*, 1986; Izard *et al.*, 1981). Zur Unterscheidung von *Enterobacter asburiae* von anderen *Enterobacter*-Arten wurde von Brenner *et al.* (1986) beschrieben, dass der Zucker L-Rhamnose nicht verwertet werden kann. Zudem sind die meisten, allerdings nicht alle *Enterobacter asburiae* in der Lage, Raffinose zu nutzen (Brenner *et al.*, 1986; Dworkin *et al.*, 2006).

*Enterobacter asburiae* wurde ursprünglich aus klinischen Proben isoliert (Brenner *et al.*, 1986), dennoch ist die Art nach bisherigem Kenntnisstand von ungesicherter opportunistischer Bedeutung (Dworkin *et al.*, 2006; UBA, 2009). Da sich diese Art nach aktuellem Stand im oligotrophen Milieu von Trinkwasserreservoirs und Seen, die zur Trinkwassergewinnung genutzt werden, vermehren können, ist die Frage nach ihrer hygienischen Relevanz für Wasserversorger und Behörden von großer Bedeutung und muss daher geklärt werden.

Arten der Gattung *Enterobacter* spp. kommen ubiquitär in der Umwelt vor, z. B. in Erde und Wasser (Akita *et al.*, 2019; Dworkin *et al.*, 2006; Gavini *et al.*, 1985; Halda-Alija *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2016), sowie als pflanzenwachstumsfördernde Bakterien (Andrés-Barrao *et al.*, 2017; Chavda *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2020; Oh *et al.*, 2018; Taghavi *et al.*, 2010), die Phosphat mobilisieren können (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Mezzatesta *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind einige Arten hygienisch relevant, da sie für verschiedene Infektionen wie Lungenentzündung, Harnwegsinfektionen und Septikämie verantwortlich sind (Sanders & Sanders, 1997). Insbesondere *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* und *Enterobacter*

*hormaechei* werden häufig mit klinischen Proben in Verbindung gebracht (Davin-Regli *et al.*, 2019; Hoffmann *et al.*, 2005b; Hoffmann *et al.*, 2005a).

Darüber hinaus sind einige *Enterobacter* spp. als antibiotikaresistente Bakterien, besonders nach dem weit verbreiteten Einsatz von Antibiotika vermehrt als Krankheitserreger zu beobachten (Annavajhala *et al.*, 2019; Davin-Regli *et al.*, 2019; Dworkin *et al.*, 2006; Mezzatesta *et al.*, 2012). Aktuell stehen besonders die Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamasen (ESBL) produzierenden Bakterien, sowie Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (CRE) im Fokus der Aufmerksamkeit. Die Untersuchung von Antibiotikaresistenzen ist daher von großer Bedeutung für die Einordnung der hygienischen Relevanz.

### 1.4.2 *Lelliottia*

Die Gattung *Lelliottia* ist sehr nah verwandt mit *Enterobacter*, sodass diese bis 2013 sogar als eine Gattung betrachtet wurden und erst aufgrund von Multilocus-Sequenzanalysen (MLSA) von Brady *et al.* (2013) neu klassifiziert wurden. Die Gattung *Lelliottia* besteht aus den Arten *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia nimipressuralis*, *Lelliottia aquatilis* und *Lelliottia jeotgali* (Brady *et al.*, 2013; Carter, 1945; Izard *et al.*, 1981; Kämpfer *et al.*, 2018; Yuk *et al.*, 2018).

*Lelliottia* kann Raffinose und L-Rhamnose nutzen, während die Reaktion auf D-Sorbit unterschiedlich ausfällt (Brady *et al.*, 2013; Izard *et al.*, 1981; Kämpfer *et al.*, 2018). Wie auch *Enterobacter* ist von *Lelliottia* bekannt, dass sie überwiegend Voges-Proskauer-positiv sind (Brady *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2005a). *Lelliottia amnigena* ist als negativ für die Indolproduktion beschrieben (Brenner *et al.*, 1986; Izard *et al.*, 1981), während *Lelliottia aquatilis* positiv ist (Kämpfer *et al.*, 2018).

*Lelliottia* spp. wurden bisher aus Umweltproben isoliert, wie beispielsweise aus Wasser, Erde und Pflanzen (Brenner *et al.*, 1986; Brenner *et al.*, 1986; Izard *et al.*, 1981; Kämpfer *et al.*, 2018; Leclerc *et al.*, 2001). Sie sind ebenfalls als pflanzenwachstumsfördernde Bakterien beschrieben (El-Akhdar *et al.*, 2020). In seltenen Fällen wurden sie auch in klinischen Proben nachgewiesen, allerdings ohne klinische Signifikanz (Farmer *et al.*, 1985).

### 1.4.3 *Serratia*

Die Gattung *Serratia* wurde ursprünglich ebenfalls der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet. Da die Taxonomie der zugehörigen Ordnung *Enterobacterales* aufgrund von 16S rRNA-Genen schwierig ist (siehe Kapitel 1.4.4), erfolgte im Jahr 2016 eine Reklassifizierung, nach welcher *Serratia* nun der Familie *Yersiniaceae* zuzuordnen ist (Adeolu *et al.*, 2016). *Serratia* besteht nach aktuellem Stand aus 22 Arten (LPSN, 2021), von denen einige Stämme der Arten *Serratia marcescens*, *Serratia rubidaea* und *Serratia plymuthica* ein rotes Pigment, Prodigiosin, produzieren (Abbott, 2011).

Auch *Serratia* ist in der Umwelt weit verbreitet. Arten dieser Gattung wurden bereits in Wasser, Erde, Pflanzen und Invertebraten gefunden (Dworkin *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2015; Octavia & Lan, 2014). Im klinischen Bereich spielt vor allem *Serratia marcescens*, eine große Rolle (Abbott, 2011; Dworkin *et al.*, 2006). Die Art *Serratia fonticola* wurde ursprünglich in Wasser isoliert (Gavini *et al.*, 1979). Sie wurde in seltenen Fällen auch in klinischen Proben nachgewiesen, allerdings ohne klinische Signifikanz (Aljorayid *et al.*, 2016; Farmer *et al.*, 1985).

#### 1.4.4 Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien

Für die Bewertung eines Nachweises von coliformen Bakterien ist es unerlässlich, die Spezies zu kennen (Gerhardy, 2019). Denn anders als *E. coli* kommen Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Buttiauxella* und *Serratia* auch in nicht-fäkalen Quellen vor. Daher wird zur Einordnung von Befunden von vielen Gesundheitsämtern mittlerweile eine Identifizierung der coliformen Bakterien gefordert (Kämpfer *et al.*, 2008).

Die Identifizierung wird klassischerweise mit einfachen Verfahren wie der sogenannten „Bunten Reihe“ durchgeführt. Hierfür sind kommerzielle Kits auf dem Markt verfügbar, beispielsweise das API-Verfahren (engl. *Analytic profile index*) (Carbonnelle *et al.*, 2011). Dieses stellt einen biochemischen Test dar, wobei verschiedene Merkmale der Bakterien anhand ihrer Enzymaktivität getestet werden, beispielsweise der Abbau von Lactose. Anhand dieser Eigenschaften können Rückschlüsse auf die jeweilige Art gezogen werden. Der Nachteil dieser Methode besteht in der Dauer, sowie in der Problematik bei der Identifizierung einiger Organismen (O'Hara *et al.*, 1992; Popović *et al.*, 2017).

Im molekularbiologischen Bereich dient die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens als Standard-Methode bei der Identifizierung von Bakterien. Da diese Methode für coliforme Bakterien im Allgemeinen, sowie für *Enterobacter* im Speziellen, nicht eindeutig ist, empfehlen Hoffmann & Roggenkamp (2003) das *hsp60*-Gen zu verwenden, bei welchem das Gen amplifiziert wird, welches für das 60 kDa Hitzeschock-Protein (engl. *heat shock protein*) kodiert. Da diese Methode jedoch noch immer zu Ungenauigkeiten führte, wird mittlerweile in der Praxis auf mehr als ein Gen zur Identifizierung zurückgegriffen. So werden mit der sogenannten Multilocus sequence analysis (MLSA) vier Gene untersucht: *gyrB*, *rpoB*, *atpD* und *infB* (Brady *et al.*, 2008; Brady *et al.*, 2013).

Vorausgehend an eine Identifizierung ist zudem eine Typisierung der Bakterien von Vorteil. Die RAPD (engl. *randomly amplified polymorphic DNA*) ist eine PCR-basierte Methode, die dazu dient, Organismen taxonomisch einzuordnen. Anders als bei gängigen PCR-Methoden wird hier lediglich ein Primer verwendet. Dieser bindet an mehrere unspezifische polymorphe DNA-Segmente im Bakteriengenom, die daraufhin amplifiziert werden. So lassen sich beispielsweise verschiedene Arten einer Gattung unterscheiden und somit auf die Taxonomie schließen, da nahverwandte Arten nach der Elektrophorese gleiche oder ähnliche Bandenmuster aufweisen (Hadrys *et al.*, 1992). Vorteile bringt diese Methode vor allem dann, wenn viele Isolate identifiziert werden sollen (Hügler *et al.*, 2015). Der Zweck der Typisierung besteht darin, Klone zu erkennen und klinische und umweltassoziierte Isolate zu vergleichen, um die Ausbreitung von bakteriellen Untergruppen zu verfolgen (Sauget *et al.*, 2017). Die RAPD ist im Vergleich zu anderen molekularbiologischen Typisierungsmethoden mit weniger Arbeitsaufwand und Kosten verbunden.

Eine gute Alternative zu diesen gängigen Methoden ist die matrixunterstützte Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, engl. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). Mit dieser Methode können Proteine nach ihrer Größe und Ladung getrennt und hiermit die Molekülmasse berechnet werden. Da Bakterien sich nicht nur anhand ihrer DNA, sondern auch anhand ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, können diese mit dem MALDI-TOF in kürzester Zeit identifiziert werden (Benagli *et al.*, 2011; Bizzini & Greub, 2010). Hierfür dient das Proteinspektrum sozusagen als eine Art Fingerabdruck und wird mit einer Datenbank abgeglichen, in welcher bereits bekannte Arten eingespeichert sind. Bei der MALDI-TOF MS handelt es sich daher um eine datenbankbasierte

Methode. Zusätzlich bietet das MALDI-TOF die Möglichkeit, Stämme zu typisieren, vergleichbar mit der RAPD (Egli *et al.*, 2015; Sachse *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2013; Sauget *et al.*, 2017). Im Vergleich zu den zuvor genannten Methoden stellt das MALDI-TOF eine kostengünstige und zeitsparende Alternative dar. Die Methode findet aktuell vor allem im klinischen Bereich Anwendung (Benagli *et al.*, 2011; Carbonnelle *et al.*, 2011), daher ist die Identifizierung von Umweltisolaten schwierig. So ist beispielsweise die genaue Aufschlüsselung von *Enterobacter*-Isolaten nicht immer eindeutig (de Florio *et al.*, 2018; Pavlovic *et al.*, 2012). Allerdings kann die der Identifizierung zugrundeliegende Datenbank durch neue Isolate erweitert werden, zudem besteht die Möglichkeit, auch alte Messungen mit neuen Datenbankeinträgen abzugleichen. Um diese Datenbankeinträge vorzunehmen ist es allerdings essentiell, die Art sicher benennen zu können, um spätere Falschidentifizierungen zu vermeiden.

In den vergangenen Jahren hat sich die Genomsequenzierung (WGS, engl. *whole genome sequencing*) als eine vielversprechende Technologie entwickelt, die dazu dient die Taxonomie exakt zu erfassen und einen umfassenden Blick auf genetische Informationen der Bakterien zu erhalten (Bertelli & Greub, 2013; Tagini & Greub, 2017). Seit der ersten bakteriellen Genomsequenzierung im Jahr 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1995) hat sie einen weiten Weg zurückgelegt. Dank der Hochdurchsatzsequenzierung ist die Methode mittlerweile schnell und günstig genug, um weit verbreitet zu sein (Bertelli & Greub, 2013; Tagini & Greub, 2017). Die Genomsequenzierung eröffnet neue Möglichkeiten, Informationen über Bakterien zu erhalten, wie beispielsweise die Analyse von Virulenzen und Antibiotikaresistenzen, was besonders zur Einschätzung der hygienischen Relevanz von Bakterien essentiell ist. Mit dieser Methode können zudem Stoffwechselwege rekonstruiert werden (Francke *et al.*, 2005). Außerdem kann anhand des Genoms die durchschnittliche Nukleotididentität (ANI, engl. *average nucleotide identity*) berechnet werden, wodurch erkennbar wird, ob Stämme der gleichen Art zuzurechnen sind. Beträgt der ANI-Wert zwischen zwei Stämmen >95–96 % werden diese als eine bakterielle Spezies angesehen, für Subspezies liegt dieser bei >98 % (Richter & Rosselló-Móra, 2009; Sutton *et al.*, 2018). Mithilfe dieser Methode kann daher die Taxonomie eindeutig bestimmt werden.

Eine sichere Identifizierung von Bakterien ist notwendig, um deren klinische oder hygienische Relevanz einordnen zu können. In der Praxis kann es hilfreich sein, mehrere Methoden anzuwenden, um die Identifizierung zu verifizieren und zu garantieren. Gerade für die coliformen Bakterien ist die Taxonomie nicht immer eindeutig und die Identifizierung komplex, in diesem Fall ist es nötig, Methoden untereinander zu vergleichen und mit Genomuntersuchungen abzugleichen, um Falschidentifizierungen zu vermeiden.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war es, das Phänomen der erhöhten Konzentrationen coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren zu verstehen, die Ursachen dahinter aufzuklären, sowie festzustellen, inwieweit eine mögliche Gesundheitsgefährdung durch die coliformen Bakterien besteht.

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden:

- Welche Methode ist geeignet, um die talsperren-relevanten Stämme eindeutig zu typisieren und identifizieren?
- Welche Arten coliformer Bakterien kommen vor?
- Wie verändert sich die mikrobielle Gemeinschaft zu Zeiten mit hohen Konzentrationen coliformer Bakterien?
- Handelt es sich um eine fäkale, allochthone oder eine natürliche, autochthone Quelle aus der die coliformen Bakterien stammen?
- Welche Faktoren beeinflussen dieses Phänomen?
- Welche Wachstumsbedingungen benötigen die coliformen Bakterien?
- Wie ist die hygienische Relevanz der coliformen Bakterien zu bewerten?
- Wie sind die Bakterien an ihre oligotrophe Umwelt angepasst?
- Welche Konsequenzen ergeben sich für die Wasserversorger?

Um diese Ziele zu erreichen, wurde in einem ersten Schritt ein zweijähriges Monitoringprogramm in zwei Trinkwassertalsperren durchgeführt. Hierbei wurden coliforme Bakterien, sowie die Fäkalindikatorbakterien *E. coli* und Enterokokken quantifiziert und identifiziert. Die Identifizierung erfolgte mit der Massenspektrometrie, sowie molekularbiologischen Methoden. Darüber hinaus wurden die mikrobielle Gemeinschaft, sowie Microbial Source Tracking Marker in ausgewählten Proben analysiert. Beprobungen in Wasserwerken, die Rohwasser aus Talsperren nutzen, dienten der Überprüfung der Trinkwasseraufbereitung, sowie Trinkwasserqualität. Darüber hinaus wurde eine statistische Datenanalyse, sowie Vermehrungsversuche mit aus den Talsperren isolierten coliformen Bakterien durchgeführt, um die Faktoren hinter der Vermehrung zu ermitteln. Zum Abschluss wurde das Genom dieser Isolate analysiert, um mögliche Anpassungen der Bakterien an ihren oligotrophen Lebensraum festzustellen, sowie deren hygienische Relevanz zu untersuchen.

Die Arbeit sollte helfen, zukünftige Befunde einordnen zu können und die aktuell vorherrschenden Probleme bei der Bewertung zu lösen. Es sollte geklärt werden, was es bedeutet, dass einzelne Arten coliformer Bakterien massenhaft in Rohwasser nachgewiesen werden und inwieweit tatsächlich eine Gefährdung der Gesundheit vorliegt. Ziel war es, Hilfestellung bei der Bewertung von Befunden im Trinkwasser zu geben und der derzeit vorherrschenden Unsicherheit gerade in Bezug auf coliforme Bakterien begegnen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Während dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 beschriebenen Chemikalien, Kits und Geräte genutzt.

**Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien und Kits.**

Chemikalien und Kits	Hersteller
Acetonitril >99,9 %	Merck Millipore, Darmstadt
Ameisensäure >98 %	Merck Millipore, Darmstadt
Bruker Bacterial Test Standard (BTS)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Bruker Matrix $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Bruker Standard Solvent	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Ethanol $\geq$ 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol 80 %	Merck Millipore, Darmstadt
FastDNA™ Spin Kit for Soil	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Formaldehyd 36 %	Merck Millipore, Darmstadt
H <sub>2</sub> O, nuklease-frei	gibco® life technologies™, Carlsbad, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
innuPREP PCRpure Kit	Analytik Jena, Jena
McFarland BSS 0,5	Roth, Karlsruhe
MyTaq™ Red Mix	Bioline Reagents Ltd, London, UK
Trifluoressigsäure	Merck Millipore, Darmstadt

**Tabelle 2.2 Verwendete Geräte.**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Extraktionsgerät	MP FastPrep®-24	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Durchflusszytometer	BIO-Rad S3 Cell Sorter	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Kapillarelektrophorese-Gerät	QIAXcel Advanced System	Qiagen, Venlo, Niederlande
MALDI-TOF	Microflex LT	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Quanti-Tray® Sealer	Model 2X	IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA

#### 2.1.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Sie wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) in lyophilisierter Form bezogen. Vor dem Gebrauch wurden sie mit nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Ihre Lagerung erfolgte bei –20 °C.

**Tabelle 2.3 Verwendete Primer.**

Primer*	Ziel-sequenz	Sequenz (5' → 3')	T <sub>M</sub> (°C)	Literatur
(GTG) <sub>5</sub>		GTG GTG GTG GTG GTG	40	Doll <i>et al.</i> (1993)
atpD 01-F		RTA ATY GGM GCS GTR GTN GAY GT	56–71	
atpD 02-R	<i>atpD</i>	TCA TCC GCM GGW ACR TAW AYN GCC TG	61–72	
gyrB 01-F		TAA RTT YGA YGA YAA CTC YTA YAA AGT	48–61	Brady <i>et al.</i> (2008)
gyrB 02-R	<i>gyrB</i>	CMC CYT CCA CCA RGT AMA GTT	56–66	
infB 01-F		ATY ATG GGH CAY GTH GAY CA	51–66	
infB 02-R	<i>infB</i>	ACK GAG TAR TAA CGC AGA TCC A	57–61	
rpoB CM7-F		AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG	68	
rpoB M31b-R	<i>rpoB</i>	CCT GAA CAA CAC GCT CGG A	62	

\* F: Forward-Primer; R: Reverse-Primer

### 2.1.3 Stämme

Während dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.4 genannten Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und der National Collection of Type Cultures (NCTC) verwendet. Der Stamm *Lelliottia aquatilis* 6331-17<sup>T</sup> stammt aus einem Trinkwasserverteilsystem (Kämpfer *et al.*, 2018) und wurde vom Wahnbachtalsperrenverband zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden Stämme aus der internen Sammlung verwendet, welche aus Talsperren oder weiteren Wasserproben isoliert wurden (Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.4 Verwendete Stämme aus der Stammsammlung.**

Art	Stamm	Herkunft
<i>Enterobacter asburiae</i>	DSM 17506	Klinische Probe
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	Klinische Probe
<i>Enterobacter roggenkampii</i>	DSM 16690	Menschl. Fäkalien
<i>Lelliottia amnigena</i>	DSM 4486	Erde
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	DSM 18955	Pflanzen
<i>Lelliottia aquatilis</i>	6331-17	Wasser
<i>Serratia fonticola</i>	DSM 4576	Wasser
<i>Serratia marcescens</i>	NTCT 13920	Klinische Probe

**Tabelle 2.5 Verwendete Stämme aus der internen Sammlung.**

Art	Stammbezeichnung Intern	Stammbezeichnung Extern/Genom
<i>Enterobacter asburiae</i>	14D0743	TZW05
<i>Enterobacter asburiae</i>	BRE 191021-24	TZW10
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 1.12	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 1.16	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 1.17	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 1.7	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 1.9	TZW06
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 3.4	TZW07
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 4.1	TZW03
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 4.18	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	BS 4.19	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	EOH RBS 3A	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	EOH WRO 2D	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	EOH WRO-1C	TZW08
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB04 18D1053-04	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB04 18D1054-13	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB10 18D1860-02	TZW01
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB26 11-27	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB37 20-07	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	KGB37 20-08	TZW02
<i>Enterobacter asburiae</i>	Peru 06-01	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	WAG ROW 14-02	TZW09
<i>Enterobacter asburiae</i>	WAG ROW 14-05	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	WAG Zufluss DLB 12-12	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	WKK14 06-02	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	WTV 2018T05827A	TZW04
<i>Enterobacter asburiae</i>	WTV 2018T05827B	TZW11
<i>Enterobacter asburiae</i>	WTV 2018T05827C	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	WTV 2018T05827D	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	15D1217-1	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	KGB02 18D0844-06	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	KGB23 19D0851-07	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	TS Schoenbrunn	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Vietnam 07-01	-
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Vietnam 32-18	-



<b>Art</b>	<b>Stammbezeichnung Intern</b>	<b>Stammbezeichnung Extern/Genom</b>
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D0711-1	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D0717-4	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D0717-5	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D0901-1	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D1218-2	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	15D1313-1AW	-
<i>Enterobacter ludwigii</i>	19D0459-1-1	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	15D0906-2	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	15D1204-2	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	15D1207-3	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	KGB02 18D0844-02	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	KGB02 18D0844-05	TZW14
<i>Lelliottia amnigena</i>	Soese 191028	TZW16
<i>Lelliottia amnigena</i>	Soese 191030	TZW15
<i>Lelliottia amnigena</i>	WKK03 04-01	TZW12
<i>Lelliottia amnigena</i>	WKK03 11-02	-
<i>Lelliottia amnigena</i>	WKK33 06-06	TZW13
<i>Lelliottia aquatilis</i>	15D1214-1	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	KGB02 18D0844-08	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	KGB02 18D0851-01	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	WKK01 04-06	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	WKK03 04-04	TZW17
<i>Lelliottia aquatilis</i>	WTV SP407 2 E	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	WTV SP407 2 F	-
<i>Lelliottia aquatilis</i>	WTV SP407 2 G	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	15D0906-1	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	Bi 2-1	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	Bi 6	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	KGB04 18D1052-07	-
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	LW 1	-
<i>Serratia fonticola</i>	19D0673-02	TZW20
<i>Serratia fonticola</i>	WKK25 06-09	TZW18
<i>Serratia fonticola</i>	WKK25 06-11	TZW19
<i>Serratia marcescens</i>	WKK25 06-03	TZW21

## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Chromocult®-Coliformen-Agar (CCA)

Der Chromocult®-Coliformen-Agar (CCA) dient der Kultivierung und Auszählung von *E. coli* und coliformen Bakterien nach der ISO-Norm 9308-1 (2017). Er beruht auf der Fähigkeit coliformer Bakterien zur Spaltung von 6-Chloro-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (Salmon-GAL) in Verbindung mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) durch das für coliforme Bakterien spezifische Enzym  $\beta$ -D-Galactosidase. Dies führt zu einer lachsfarbenen Färbung der Kolonien. Für den Nachweis von *E. coli* wird zusätzlich die Spaltung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid (X-Glucuronid) durch die  $\beta$ -D-Glucuronidase genutzt. Es kommt zu einer dunkelblauen bis violetten Färbung. Bakterien die nicht zu den coliformen Bakterien gehören, sind farblos oder türkis. Zur Hemmung von grampositiven Bakterien ist im Nährmedium außerdem Natriumheptadecylsulfat (Tergitol® 7) enthalten. Die genauen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2.6 dargestellt. Für die Herstellung wurden 26,5 g CCA (Merck, Darmstadt) in 1 Liter dH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert auf  $6,8 \pm 0,2$  eingestellt. Anschließend wurde er im Wasserbad bei 95 °C für etwa 30 Minuten unter Umrühren erhitzt, bis er vollständig gelöst war. Danach wurde er im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm gegossen.

**Tabelle 2.6 Zusammensetzung des CCA.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Casein (enzymatisch verdaut)	1,0
Hefeextrakt	2,0
NaCl	5,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,7
Natriumpyruvat	1,0
Sorbitol	1,0
Tryptophan	1,0
Tergitol® 7	0,15
6-Chloro-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranoside	0,2
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronid	0,1
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	0,1
Agar-Agar	10,0
<b>Gesamtmenge</b>	<b>26,45</b>

### 2.2.2 Galle-Äsculin-Azid-Agar (GÄA-Agar)

Der Galle-Äsculin-Azid-Agar (GÄA-Agar) ist ein Selektivagar zum Nachweis und zur Keimzahlbestimmung von Enterokokken. Genutzt wird hierbei die Fähigkeit von Enterokokken Äsculin zu hydrolysieren (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Dabei entsteht Cumarin, welches sich mit dem im Medium enthaltenen Eisen(III)-Ionen zu einer dunklen Verbindung zusammensetzt. Die Bestandteile Galle und Natriumazid sollen das Wachstum der Begleitflora hemmen. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 2.7 zu sehen. Hierfür wurde der GÄA-Agar (Sifin Diagnostics GmbH, Berlin) nach Herstellerangaben in 1 Liter dH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert auf  $7,1 \pm 0,2$  eingestellt. Daraufhin konnte das Medium autoklaviert, auf 45 °C im Wasserbad abgekühlt und in kleine Petrischalen gegossen werden.

**Tabelle 2.7 Zusammensetzung des GÄA-Agars.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Caseinpepton (Trypton)	17,0
Pepton	3,0
Hefeextrakt	5,0
Ochsengalle, getrocknet	10,0
Natriumchlorid	5,0
Äsculin	1,0
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5
Natriumazid	0,15
Agar-Agar	12,0
<b>Gesamtmenge</b>	<b>53,65</b>

### 2.2.3 Hirn-Herz-Agar (HH-Agar)

Der Hirn-Herz-Agar (HH-Agar) ist ein Nährmedium zur Kultivierung von anspruchsvollen Bakterien. Deren Bedarf an Nährstoffen wird durch das enthaltene Hirn- und Herzextrakt sowie das Pepton gedeckt. Verwendet wurden der HH-Agar und die HH-Bouillon der Firma Merck (Darmstadt). Die genauen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2.8 dargestellt, wobei der HH-Agar zusätzlich 15 g Agar enthält. Es wurden nach Herstellerangaben 52 g des HH-Agars mit 1 Liter dH<sub>2</sub>O gemischt, der pH-Wert auf  $7,4 \pm 0,2$  eingestellt und anschließend autoklaviert. Danach konnte er im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt werden und Platten gegossen werden. Die HH-Bouillon war schon anwendungsfertig zu je 9 ml im Reagenzglas vorhanden.

**Tabelle 2.8 Zusammensetzung des HH-Mediums.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Nährsubstanz (Hirn-Herzextrakt und Pepton)	27,5
D(+)-Glucose	2,0
Natriumchlorid	5,0
Di-Natriumhydrogenphosphat	2,5
<b>Gesamtmenge</b>	<b>37</b>

## 2.2.4 Mueller-Hinton-Agar (MH-Agar)

Der Mueller-Hinton-Agar diente der Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber Antibiotika mittels Agardiffusionstest. Verwendet wurden der MH-Agar der Firma Roth (Karlsruhe) und die MH-Bouillon der Firma Sifin Diagnostics GmbH (Berlin). Die genauen Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2.9 dargestellt, wobei der MH-Bouillon keinen Agar enthielt. Es wurden nach Herstellerangaben 38 g des MH-Agars mit 1 Liter dH<sub>2</sub>O gemischt und anschließend autoklaviert. Danach konnte er im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt werden und Platten gegossen werden. Die MH-Bouillon war schon anwendungsfertig zu je 9 ml im Reagenzglas vorhanden.

**Tabelle 2.9 Zusammensetzung des MH-Agars.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Rinderfleisch, getrocknete Infusion	2
Caseinhydrolysat	17,5
Maisstärke	1,5
Agar	17
<b>Gesamtmenge</b>	<b>38</b>

## 2.2.5 Nähragar nach dem Deutschen Einheitsverfahren (DEV-Agar)

DEV-Nähragar ist ein vom Deutschen Einheitsverfahren (DEV) vorgegebener Agar zur Kultivierung unterschiedlicher Bakterien und wird unter anderem für die Bestimmung der Koloniezahl verwendet. Zur Herstellung wurden 43 g des Mediums (Merck, Darmstadt) auf einen Liter dH<sub>2</sub>O abgewogen. Der pH-Wert wurde auf  $7,3 \pm 0,2$  eingestellt und das Ganze bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Für das Gussplattenverfahren wurde dieser anschließend bis zur Verwendung gelagert. Zur Anzucht coliformer Bakterien wurden zudem Platten benötigt, hierfür wurde das Medium nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt und Platten gegossen. Die Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2.10 dargestellt.

**Tabelle 2.10 Zusammensetzung des DEV-Agars.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Pepton aus Fleisch	10
Fleischextrakt	10
Natriumchlorid	5
Agar-Agar	18
<b>Gesamtmenge</b>	<b>43</b>

### 2.2.6 Reasoner's 2A-Agar (R2A-Agar)

Der Reasoner's 2A-Agar (R2A-Agar) dient zur Bestimmung der Koloniezahl. Mit diesem Agar kann eine Vielzahl von heterotrophen Trinkwasserbakterien erfasst werden (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Dies liegt an seinem niedrigen Nährstoffgehalt, der langen Bebrütungszeit von sieben Tagen und der niedrigen Bebrütungstemperatur von lediglich 22 °C. Die Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2.11 festgehalten. Für den R2A-Agar wurde das Fertigpulver (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben mit 1 Liter dH<sub>2</sub>O vermischt und der pH-Wert eingestellt auf 6,8 ± 0,2. Anschließend wurde das Medium autoklaviert und bis zur Verwendung gelagert.

**Tabelle 2.11 Zusammensetzung des R2A-Agars.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Hefeextrakt	0,5
Proteose-Pepton	5,0
Caseinhydrolysat	0,5
Glucose	0,5
Stärke löslich	0,5
Natriumpyruvat	0,3
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,3
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,05
Agar-Agar	12,5
<b>Gesamtmenge</b>	<b>20,15</b>

### 2.2.7 Slanetz + Bartley-Agar (S+B-Agar)

Der Slanetz + Bartley-Agar (S+B-Agar) dient als Nachweis von Enterokokken nach dem Prüfverfahren DIN EN ISO 7899-2 (2000). Das im Medium enthaltene Natriumazid fungiert hierbei als Hemmstoff für gramnegative Organismen. Das farblose 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid wird bei Wachstum von Enterokokken zu rotem Formazan reduziert. Daher erscheinen diese auf diesem Agar als rötliche Kolonien. Die genauen Komponenten des Nährmediums sind in Tabelle 2.12 festgehalten. Das Medium wurde laut Herstellerangaben in 1 Liter dH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert auf 7,2 ± 0,2 eingestellt (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel). Es wurde im Dampfkochtopf für etwa 20 Minuten unter mehrmaligem Schwenken bis zum Lösen gekocht, anschließend im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm gegossen.

**Tabelle 2.12 Zusammensetzung des S+B-Agars.**

<b>Stoff</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>
Tryptose	20,0
Hefeextrakt	5,0
Glucose	2,0
Di-Kaliumhydrogenphosphat	4,0
Natriumazid	0,4
Tetrazoliumchlorid	0,1
Agar-Agar	10,0
<b>Gesamtmenge</b>	<b>41,5</b>

### 2.2.8 Waschpuffer

Der Waschpuffer diente dazu, das angereicherte Wasser aus den Anreicherungsmodulen zu eluieren. Dieser besteht aus einem 0,1 %igen Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,4) mit 0,01 %igem Natriumpolyphosphat.

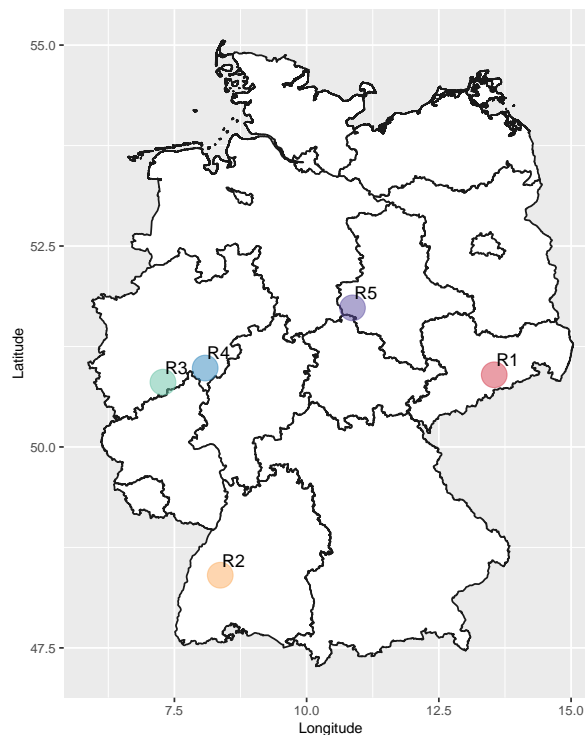
## 2.3 Untersuchungsprogramm

### 2.3.1 Untersuchte Trinkwassertalsperren

Hohe Konzentrationen coliformer Bakterien wurden in vielen Trinkwassertalsperren und Seen in Deutschland festgestellt. Aus diesem Grund wurde in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig ein ausführliches Monitoringprogramm durchgeführt (Kapitel 2.3.2). Die Talsperren wurden ausgewählt, da in beiden in den vorangegangenen Jahren hohe Konzentrationen coliformer Bakterien nachgewiesen wurden. Zudem sind sie sich von der Größe her ähnlich, aber ansonsten verschieden und können als typisch schwach mesotrophe (Klingenberg) und oligotrophe (Kleine Kinzig) Trinkwassertalsperren angesehen werden.

Zusätzlich wurde eine ausführliche Datenanalyse (Kapitel 2.10) durchgeführt, in der mikrobiologische, sowie physikalisch-chemische Daten untersucht wurden. Diese Daten wurden von den Wasserversorgern zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden die beiden zuvor genannten Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig untersucht, sowie drei weitere Talsperren (Wahnbach, Breitenbach, Rappbode). Die Lage der fünf Talsperren kann Abbildung 2.1 entnommen werden, weitere Informationen über die fünf Talsperren wurden in Tabelle 2.13 zusammengestellt.

Um zudem zu überprüfen, inwieweit sich das Bild des Monitoringprogramms in anderen Talsperren bestätigen lässt, wurden zu ausgewählten Zeitpunkten weitere Talsperren beprobt und die coliformen Bakterien quantifiziert und identifiziert. Hierfür wurden von den Wasserversorgern entweder Wasserproben, bewachsene Colilert-Trays oder Isolate coliformer Bakterien zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden, wie später beschrieben, behandelt und die Isolate mittels MALDI-TOF MS und anschließender MLSA identifiziert. Untersucht wurden die folgenden Talsperren und Seen: Wahnbach, Rappbode, Breitenbach, Söse, Obersee (Rur) und der Bodensee.



**Abbildung 2.1** Im Rahmen der Datenanalyse untersuchte Trinkwassertalsperren.

Lage der fünf untersuchten Talsperren innerhalb Deutschlands. Untersucht wurden die Talsperren Klingenberg (R1), Kleine Kinzig (R2), Wahnbach (R3), Breitenbach (R4) und Rappbode (R5).

**Tabelle 2.13 Informationen über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Talsperren.**

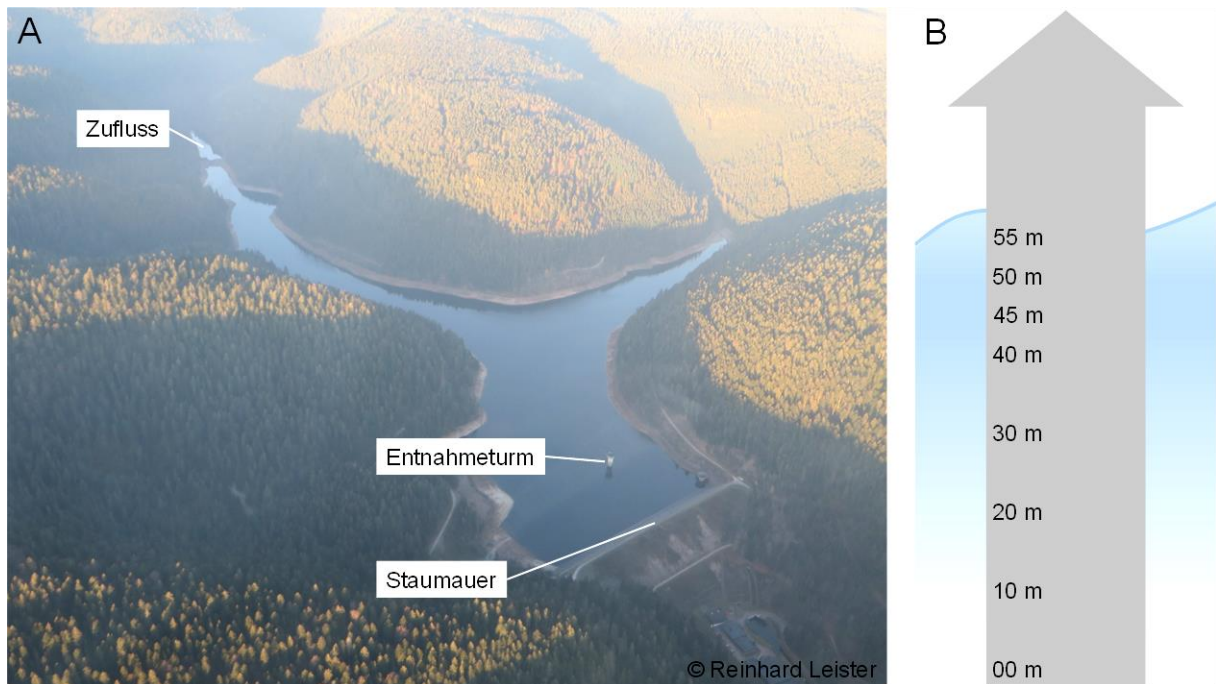
	<b>Klingenberg (R1)</b>	<b>Kleine Kinzig (R2)</b>	<b>Wahnbach (R3)</b>	<b>Breitenbach (R4)</b>	<b>Rappbode (R5)</b>
<b>Bundesland</b>	Sachsen	Baden- Württemberg	Nordrhein- Westfalen	Nordrhein- Westfalen	Sachsen- Anhalt
<b>Region</b>	Erzgebirge	Schwarzwald	Bergisches Land	Rothaar- gebirge	Harz
<b>Flussgebiets- einheit</b>	Elbe	Rhein	Rhein	Rhein	Elbe
<b>Höhe Oberfläche</b>	390 müNN	605 müNN	124 müNN	370 müNN	423 müNN
<b>Grundlevel</b>	359,7 müNN	544 müNN	78 müNN	335 müNN	360 müNN
<b>Entnahmehöhe</b>	360,2–385 müNN	544–599,3 müNN	80–113 müNN	343–355,1 müNN	360–400 müNN
<b>Tiefe (Ø)</b>	15 m	22 m	21 m	14 m	29 m
<b>Tiefe (max.)</b>	33 m	65 m	46 m	35 m	89 m
<b>Oberfläche</b>	116 ha	56 ha	200 ha	58 ha	390 ha
<b>Kapazität</b>	16 Mio m <sup>3</sup>	13 Mio m <sup>3</sup>	41,3 Mio m <sup>3</sup>	8 Mio m <sup>3</sup>	110 Mio m <sup>3</sup>
<b>Wasserentnahme</b>	1000 l/s	200 l/s	1000 l/s	190 l/s	2900 l/s
<b>Verweilzeit</b>	120 d	190 d	365 d	290 d	380 d
<b>Einzugsgebiet</b>	90 km <sup>2</sup> (Wald, Wiesen, Felder)	18 km <sup>2</sup> (Wald)	71,5 km <sup>2</sup> (Grünland, Acker, Wald)	12 km <sup>2</sup> (Wald)	115 km <sup>2</sup> (Wald)
<b>Ökologie</b>	oligo-/ schwach mesotroph	oligotroph	oligo-/ schwach mesotroph	oligo-/ schwach mesotroph	mesotroph
<b>Geologie</b>	Gneis	Sandstein	Tonschiefer, Sandstein, Grauwacke	Schiefer, Grauwacke	Granit

### 2.3.2 Talsperrenmonitoring in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Roh- und das Oberflächenwasser der zwei Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig über einen Zeitraum von zwei Jahren (2018–2019) regelmäßig beprobt. Die mikrobiologische Untersuchung (coliforme Bakterien, *E. coli*, Enterokokken, Koloniezahl, Gesamtzellzahl) sowie Identifizierung der Bakterien erfolgte wie in späteren Abschnitten dieser Arbeit genauer beschrieben.

Das Untersuchungsprogramm an der Talsperre Kleine Kinzig umfasste den Zeitraum Juni 2018 bis Dezember 2019, bei einem zweiwöchigen Messintervall. Die Probenahme an der Talsperre Kleine Kinzig wurde am Probenahmeturm durchgeführt, welcher sich 151 m von der Staumauer entfernt befindet (Abbildung 2.2). Dieser Turm verfügt über sieben Entnahmehorizonten, welche sich zwischen dem Grund der Talsperre (544 müNN) bis hin zur Oberfläche 55 m höher (599,3 müNN) befinden. Die Entnahmehöhe des Rohwassers variiert je nach Saison und physikalischen Bedingungen. Während dieser Arbeit wurde das Rohwasser aus 20 bis 30 m über Grund entnommen. Lediglich im Januar 2019 war die Entnahmehöhe höher (45,3 m über Grund) aufgrund von hohen Trübungswerten. Das Oberflächenwasser wurde aus dem höchstmöglichen Entnahmehorizont entnommen, welcher aufgrund des Füllstandes der Talsperre zwischen 45,3 und 55,3 m über Grund schwankte.

Das Untersuchungsprogramm an der Talsperre Klingenberg umfasste den Zeitraum April 2018 bis Dezember 2019, bei einem monatlichen Messintervall. An der Talsperre Klingenberg



**Abbildung 2.2 Übersicht über die Talsperre Kleine Kinzig mit Entnahmeturm.**

(A) Exemplarisch ist hier die Talsperre Kleine Kinzig mit ihrem Zufluss, Entnahmeturm, sowie der Staumauer gezeigt. Der Entnahmeturm befindet sich 151 m von der Staumauer entfernt © Reinhard Leister. (B) Dargestellt ist der Entnahmeturm mit den jeweiligen Entnahmehorizonten.

befindet sich die Probenahmestelle direkt an der Staumauer und besteht aus sechs Entnahmehorizonten, die sich zwischen dem Grund (360,2 müNN) bis hin zu 25,3 m über Grund (385 müNN) erstrecken. Die Entnahmehöhe des Rohwassers lag während der gesamten Probenahme bei 360,2 müNN. Das Oberflächenwasser wurde aus dem höchsten Entnahmehorizont entnommen. Bei dieser Talsperre war es ebenfalls möglich, die Zuflüsse zu untersuchen. Zusätzlich zum Roh- und Oberflächenwasser wurden in der Talsperre Klingenberg alle Entnahmehorizonte des Tiefenprofils (380 müNN, 375 müNN, 371 müNN, 367 müNN) untersucht. Die grafische Darstellung des Tiefenprofils erfolgte – analog zu den physikochemischen Daten – wie in Kapitel 2.10 beschrieben.

### 2.3.3 Probenahmekampagne an der Talsperre Klingenberg

Im Jahr 2018 wurde zusätzlich zum Monitoringprogramm eine Probenkampagne an der Talsperre Klingenberg durchgeführt. Hierfür wurden einmal zu einem Zeitpunkt mit niedrigen (Juni 2018), einmal mit hohen Konzentrationen coliformer Bakterien (September 2018) Proben genommen. Es wurde das Tiefenprofil, die Zuflüsse, sowie verschiedene Stelle des Stausees untersucht und die coliformen Bakterien quantifiziert und identifiziert. Dies sollte klären, inwieweit sich die hohen Konzentrationen coliformer Bakterien in der kompletten Talsperre nachweisen lassen.

### 2.3.4 Beprobung der mikrobiellen Gemeinschaft und Fäkalmarker

Zum Zeitpunkt der Probenahmekampagne wurden zudem zwei Liter Proben von ausgewählten Stellen der Talsperre Klingenberg genommen, um die Fäkalmarker, sowie die mikrobielle Gemeinschaft zu untersuchen. Bei der Talsperre Kleine Kinzig erfolgte die Probenahme im Juni, sowie Dezember 2019 aus dem Tiefenprofil. Die Proben wurden vorbehandelt und die DNA extrahiert, wie im späteren Abschnitt (Kapitel 2.7) beschrieben.

### 2.3.5 Beprobung von anderen Wasserproben

Um die Erkenntnisse aus den Talsperren im Vergleich zu anderen Wässern zu betrachten, wurden zudem 18 Trinkwasser-, 6 Seewasser-, 4 Flusswasser- und 4 Abwasserproben untersucht (Tabelle 2.14). Hierfür wurden coliforme Bakterien und *E. coli* in den Proben quantifiziert, sowie im Anschluss mit dem MALDI-TOF identifiziert. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den Trinkwasserproben zum Teil um Anreicherungsproben handelte. Zudem wurden lediglich Trinkwasserproben mit einbezogen, die einen Positivnachweis coliformer Bakterien aufwiesen, um im Anschluss die Möglichkeit zu haben, die coliformen Bakterien identifizieren zu können.

**Tabelle 2.14 Überblick über die untersuchten Trink-, See-, Fluss- und Abwässer.**

<b>Wasser</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Probenahmedatum</b>
Trinkwasser	Wasserwerk 1 (Hochbehälter A)	14.05.2018
	Wasserwerk 1 (Netzprobe)	20.06.2018
	Wasserwerk 1 (Hochbehälter A)	23.07.2018
	Wasserwerk 1 (Hochbehälter B)	06.08.2018
	Wasserwerk 1 (Hochbehälter A)	27.08.2018
	Wasserwerk 1 (Hochbehälter C)	17.09.2018
	Wasserwerk 2 (Netzprobe)	26.06.2018
	Wasserwerk 3 (Hochbehälter)	26.06.2018
	Wasserwerk 3 (Hochbehälter)	06.08.2018
	Wasserwerk 4 (Netzprobe)	02.07.2018
	Wasserwerk 5 (Pumpwerk)	03.07.2018
	Wasserwerk 6 (Netzprobe)	10.07.2018
	Wasserwerk 7 (Wasserwerk)	03.08.2018
	Wasserwerk 8 (Hochbehälter A)*	07.08.2018
	Wasserwerk 8 (Hochbehälter B)*	07.08.2018
	Wasserwerk 8 (Hochbehälter C)*	07.08.2018
	Wasserwerk 8 (Hochbehälter D)*	07.08.2018
	Wasserwerk 9 (Netzprobe)	17.08.2018
Seewasser	Weingarten	11.10.2020
	Stutensee	11.10.2020
	Leopoldshafen	11.10.2020
	Fuchs & Gros Eggenstein	11.10.2020
	Jägerhaussee Nord	11.10.2020
	Jägerhaussee Süd	11.10.2020
Flusswasser	Main	15.05.2018
	Rhein	11.10.2020
	Rhein	01.02.2021
Abwasser	Kläranlage A	01.02.2021
	Kläranlage B	01.02.2021
	Kläranlage C	01.02.2021
	Kläranlage D	01.02.2021

\* Anreicherung

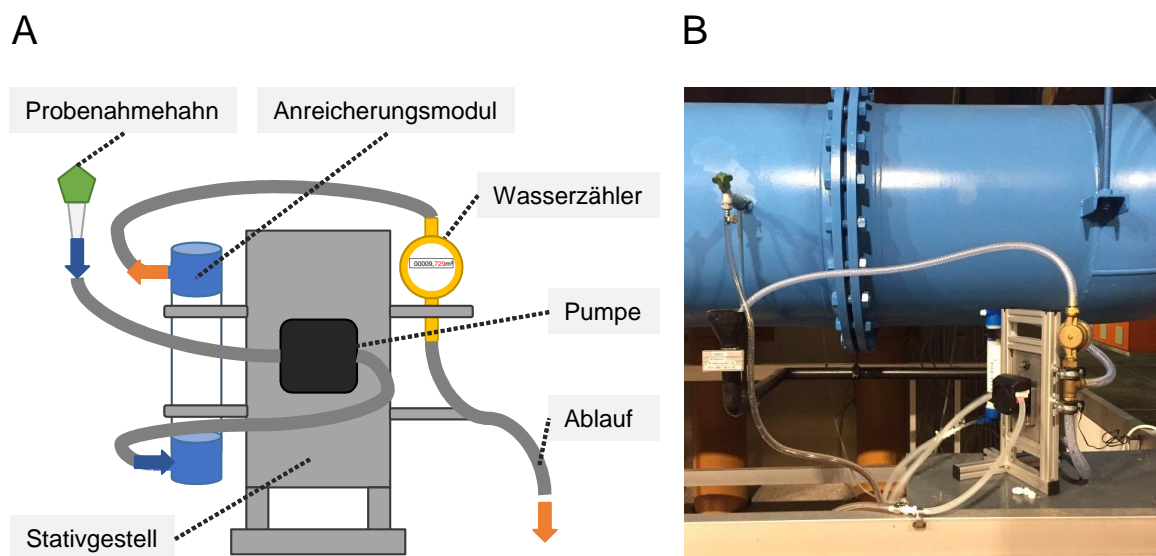


### 2.3.6 Beprobung im Wasserwerk

Um zu überprüfen, inwieweit die Trinkwasseraufbereitung mit den hohen Konzentrationen coliformer Bakterien umgehen kann, wurden zu ausgewählten Zeitpunkten vier Wasserwerken beprobt und die coliformen Bakterien je nach Wasserwerk im Rohwasser, nach bestimmten Aufbereitungsschritten bis hin zum Reinwasser nach der Abschlussdesinfektion untersucht. Da hierfür die ansonsten übliche Menge von 100 ml nicht ausreichend ist, wurden Anreicherungen von bis zu 100 Liter Wasser durchgeführt. Lediglich in Wasserwerk 4 konnten keine Anreicherungen durchgeführt werden, weswegen stattdessen 10 Liter Wasser mittels Membranfiltration untersucht wurden. Für das Wasserwerk 2 wurden die kompletten Anreicherungsuntersuchungen eigenständig durchgeführt. Bei den anderen Wasserwerken erfolgten Teile der Analysen durch die Wasserversorgungsunternehmen vor Ort.

Für die Anreicherung wurden Anreicherungsmodule (Helixone® High Flux FX 80 classic, Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA, Bad Homburg v. d. Höhe) in ein Stativgestell gestellt und anschließend an den Probehahn der Wasserwerke angebracht (Abbildung 2.3). Ein Wasserzähler diente der Überprüfung der durchflossenen Wassermenge, bei niedrigem Wasserdruck wurde zudem die durchflossene Wassermenge ausgelitert. Bis zur Ankunft im Labor wurden die Module gekühlt gelagert.

Zur Eluierung wurde das restliche Wasser, welches sich noch in den Modulen befand, mithilfe einer Wasserstrahlpumpe aus dem Ablauf abgesaugt. Anschließend konnte das Modul mit gewaschen und eluiert werden. Hierfür wurde das Modul im Stativgestell angebracht und an den Ablauf eine Absaugflasche angeschlossen, welche wiederum an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde. Der Schlauch zwischen Modul und Absaugflasche war mit einer Schlauchklemme versehen. Der Waschpuffer wurde mittels Spritze in den Filterzulaufschlauch des Moduls eingefüllt. Sobald die Luft aus dem Modul entwichen war, wurde die Schlauchklemme geschlossen und das Modul komplett mit Waschpuffer gefüllt. Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurde die Schlauchklemme wieder geöffnet und die Spüllösung vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Volumen der Rückspüllösung wurde notiert. Anschließend konnten die Proben mit dem Colilert angesetzt werden, sowie am folgenden Tag die coliformen Bakterien mit dem MALDI-TOF identifiziert werden.



**Abbildung 2.3 Aufbau der Anreicherungsapparatur.**

(A) Schematische Darstellung der Anreicherungsapparatur. Zuläufe sind in blau, Abläufe in orange dargestellt. (B) Aufbau der Anreicherungsapparatur im Wasserwerk.

## 2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1 Membranfiltration

Die Membranfiltration dient der Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) in 100 ml einer Wasserprobe. Für die Filtration wurden zuerst die Filtrationsleiste und eine Pinzette mit einer Abflampistole abgeflammt. Dann konnten die Membranfilter (EZ-Pak, Merck Millipore, Darmstadt, Porenweite 0,45 µm, Durchmesser 47 mm) und die Trichteraufsätze aufgebracht werden. Anschließend konnte die Probe in den Trichteraufsatz gefüllt werden. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde die Probe angesaugt und auf dem Membranfilter angereichert, während das verbleibende Wasser abgesaugt wurde. Zum Spülen wurde daraufhin noch mit dH<sub>2</sub>O nachgespült. Dann konnte der Membranfilter luftblasenfrei auf den jeweiligen Agar überführt werden.

Nach der Bebrütung wurden die Kolonien gezählt, wobei die Koloniezahl zwischen 10 und 200 Kolonien liegen sollte. Die Auswertung erfolgte dabei nach folgender Formel (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008).

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} V_s$$

Dabei ist:

$C_s$	die berechnete Anzahl an KBE im Referenzvolumen $V_s$ der Probe
$Z$	die Summe aller gezählten Kolonien auf den Platten oder Membranfiltern verschiedener Verdünnungen $d_1, d_2, \dots, d_i$ oder verschiedener Volumina der Untersuchungsprobe (Probe oder Verdünnung)
$V_s$	das gewählte Referenzvolumen zur Angabe der Konzentration der Mikroorganismen in einer Probe
$V_{tot}$	das berechnete Gesamtvolumen der Originalprobe in den ausgezählten Platten. $V_{tot}$ ist entweder die Summe der einzelnen Volumina der Untersuchungsprobe oder wird nach der Gleichung berechnet:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$$

Dabei ist:

$V_{tot}$	das berechnete Gesamtvolumen der Ausgabeprobe in den ausgezählten Platten
$n_1, n_2, \dots, n_i$	die Anzahl der Platten je Verdünnungsstufe
$V_1, V_2, \dots, V_i$	das eingesetzte Volumen der jeweiligen Verdünnung
$d_1, d_2, \dots, d_i$	die Verdünnung der Probe ( $d = 1$ für eine unverdünnte Probe, $d = 0,1$ für eine 1:10 Verdünnung, usw.)

#### 2.4.1.1 Nachweis von Enterokokken nach der DIN EN ISO 7899-2 (2000)

Der Nachweis von Enterokokken erfolgte mittels Membranfiltration nach dem Referenzverfahren DIN EN ISO 7899-2 (2000). Hierfür wurde der Membranfilter nach der Filtration der Probe auf S+B-Agar aufgelegt. Anschließend wurden die Platten bei  $36 \pm 2$  °C für  $44 \pm 4$  Stunden bebrütet.

Enterokokken reduzieren das im Medium enthaltene Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan, daher erscheinen diese als rosa, rote oder kastanienbraune Kolonien (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Waren diese vorhanden wurde der Filter auf eine Platte GÄA-Agar

übertragen, welcher zuvor auf 44 °C vorgewärmt wurde. Die Inkubation erfolgte daraufhin für weitere 2 Stunden bei 44 ± 0,5 °C.

Hierbei wird die Möglichkeit der intestinalen Enterokokken genutzt, das im Medium enthaltene Äsculin zu Cumarin zu hydrolysieren, welches sich mit den ebenfalls im Medium enthaltenen Eisenionen zu einer gelbbraunen bis schwarzen Verbindung umsetzen. Diese schwarze Färbung diffundiert anschließend in das Medium und kann hier nachgewiesen werden. Die Kolonien welche diese Farbentwicklung zeigen, werden gezählt und die KBE nach der oben genannten Formel für die Membranfiltration berechnet.

#### **2.4.1.2 Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* nach der DIN EN ISO 9308-1 (2017)**

Der Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* erfolgte mittels Membranfiltration nach dem Referenzverfahren DIN EN ISO 9308-1 (2017). Nach der Membranfiltration wurde dafür der Filter auf CCA aufgebracht. Die Inkubation erfolgte daraufhin bei 36 ± 2 °C für 21 + 3 Stunden.

Die Identifizierung der Kolonien wird durch die Spaltung zweier chromogener Substrate erreicht (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Dadurch wachsen coliforme Bakterien auf dem Nährmedium in rosa bis roter Farbe, da ihre β-D-Galactosidase einen rötlichen Farbstoff freisetzt. *E. coli* wächst dagegen dunkelblau bis violett, da sie zusätzlich eine β-D-Glucuronidase besitzen, die einen blauen Farbstoff freisetzen. Bakterien, die keine coliformen Bakterien sind, wachsen normalerweise nicht auf CCA, falls doch erscheinen sie farblos oder türkis.

Zur Überprüfung des Nachweises wird im Anschluss ein Oxidase-Test durchgeführt, da coliforme Bakterien und *E. coli* dieses Enzym nicht besitzen. Hierfür wurde der Bactident Oxidase-Teststreifen der Firma Merck (Dortmund) verwendet. Mit einer Impföse wurden Kolonien auf den Teststreifen übertragen, bei einer positiven Reaktion verfärbte sich der Teststreifen dunkelviolett. War der Test negativ, trat keine Verfärbung auf.

#### **2.4.2 MPN-Methode – Nachweis von coliformen Bakterien und *E. coli* mit Colilert®-18/Quanti-Tray® nach der DIN EN ISO 9308-2 (2014)**

Da der CCA lediglich für wenig kontaminierte Proben zur Quantifizierung verwendet werden kann, wurde zur Quantifizierung von stark kontaminierten Proben, wie Talsperrenwasser, ein alternatives Testverfahren angewendet. Die Quantifizierung erfolgt mit dem Colilert®-18/Quanti-Tray® der Firma IDEXX (Westbrook, USA), wobei es sich um eine sogenannte MPN-Methode (engl. *most probable number*) handelt (DIN EN ISO 9308-2, 2014). Eine MPN-Methode dient zur Bestimmung der höchstwahrscheinlichsten Keimzahl einer Probe (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008).

Für den Colilert wurden 100 ml der Probe oder Verdünnungsstufen in das mitgelieferte 100 ml Plastikgefäß gefüllt. Wurden Verdünnungsstufen verwendet, wurde dieses mit dH<sub>2</sub>O bis zur Markierung gefüllt. Dann wurde der Inhalt der Blisterpackung mit dem Nährmedium zugegeben und unter Schwenken gelöst. Anschließend konnte die Probe in den Quanti-Tray-Folienträger überführt und dieser im Anschluss verschweißt werden. Die Inkubation erfolgte bei 36 ± 2 °C für 20 ± 2 Stunden, wobei die Vertiefungen nach unten lagen.

Zur Auswertung wurde der Folienträger mit dem Komparator verglichen, wobei eine gelbe Vertiefung als positiv für coliforme Bakterien gewertet wurde. Die gelbe Färbung tritt aufgrund

der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf, die das im Nährmedium vorhandene farblose o-Nitrophenol- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) spaltet und den gelben Farbstoff o-Nitrophenol freisetzt.

Unter langwelligem UV-Licht (366 nm) wurden alle Kammern, die zusätzlich zur Gelbfärbung so intensiv wie der Komparator fluoreszierten, als positiv für *E. coli* gewertet. Die Fluoreszenz ist zurückzuführen auf die  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität von *E. coli*. Diese setzt aus dem Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid unter UV-Licht 4-Methylumbelliferon frei, welches hellblau fluoresziert. Die Bestimmung der MPN erfolgte nach der MPN-Tabelle „IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table“.

Zur Identifizierung konnten die Bakterien aus der Blisterpackung ausgeschnitten werden. Hierfür wurde die Packung mit einem sterilen Skalpell aufgeschnitten und mithilfe einer Impföse ein Verdünnungsausstrich der Flüssigkeit auf DEV-Nähragar durchgeführt, um Reinkulturen zu erhalten. Zur Identifizierung der coliformen Bakterien wurde darauf geachtet, lediglich nicht fluoreszierende Bakterien zu isolieren. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten die Bakterien dann mit dem MALDI-TOF MS identifiziert werden.

### 2.4.3 Gussplattenverfahren – Koloniezahlbestimmung

Die Koloniezahl (HPC, engl. *heterotrophic plate count*) beschreibt die Anzahl der sichtbaren Kolonien aus 1 ml Wasserprobe (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Bestimmt wird diese Zahl mittels Gussplattenverfahren. Sie wird angegeben in Kolonie-bildenden Einheiten (KBE). Hierfür wurde der Agar im Dampfkochtopf verflüssigt und anschließend im Wasserbad bei  $46 \pm 2$  °C temperiert. Anschließend wurde 1 ml der Probe, beziehungsweise Verdünnungen davon, in eine Petrischale pipettiert, der Nähragar zugegeben und das Ganze gut vermischt werden. Nach dem Erstarren konnte der Nähragar bebrütet werden. Die Erfassung der Koloniezahl erfolgte jeweils im Doppelansatz.

Für die Bestimmung der Parameter „Koloniezahl bei 22 °C“ und „Koloniezahl bei 36 °C“ wird der DEV-Nähragar verwendet. Die Bebrütung erfolgt bei  $20 \pm 2$  °C bzw.  $36 \pm 2$  °C für  $44 \pm 4$  h. Im Rahmen der Vermehrungsversuche wurde der R2A-Agar verwendet, da dieser dazu dient ein großes Spektrum an heterotrophen Trinkwasserbakterien zu erfassen, um die Begleitflora der Proben zu erfassen. Die Bebrütung des R2A-Agars erfolgte für sieben Tage bei 22 °C.

Die Kolonien wurden unter der Lupe (6–8-fach) ausgezählt. Anschließend konnte der gewichtete Mittelwert der Koloniezahl berechnet werden (Feuerpfeil & Botzenhart, 2008). Es ergibt sich

$$x = \frac{\sum k_i}{\sum n_i v_i}$$

wobei  $x$  = KBE/ml  
 $\sum k_i$  = Summe aller Kolonien  
 $n_i$  = Anzahl der ausgezählten Platten (Parallelen in jeder Verdünnungsstufe)  
 $v_i$  = Verdünnungsstufe (ml) (entspricht dem unverdünnten Probevolumen (ml))

ist.

Die Zahl der anwachsenden Kolonien sollte dabei zwischen 10 und 300 liegen, da laut ISO 8199 (2006) in diesem Bereich die statistischen, methodischen und subjektiven Fehler am geringsten sind.

### 2.4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (TCC, engl. *total cell count*) dient dazu alle Zellen einer Probe zu bestimmen, sie erfolgte mittels Durchflusszytometrie (EAWAG, 2012; Kötzsch & Sinreich, 2014). Zusätzlich können HNA- (engl. *high nucleic acid*) und LNA-Zellen (engl. *low nucleic acid*) unterschieden werden. Diese Bereiche beschreiben Zellen mit einem hohen, beziehungsweise niedrigen Gehalt an Nukleinsäuren und sollen auf die Aktivität im Stoffwechsel hinweisen (Lebaron *et al.*, 2001).

Hierfür wurden je 1 ml einer Probe in einem Eppendorfgefäß mit einem Tropfen Formaldehyd vermischt, um diese zu konservieren. Bei der Messung wurden dann je 10 µl SYBR Green I (Life Technologies, Eugene, USA, 10,000x in DMSO) zu den Proben zugegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei 36 °C inkubiert. Anschließend konnten 100 µl der Probe ins Durchflusszytometer geladen und gemessen werden. Die Messung erfolgte im Doppelansatz.

Im Durchflusszytometer werden die Zellen vereinzelt und gelangen in eine Glaskapillare, welche von einem Laser durchstrahlt wird. Passiert eine Zelle den Laserstrahl, führt dies zur Emission abhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall SYBR Green. Dieses Licht kann mithilfe eines Detektors gemessen werden. Aus jeder einzelnen Zelle ergibt sich daher ein einzelnes Signal, welches mit dem Bio-Rad S3 Cell Sorter (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) und der ProSort™ Software gemessen werden kann, wobei die grüne Fluoreszenz als Trigger verwendet wird.

### 2.4.5 Stammhaltung

Für die Stammhaltung der Bakterien wurden Cryobank™-Cryoröhrchen der Firma Mast Diagnostica (Reinfeld) verwendet. Diese enthalten 25 chemisch behandelte Kügelchen zur Adhäsion der Mikroorganismen und ein hypertonisches Medium. Frisch überimpfte Bakterien wurden mit einer sterilen Impföse von ihrer Agar-Platte abgenommen und in das Cryoröhrchen überführt. Zum Anheften der Mikroorganismen an die Kügelchen wurde das Ganze mehrmals invertiert. Nach einer Wartezeit von einer Minute konnte das Cryomedium abpipettiert und das Cryoröhrchen im Gefrierschrank bei –75 °C gelagert werden. Zum Auftauen der Proben wurden zwei bis drei Kügelchen entnommen und mit einer sterilen Impföse auf die jeweiligen Agar-Platten übertragen und anschließend inkubiert.

## 2.5 MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Typisierung und Identifizierung

### 2.5.1 Messung von Isolaten

Die Massenspektrometrie dient zur Messung der Masse von Molekülen. Bei der Messung von großen Molekülen wie Proteinen findet die matrixunterstützte Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, engl. *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) Anwendung. Dabei werden die Proteine in eine Matrix kristallisiert und anschließend mithilfe eines Lasers bestrahlt. Durch diese Bestrahlung werden die Proteine in einzelne Ionen fragmentiert, die dann durch eine Vakuumröhre und ein geladenes Kristallgitter fliegen. Dadurch können die Ionen nach Größe und Ladung getrennt werden. Aus der Zeit, die die Ionen zum Erreichen des Detektors benötigen, lässt sich die Molekülmasse der Proteine berechnen. Da Bakterien sich nicht nur anhand ihrer DNA, sondern auch anhand ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, können diese mit dem MALDI-TOF in kürzester Zeit identifiziert werden (Benagli *et al.*, 2011; Bizzini & Greub, 2010). Hierfür dient das

Proteinspektrum sozusagen als eine Art Fingerabdruck und wird mit einer Datenbank abgeglichen, in welcher bereits bekannte Arten eingespeichert sind. Bei der MALDI-TOF MS handelt es sich daher um eine datenbankbasierte Methode.

Verwendet wurde in dieser Arbeit das MALDI-TOF Gerät microflex LT der Firma Bruker Daltonik GmbH (Bremen). Für die Messung wurden die Isolate auf DEV-Agar überimpft und für einen Tag bei 37 °C inkubiert. Diese wurden direkt verwendet oder bei Raumtemperatur gelagert. Daraufhin wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher auf die Targetplatte aufgebracht, bei Raumtemperatur getrocknet, mit 1 µl einer 70 %igen Ameisensäure und, nachdem diese getrocknet war, mit 1 µl der Matrix überschichtet. Als Matrix diente α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) in einer Konzentration von 10 mg/ml, gelöst in Bruker Standard Solvent. War auch die Matrix angetrocknet, konnte das Target in das MALDI-TOF Gerät geladen und gemessen werden. Arbeitstäglich wurde zudem mithilfe des Bacterial Test Standards (BTS) eine Kalibrierung durchgeführt. Die Programme, die hierbei verwendet wurden, waren MBT Compass und flexControl der Firma Bruker.

## 2.5.2 Erstellung von Datenbankeinträgen

Wie bei jeder datenbankbasierten Methode, hängt die Qualität der Ergebnisse von der dahinterstehenden Datenbank ab. Da diese Methode besonders im klinischen Bereich Anwendung findet, kann es beispielsweise bei der Identifizierung von Umweltisolaten zu Problemen kommen. Allerdings besteht die Möglichkeit diese Datenbank durch neue Isolate zu erweitern, was im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Für die Erstellung neuer Datenbankeinträge wurden die in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 genannten Stämme der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* verwendet.

Diese wurden frisch aus der Cryokultur aufgetaut. Anschließend wurde eine Proteinextraktion nach der „Ameisensäure-Extraktionsmethode“ von Bruker durchgeführt. Hierfür wurde 300 µl PCR-Wasser in ein Eppendorfgefäß vorgelegt, in welches dann Koloniematerial hinzugegeben wurde und anschließend gevortext wurde. In das Eppendorfgefäß wurden daraufhin 900 µl Ethanol (99,8 %) zugegeben und das Gemisch homogenisiert. Daraufhin wurde bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) für zwei Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen und erneut für 20 Sekunden zentrifugiert, um auch das restliche Ethanol zu entfernen. Das Pellet wurde im Anschluss für 5 Minuten bei Raumtemperatur und geöffnetem Deckel trocknen gelassen. Daraufhin wurde 25 µl Ameisensäure zum Pellet gegeben, gründlich gemischt und das Ganze für 30 Sekunden einwirken gelassen. Daraufhin wurden 25 µl Acetonitril hinzugefügt und ebenfalls kurz gemischt. Im Anschluss wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dieser Proteinextrakt konnte für die Erstellung neuer Datenbankeinträge verwendet werden.

Hierfür wurden 3 Spots BTS, sowie pro Isolat 8 Spots Proteinextrakt mit je 1 µl aufgetragen, getrocknet, mit 1 µl HCCA-Matrix überschichtet, sowie erneut getrocknet. Daraufhin konnte das Target in das MALDI-TOF Gerät geladen werden. Vor Beginn der Messung wurde das Gerät mithilfe des BTS kalibriert, dann erfolgte die Messung mit dem Programm flexControl. Anders als bei Identifizierungsmessungen wird bei der Erstellung neuer Datenbankeinträge pro Messpunkt dreifach gemessen, zudem erfolgte im Anschluss die Qualitätskontrolle mit dem Programm flexAnalysis nach Anweisung von Bruker, diese enthielt eine Subtraktion der Nulllinie, Glättung und Entfernung von Ausreißern. Der maximal erlaubte Peakshift zwischen den Spektren betrug 500 ppm. Von den 24 Messungen pro Isolat mussten mindestens 20 Spektren die Qualitätskontrolle passieren, um aus diesen einen neuen Eintrag erstellen zu

können. Dieser wurden dann mithilfe des Programms MBT Compass Explorer der Datenbank zugefügt und stand anschließend bei der Identifizierung zur Verfügung.

### 2.5.3 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der MALDI-TOF Ergebnisse erfolgte mit dem Programm MBT Compass. Bei jeder Messung werden die besten zehn Identifizierungstreffer angegeben, sowie ein sogenannter „Score value“, der die Ergebnisse in wahrscheinliche und unwahrscheinliche Identifizierungen einteilt, und somit die Interpretation der Ergebnisse erlaubt. Vergleicht man die zehn Identifizierungsergebnisse untereinander, so ergibt sich daraus die Bewertung der Konsistenz, die ebenfalls in die Interpretation einfließt. Stimmen die Ergebnisse in der identifizierten Art überein und ist zudem bei beiden Ergebnissen der Score value  $\geq 2$ , so gilt die Konsistenz A („Übereinstimmung der Art“). Stimmt dagegen lediglich die Gattung überein, oder wurde nur bei dem ersten Ergebnis ein Score value  $\geq 2$  erreicht, so gilt die Konsistenz B („Übereinstimmung der Gattung“). Sind keine dieser Übereinstimmungen erreicht worden, so gilt die Konsistenz C („Keine Übereinstimmung“).

Bei Ergebnissen die lediglich auf eine unwahrscheinliche Identifizierung hinwiesen, sowie bei Vergleichen mehreren Messungen untereinander, wurde das Programm MBT Compass Explorer verwendet. Mit diesem Programm kann aus gemessenen Spektren und Datenbankeinträgen ein Dendrogramm erstellt werden, um festzustellen, welche Spektren untereinander ähnlich sind. Hierfür wurde zur Distanzbestimmung die Korrelations-Methode nach Pearson verwendet, während für die Bildung des Clusters die UPGMA-Methode (UPGMA, engl. *unweighted pair group method with arithmetic mean*), auch „average“ genannt, verwendet wurde.

Die Spektren aus eigenen Messungen, sowie eigenen Datenbankeinträgen konnten zudem mithilfe von R (Ihaka & Gentleman, 1996; R Core Team, 2019) ausgewertet werden. Hierfür wurden folgende Pakete verwendet: *MALDIquant*, *MALDIquantForeign* (Gibb & Strimmer, 2012) und *MALDIrppa* (Palarea-Albaladejo *et al.*, 2018). Die Auswertung erfolgte nach Gibb & Strimmer (2012), mit den in Tabelle 2.15 dargestellten Parametereinstellungen für die Qualitätssicherung. Für die grafische Darstellung wurde eine Heatmap mit Hilfe des *pheatmap* package (Kolde, 2019), sowie ein Dendrogramm mit Hilfe des *ggdendro* package (de Vries & Ripley, 2016) verwendet. Als Methode für die Berechnung der Distanz wurde die „euclidean“-Methode verwendet, für die Clusterbildung wurde die UPGMA-Methode verwendet. Diese Methoden wurden nach Shirkhorshidi *et al.* (2015) ausgewählt.

**Tabelle 2.15 Parameter für die statistische Auswertung von MALDI-TOF Spektren mit R.**

	Parameter	Wert/Methode
<b>Range</b>	Mass range of spectra (m/z)	2000–12000
<b>Transformation and smoothing</b>	Variance stabilization method	square root transformation
	Smoothing method	Savitzky-Golay
	Half window size	20
<b>Baseline correction</b>	Baseline correction method	Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping
	Baseline correction iterations	25
<b>Normalization</b>	Normalization method	probabilistic quotient normalisation
<b>Peak detection</b>	Signal-to-noise ratio	2
	Half window size for peak extraction	20
	Tolerance for peak binning	0,001

## 2.6 Molekularbiologische Methoden zur Typisierung und Identifizierung

### 2.6.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion von Isolaten coliformer Bakterien wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß 50 µl steriles PCR-Wasser vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Kolonien von einer Platte entnommen und in das Eppendorfgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgte für 10 Minuten im Heizblock bei 95 °C. Anschließend wurde die Probe für mindestens 90 Minuten bei –20 °C eingefroren. Danach konnte mit der DNA weitergearbeitet werden.

### 2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Hierfür werden spezifische Primerpaare verwendet, die das zu amplifizierende Gen flankieren. Der MyTaq™ Mix enthält bereits eine Taq-Polymerase, ein rotes Anfärbemittel, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Enhancer. Der Mastermix wurde mit nukleasefreiem Wasser (gibco® life technologies™) verdünnt. Für jede PCR wurden eine Negativkontrolle mitgeführt.

#### 2.6.2.1 MLSA-PCR

Da die taxonomische Unterscheidung coliformer Bakterien anhand ihrer 16S rRNA zu ungenau ist, wurde eine Multilocus sequence analysis (MLSA) durchgeführt. Hierfür wurden die Gene *atpD*, *gyrB*, *infB* und *rpoB* nach Brady *et al.* (2008) untersucht. Das verwendete Pipettierschema ist in Tabelle 2.16 dargestellt. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 2.17 dargestellten Programm, wobei für das *rpoB*-Gen 60 °C zur Primer-Bindung verwendet wurden.

**Tabelle 2.16 Pipettierschema für die MLSA-PCR.**

Stoff	Menge (µl)
dH <sub>2</sub> O	15
MyTaq™ Mix	25
Primer A (10 pmol/µl)	2,5
Primer B (10 pmol/µl)	2,5
Template DNA	5
<b>Gesamt</b>	<b>50</b>

**Tabelle 2.17 Cycler-Protokoll für die MLSA-PCR.**

95 °C	Denaturierung	5:00 min	
95 °C	Denaturierung	1:00 min	3 Zyklen
55 °C	Primer-Bindung	2:15 min	
72 °C	Polymerase-Aktivität	1:15 min	
95 °C	Denaturierung	0:35 min	30 Zyklen
55 °C	Primer-Bindung	1:15 min	
72 °C	Polymerase-Aktivität	1:15 min	
72 °C	Polymerase-Aktivität	7:00 min	



### 2.6.2.2 RAPD-PCR

Die RAPD (engl. *randomly amplified polymorphic DNA*) ist eine PCR-basierte Methode, welche dazu angewendet wird, Organismen taxonomisch einzuordnen. Verwendet wird hierbei – anders als bei anderen PCR-basierten Methoden – lediglich ein Primer. Nach Williams *et al.* (1990) sollte dieser Primer mindestens 9 bp lang sein und einen GC-Gehalt von 40 % oder mehr aufweisen. Dieser Primer bindet während der PCR an mehrere unspezifische polymorphe DNA-Segmente im Bakteriengenom, die daraufhin amplifiziert werden. Daher kann man nach der anschließenden Elektrophorese anhand der Bandenmuster Rückschlüsse auf die Unterschiede in der DNA-Sequenz der unterschiedlichen Isolate ziehen, da DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert werden. So lassen sich beispielsweise verschiedene Arten einer Gattung unterscheiden und somit auf die Taxonomie schließen, da nahverwandte Arten gleiche oder ähnliche Bandenmuster aufweisen (Hadrys *et al.*, 1992).

Für die RAPD wurde zuerst der in Tabelle 2.18 dargestellte Reaktionsansatz mit dem Primer (GTG)<sub>5</sub> angesetzt und dieser anschließend in den PCR-Cycler gestellt. Hierfür wurde das in Tabelle 2.19 gezeigte PCR-Protokoll verwendet. Nach der PCR konnte das Ganze durch die Elektrophorese sichtbar gemacht werden.

**Tabelle 2.18 Pipettierschema für die RAPD-PCR.**

<b>Stoff</b>	<b>Menge (µl)</b>
dH <sub>2</sub> O	9,5
MyTaq™ Mix	12,5
Primer (20 pmol/µl)	1
Template DNA	2
<b>Gesamt</b>	<b>25</b>

**Tabelle 2.19 Cycler-Protokoll für die RAPD-PCR.**

95 °C	Denaturierung	5:00 min	} 32 Zyklen
95 °C	Denaturierung	0:45 min	
40 °C	Primer-Bindung	1:00 min	
72 °C	Polymerase-Aktivität	5:00 min	
72 °C	Polymerase-Aktivität	10:00 min	

### 2.6.3 Analytische Trennmethode von PCR-Produkten

Nach der Vervielfältigung der DNA konnte diese während der Kapillarelektrophorese sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das QIAxcel Advanced System der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben verwendet. Allgemein werden bei der Elektrophorese geladene Teilchen durch das Anlegen eines elektrischen Felds getrennt. Da DNA-Fragmente negativ geladen sind, wandern sie zur positiven Ladung des elektrischen Felds. Bei der Kapillarelektrophorese findet die Trennung in den Kapillarröhrchen statt, welche sich in der Gelkartusche des QIAxcel Instruments befindet. In diesem Gel befindet sich ein Fluoreszenzmittel, welches mit der DNA interkaliert und bei der Bestrahlung mit einer LED fluoresziert. Dieses Signal kann durch einen Detektor aufgenommen werden. Der Photomultiplier verstärkt dieses Signal, damit es in der QIAxcel ScreenGel Software dargestellt werden kann. Diese liefert ein Elektropherogramm und ein virtuelles Gelbild.

## 2.6.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit von Roche (Grenzach-Wyhlen) nach Herstellerangaben. Um das Ethanol des Waschpuffers komplett zu entfernen wurde nach dem zweiten Waschschrift allerdings noch ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt eingefügt. Außerdem wurde nur mit 30 µl sterilem Wasser eluiert, welches zuvor auf 55 °C erwärmt wurde, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Da sich aufgrund des Filters ein Pellet absetzt, wurden von dem Überstand 20 µl in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt und dieses weiterverwendet.

## 2.6.5 Sanger-Sequenzierung

Zum Sequenzieren wurden 20 µl der Probe an die Firma StarSEQ® GmbH (Mainz) geschickt. Pro Sequenzierungsreaktion wurde außerdem 1 µl des Primers der Konzentration 10 pmol/µl in einem zusätzlichen Eppendorfgefäß mitgeschickt. Für die Sequenzierung der MLSA-Gene wurde nur der reverse Primer verschickt. Die Sequenzierungsmethode die hierbei zur Anwendung kommt ist die Sanger- Sequenzierung.

## 2.6.6 Bioinformatische Analyse

Zur bioinformatischen Analyse wurden die sequenzierten Nukleotidsequenzen mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda MD, USA) analysiert. Die Bearbeitung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm ChromasPro Version 2.6.4. Die phylogenetische Untersuchung wurde mit MEGA7 Version 7.0.26 durchgeführt (Kumar *et al.*, 2016). Zum Erstellen des Alignments wurde die multiple Sequenzalignment-Methode „ClustalW“ gewählt (Larkin *et al.*, 2007). Für die Berechnung des Alignments wurden die in Tabelle 2.20 dargestellten Parameter eingestellt (Hall, 2005). Daraufhin konnte, ebenfalls mit MEGA7, mit der Maximum-Likelihood-Methode ein Stammbaum erstellt werden. Hierfür wurden 1000 mögliche Bäume berechnet, und der wahrscheinlichste Baum erstellt. Die errechneten Wahrscheinlichkeiten sind im Stammbaum mit angegeben. Zusätzlich wurde eine „outgroup“ festgelegt.

**Tabelle 2.20 Parameter zum Erstellen eines Alignments mit dem Programm MEGA7.**

Parameter	Pairwise Alignment	Multiple Alignment
Gap-Opening Penalty	10	10
Gap-Extension Penalty	0,1	0,2
Delay Divergent Cutoff	30 %	

## 2.7 Mikrobielle Gemeinschaft und Microbial Source Tracking (MST)

### 2.7.1 DNA-Extraktion

Um die DNA aus Wasserproben zu extrahieren, wurde diese zuerst mittels Membranfiltration (0,2 µm Supor<sup>®</sup>-200 Membran, 47 mm Durchmesser, Pall Corporation, New York, USA) konzentriert. Für die DNA-Extraktion aus den Filtern wurde das FastDNA<sup>™</sup> Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit dem Nano-Photometer (Implen) gemessen.

### 2.7.2 Quantifizierung von Microbial Source Tracking (MST) Markern

Microbial Source Tracking (MST) ist eine Methode, um potentielle Fäkaleintragsquelle einer Wasserprobe zu identifizieren. Sie basiert darauf, dass bestimmte Mikroorganismen immer mit einem bestimmten Wirt assoziiert sind (Hagedorn *et al.*, 2011). Hierfür wurde die quantitative real-time PCR (qPCR) der 16S rRNA *Bacteroidales* nach Stange *et al.* (2019) durchgeführt, um fäkale Kontaminationen aus Mensch, Wiederkäuern und Schweinen zu detektieren, sowie den gesamten Umfang einer fäkalen Kontamination aus Säugetieren zu detektieren (Layton *et al.*, 2006). Amplifizierte PCR-Produkte wurden mittels QIAxcel<sup>®</sup> Advanced System (Qiagen, Hilden, Deutschland) verifiziert. Die Effizienz der PCR lag zwischen 90 und 105 % mit einem R<sup>2</sup>-Wert von 0,99. Die Nachweisgrenze (LOQ, engl. *limit of quantification*) lag bei 10 Kopien pro Reaktion.

### 2.7.3 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde an der Core Facility Microbiome der TU München (Freising, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde die V3/V4 Region der 16S rRNA mit dem Illumina MiSeq<sup>®</sup> Next Generation Sequencing System amplifiziert und sequenziert. Das Demultiplexing der Rohdaten ( $n = 869.073$ ) erfolgte mit dem von IMNGS (Integrated Microbial Next Generation Sequencing) bereitgestellten Perl-Script (Lagkouvardos *et al.*, 2016). Für die weitere Untersuchung wurde die IMNGS Pipeline verwendet, welche den UPARSE Algorithmus des USEARCH8 package nutzt (Edgar, 2010; Edgar, 2013). Sequenzen wurden *de novo* zu operational taxonomic units (OTUs) mit 97 % Ähnlichkeit und einer relative Abundanz von  $\geq 0,25$  % zugeordnet. Nach dem Filtern und dem Überprüfen möglicher Chimären konnten 504.886 Sequenzen für die weitere Analyse verwendet werden. Die taxonomische Klassifizierung wurde mit SINA Version 1.2.11 durchgeführt, mit einem „minimum identity query“ von mindestens 90 % (Pruesse *et al.*, 2012). Ein Neighbor-Joining Stammbaum mit 100 bootstraps wurde mithilfe von MEGA7 Version 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016) berechnet. Für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft wurde das R-Script Rhea verwendet (Lagkouvardos *et al.*, 2017).

## 2.8 Whole genome sequencing (WGS)

### 2.8.1 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurden Reinkulturen von coliformen Bakterien auf DEV-Nähragar angezogen und bei 36 °C für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit 2 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung überschichtet. Die Bakterien wurden mit einer Impföse abgekratzt und 1 ml davon in ein Lysematrix Röhrchen ohne Matrix (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) überführt. Diese konnten dann für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Matrix konnten den Lysematrix-Röhrchen wieder zugegeben werden. Die DNA-Extraktion erfolgte daraufhin mit dem FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) nach Herstellerangaben.

### 2.8.2 Sequenzierung, Assemblierung und Annotation

Die Genomsequenzierung wurde an der Core Facility Microbiome der TU München (Freising, Deutschland) mittels 150 bp paired-end Sequenzierung auf dem Illumina NextSeq 1000 Gerät durchgeführt. Die Reads wurden mit Cutadapt Version 1.16.6 (Martin, 2011) zugeschnitten und die Qualität mit FastQC Version 0.72 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) kontrolliert. Sequenzen mit hoher Qualität wurden anschließend *de novo* mithilfe von Unicycler Version 0.4.6.0 (Wick *et al.*, 2017) assembliert, das SPAdes Version 3.12.0 (Bankevich *et al.*, 2012) enthält. Die Annotierung erfolgte mittels Rapid Annotations using Subsystems Technology tool kit (RASTtk) Version 2.0 (Aziz *et al.*, 2008; Brettin *et al.*, 2015), welches bei PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) Version 3.6.9 implementiert ist (Wattam *et al.*, 2018). Zusätzlich wurden die Sequenzen mit der NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) Version 5.0 annotiert (Tatusova *et al.*, 2016).

### 2.8.3 Phylogenetische Untersuchung

Die phylogenetische Untersuchung der Genome erfolgte mit der „Codon Tree“-Pipeline von PATRIC Version 3.6.9 (Davis *et al.*, 2020). Diese nutzt vordefinierte Proteinfamilien (Davis *et al.*, 2016), von welchen 1000 single-copy Proteinfamilien ausgewählt wurden. Das Alignment der Proteinsequenzen erfolgt mit MUSCLE (Edgar, 2004), das Alignment der entsprechende Nukleotidsequenz mit BioPython (Cock *et al.*, 2009). Die Alignments wurden dann mit RAxML Version 8.0.0 analysiert (Stamatakis *et al.*, 2008; Stamatakis, 2014).

### 2.8.4 Berechnung der durchschnittliche Nukleotidentität (ANI)

Die durchschnittliche Nukleotidentität (ANI, engl. *average nucleotide identity*) dient dem Vergleich zwischen Genomsequenzen. Hierfür wurde OrthoANI verwendet (Lee *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017). Die Grafik wurde mit dem R-Paket heatmaply (Galili *et al.*, 2018) erstellt, mit der euklidischen Distanzmethode und der Clustermethode „average“. Als Referenzstämme wurden folgende Stämme verwendet: *Enterobacter asburiae* ATCC 3595<sup>T</sup> (GCA\_001521715), *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047<sup>T</sup> (GCA\_000025565), *Lelliottia amnigena* LMG 2784<sup>T</sup> (GCA\_002553545) und *Lelliottia aquatilis* 6331-17<sup>T</sup> (GCA\_002923025).

### 2.8.5 Untersuchung der Stoffwechselwege

Die Untersuchung der Stoffwechselwege erfolgte mittels KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa & Goto, 2000). Hierfür wurde die BlastKOALA-Pipeline Version 2.2 (Kanehisa *et al.*, 2016) mit folgenden Einstellungen verwendet: „Prokaryotes“ als taxonomische Gruppe und „species\_prokaryotes“ als Datenbank.

## 2.8.6 Untersuchung von Antibiotikaresistenzgenen

Die Untersuchung der Antibiotikaresistenzgene (ARG) erfolgte mittels PATRIC (Davis *et al.*, 2020). Hier können zusätzlich zur internen Datenbank von PATRIC auch weitere Datenbanken herangezogen werden, wie die Datenbank CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) Version 3.0.3 (McArthur *et al.*, 2013).

## 2.8.7 Vergleich mit anderen Stämmen

Die Genome wurden zudem mit weiteren Stämmen verglichen, um die Pathogenität und die hygienische Relevanz zu untersuchen. Die Stämme, die für den Vergleich verwendet wurden können Tabelle 2.21 entnommen werden. Hierfür wurden das Assembly als Fasta-Datei von NCBI heruntergeladen und analog zu den Stämmen dieser Arbeit, wie in Kapitel 2.8.2. beschrieben, annotiert.

**Tabelle 2.21 Stämme die für den Genomvergleich verwendet wurden.**

Spezies und Stamm	Assembly Genbank	Literatur
<i>Enterobacter asburiae</i> ATCC 3595 <sup>T</sup>	GCA_001521715	Zhu <i>et al.</i> (2017)
<i>Enterobacter asburiae</i> CAV1043	GCA_001022095	Sheppard <i>et al.</i> (2016)
<i>Enterobacter asburiae</i> ENIPBJ-CG1	GCA_001617645	Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Enterobacter asburiae</i> L1	GCA_000632395	Lau <i>et al.</i> (2014)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047 <sup>T</sup>	GCA_000025565	Ren <i>et al.</i> (2010)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> GGT036	GCA_000770155	Gong <i>et al.</i> (2015)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> M12X01451	GCA_002303275	Carter <i>et al.</i> (2017)
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> PIMB10EC27	GCA_002982195	Le-Ha <i>et al.</i> (2019)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	GCA_000006665	Perna <i>et al.</i> (2001)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumonia</i> ATCC 43816 KPPR1	GCA_000742755	Broberg <i>et al.</i> (2014)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i> PT1	GCA_008313815	Anwar <i>et al.</i> (2020)
<i>Shigella flexneri</i> 2a 301	GCA_000006925	Jin <i>et al.</i> (2002)

## 2.9 Untersuchung der Antibiotikaresistenz

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Antibiotika wurde ein Antibiogramm nach EUCAST (2021) durchgeführt. Hierfür wurden die Bakterien frisch auf DEV-Agar überimpft und für 24 h bei 36 °C bebrütet. Anschließend wurden diese in 5 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gegeben, gevortext und eine Trübung von 0,5 mit Hilfe des McFarland Standard (Roth, Karlsruhe) eingestellt. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend mit einem sterilen Wattestäbchen auf Mueller-Hinton Agar überimpft, wobei darauf geachtet wurde, einen gleichmäßigen Bakterienrasen zu erhalten. Anschließend wurden die Disks, welche Antibiotika enthalten, auf die Platte aufgebracht. Die Platten wurden für 20 h bei 36 °C bebrütet und am folgenden Tag die Hemmhöfe ausgewertet.

Getestet wurden die folgenden Antibiotika der Firma Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld, Deutschland): Cefotaxime (CTX, 5 µg), Ceftazidime (CAZ, 10 µg), Imipenem (IMI, 10 µg), Meropenem (MEM, 10 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Piperacillin (PIP, 30 µg), Fosfomycin/Glucose-6-phosphat (FOT, 200 µg), Trimethoprim (TM, 5 µg), Polymyxin B (PB, 300 µg) und Chloramphenicol (C, 30 µg). Die Bewertung der Hemmhöfe erfolgte nach EUCAST (2021), sowie für Polymyxin B nach Behera *et al.* (2010). Ab wann die Bakterien als resistent gegen die verwendeten Antibiotika gelten, ist in Tabelle 2.22 zusammengefasst.

**Tabelle 2.22 Hemmhöfe der Antibiotika des Antibiogramms zur Erkennung resistenter Bakterien.**

	IMI	MEM	CIP	PIP	CTX	CAZ	FOT	PB	TM	C
<b>Konzentration (µg)</b>	10	10	5	30	5	10	200	300	5	30
<b>Resistenz bei Hemmhof (mm)</b>	<19	<16	<22	<20	<17	<19	<21	<11	<15	<17

## 2.10 Statistische Datenanalyse

Im Rahmen der Routineuntersuchung in Trinkwassertalsperren werden verschiedene Parameter regelmäßig untersucht, beispielsweise die mikrobiologischen Parameter (coliforme Bakterien, *E. coli*, Enterokokken, Koloniezahl) im Rohwasser. Zudem werden meteorologische Daten (Lufttemperatur, Niederschlag, Windgeschwindigkeit) regelmäßig gemessen. Darüber hinaus wurden physikalische und chemische Parameter gemäß der Norm „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ (Wasserchemische Gesellschaft & DIN, 2020) dokumentiert. Diese Daten wurden freundlicherweise von den Wasserversorgern der Talsperren Klingenberg, Kleine Kinzig, Wahnbach, Breitenbach und Rappbode zur Verfügung gestellt und konnten für die statistische Datenanalyse genutzt werden.

Da von der Breitenbach Talsperre, anders als von den anderen Talsperren, nur minimale und maximale Werte der Lufttemperatur vorhanden waren, wurde für die Berechnung die Mittelwerte daraus verwendet. Für die Talsperre Kleine Kinzig wurden für die Datenauswertung zusätzlich zu den selbst gemessenen Werten der mikrobiologischen Parametern aus Kapitel 2.3.2 auch die vom Wasserversorger gemessenen Werte verwendet, um auch den Zeitraum außerhalb des Monitoringzeitraums abdecken zu können.

Alle statistischen Analysen wurden mit R (Ihaka & Gentleman, 1996; R Core Team, 2019) durchgeführt. Grafiken wurden mit den Paketen *ggplot2* (Wickham, 2016) und *ggpubr* (Kassambara, 2020) erstellt. Zur Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Für die Darstellung des Tiefenschnitts der physikalisch-chemischen Parameter, sowie der coliformen Bakterien wurde eine bilineare Interpolation mit dem R-Paket *akima* (Akima & Gebhardt, 2016) durchgeführt, wobei in x-Richtung als Zeitintervall eine Woche ausgewählt wurde, in y-Richtung wurde ein Meter als Intervall gewählt. Aus diesen interpolierten Daten wurden die Mittelwerte, sowie die Standardabweichung berechnet. Die interpolierten physikochemischen Daten des Rohwasserentnahmehorizontes wurden zudem in späteren Berechnungen, wie den Korrelationsanalyse, weiterverwendet.

Die lineare Interpolation der mikrobiologischen Daten aus dem Rohwasser wurde mit dem *zoo* Paket (Zeileis & Grothendieck, 2005) durchgeführt. Diese konnten dann mit den physikochemischen Daten des Rohwassers zusammengeführt und der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet werden. Für die Talsperre Rappbode lagen nicht alle Daten als Tiefenschnitt vor, aus diesem Grund wurden die Rohwasserdaten ebenfalls mit dem *zoo* Paket interpoliert. Für die Korrelationsanalyse wurde das Paket *corrplot* verwendet (Wei & Simko, 2021), die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman. Zusätzlich wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl. *principal component analysis*) durchgeführt, wofür das *stats* Paket verwendet wurde (R Core Team, 2019). Diese dient als

einfaches Visualisierungsinstrument, um die Varianz von Datensätzen zusammenzufassen und die dominanten Gradienten im niedrigdimensionalen Raum aufzuzeigen (Paliy & Shankar, 2016; Ramette, 2007).

Von den Talsperren Kleine Kinzig, sowie Klingenberg konnten zudem weitere statistische Untersuchungen durchgeführt werden. Da die coliformen Bakterien identifiziert wurden, konnte eine Redundanzanalyse (RDA, engl. *redundancy analysis*) mit dem *vegan* Paket (Oksanen *et al.*, 2019) berechnet werden, um den Zusammenhang zwischen den physikalisch-chemischen Parametern und der sich vermehrenden coliformen Bakterienart zu zeigen. Die Redundanzanalyse ist eine Analyse zur Bewertung, wie viel der Variation in einem Satz von Variablen durch die Variation in einem anderen Satz von Variablen erklärt werden kann (Paliy & Shankar, 2016; Ramette, 2007).  $R_2$  wurde unter Verwendung der Ezekiel-Formel (Ezekiel, 1930) angepasst, um zu berechnen, wie hoch der Anteil der Variationen ist, die damit erklärt werden können, wie von Borcard *et al.* (2018) beschrieben. Permutationstests (ANOVA-like) für die RDA wurden mit dem Paket *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019) mit 999 Permutationen durchgeführt.

## 2.11 Berechnung der Diversität

Die Alpha-Diversität bei der Identifizierung coliformer Bakterien, sowie der mikrobiellen Gemeinschaft wurde anhand des Shannon- und Simpson-Index ermittelt (Shannon, 2001; Simpson, 1949), wobei letzterer häufig vorkommenden Arten mehr Gewicht verleiht (Lagkouvardos *et al.*, 2017). Da die Indizes nicht linear sind, wurden diese transformiert, um die Anzahl der sogenannten „effektiven“ Arten zu erhalten (Jost, 2006; Jost, 2007). Dies macht den Vergleich zwischen Proben einfacher, und beschreibt die Anzahl der gleich häufig vorkommenden Arten, die denselben Wert für diesen Index ergeben würden (Lagkouvardos *et al.*, 2017).

Zudem wurde für die mikrobielle Gemeinschaft die Beta-Diversität berechnet, diese beschreibt die Unterschiede zwischen mikrobiellen Profilen. Daher wurden verallgemeinerte Unifrac-Distanzen mit dem Paket *GUniFrac* (Chen, 2018) berechnet. Zur Visualisierung wurde eine nichtparametrische multidimensionale Skalierung (NMDS) mit den Paketen *vegan* und *ade4* (Dray & Dufour, 2007; Oksanen *et al.*, 2019) durchgeführt.

## 2.12 Laborversuche zur Vermehrung coliformer Bakterien

### 2.12.1 Vorversuche zur Temperaturabhängigkeit

Bei einem Vorversuch sollte die Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Stämme coliformer Bakterien auf Nährmedien getestet werden. Hierfür wurden zuerst die Bakterien angezüchtet, indem sie auf DEV-Agar überführt und für 24 h bei 36 °C inkubiert wurden. Eine Kolonie wurde anschließend in 9 ml HH-Bouillon gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Bestimmung der Koloniezahl mithilfe der Membranfiltration. Ausgehend davon konnten Verdünnungen mit etwa  $10^2$  Bakterien/100 µl hergestellt werden, die dann mittels Drigalskispatel auf DEV-, R2A- und CCA-Platten ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte bei verschiedenen Temperaturen über maximal 20 Tage.

## 2.12.2 Vermehrungsversuche

Um herauszufinden, welche Faktoren coliforme Bakterien dazu befähigen, sich in Talsperren zu vermehren, wurden Vermehrungsversuche mit verschiedenen Isolaten coliformer Bakterien aus Talsperren sowie der Stammsammlung in verschiedenen Wässern durchgeführt. Die hierfür verwendeten Wässer können Tabelle 2.23 entnommen werden. Rohwasser beschreibt das Wasser, welches zur Trinkwasseraufbereitung verwendet wird, es wird zumeist aus den tieferen Schichten der Talsperre entnommen. Bei Reinwasser handelt es sich um das aufbereitete Wasser vor der Abschlussdesinfektion. Oberflächenwasser bezeichnet das Wasser, welches von der oberen Schicht der Talsperre entnommen wurde.

**Tabelle 2.23 Verwendete Wässer für die Vermehrungsversuche.**

Herkunft	Zeitpunkt der Entnahme	Wasser	Versuch zum Einfluss von ...
Talsperre R1	21.10.2019	Rohwasser	Wasserqualität/Temperatur 22 °C
		Reinwasser	Wasserqualität/Temperatur 22 °C
Talsperre R2	09.09.2019	Rohwasser	Wasserqualität/Temperatur 22 °C
		Reinwasser	Wasserqualität/Temperatur 22 °C
	17.02.2020	Rohwasser	Temperatur 5–14 °C
		Reinwasser	Temperatur 5–14 °C
	29.06.2020	Rohwasser	Sauerstoff
	10.08.2020	Rohwasser Oberfläche	Wasserqualität Wasserqualität
10.02.2021	Rohwasser	Nährstoffen	

Für den Vermehrungsversuch wurde zuerst eine Vorkultur mit den coliformen Bakterien hergestellt, aus der dann später die Impfstammlösung angesetzt wurde. Hierfür wurden frisch angezüchtete Bakterien von einer bewachsenen DEV-Agar Platte mit einer sterilen Einmalimpföse abgenommen und anschließend auf DEV-Agar Platten überimpft. Diese wurden dann für 60 Stunden bei 36 °C inkubiert. Zum Herstellen der Impfstammlösung wurden diese mit je 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung überschichtet. Hiermit konnten dann die gewachsenen Bakterien vorsichtig mit einer sterilen Einmalimpföse abgekratzt und in ein Reagenzglas mit 7 ml NaCl-Lösung (0,9 %) überführt werden. Um eventuell vorhandene Agarreste zu entfernen, wurden die Proben im Anschluss kurz gevortext und die Bakteriensuspensionen anschließend durch einen Faltenfilter in 100 ml kohlenstofffreie NaCl-Lösung (0,9 %) filtriert.

Diese Suspension wurde daraufhin über einen Polycarbonatfilter (0,2 µm, Pall Corporation, Port Washington, New York, USA) filtriert, welcher zuvor mit 1 Liter kohlenstofffreiem, autoklaviertem Wasser vorgespült wurde. Im Anschluss an die Filtration wurde mit 50 ml NaCl-Lösung (0,9 %) nachgespült. Daraufhin konnte der Filter abgenommen und in eine Schottflasche mit 100 ml NaCl-Lösung (0,9 %) überführt werden. Diese wurde über einen Zeitraum von 10 min immer wieder kurz geschüttelt, um die Bakterien in Lösung zu bekommen. Anschließend konnte der Filter verworfen werden und die entstandene Bakteriensuspension diente als Impfstammlösung.

Die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheit (KBE) erfolgte über eine Verdünnungsreihe. Verschiedene Verdünnungen der Impfstammlösung wurden im Doppelansatz auf CCA membranfiltriert und für 21 Stunden bei 36 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt und daraus die KBE/ml bestimmt. Daraus konnte berechnet werden, welche Menge zum Beimpfen des Wassers benötigt wurde, um eine Konzentration von  $2 \times 10^2$  KBE/100 ml Wasser zu erreichen.



Im Anschluss erfolgte der Ansatz der Versuche. Bevor die Ansätze angeimpft werden konnte, wurden 1 l-Schottflaschen zweifach mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit dem Testwasser befüllt. Anschließend wurde die errechnete Menge der Impfstammlösung oder eine Verdünnung davon angeimpft und die Flaschen gut geschüttelt. Die Verdünnung erfolgte in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung in kohlenstofffreiem Wasser.

Für die Beprobung wurden jeweils die KBE/ml durch Membranfiltration auf CCA, die Koloniezahl auf R2A-Agar im Plattengussverfahren, sowie die Gesamtzellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Probenahme erfolgte jeweils im Doppelansatz. Die Versuchsdauer betrug in der Regel 30 Tage.

Die Wachstumsrate pro Tag wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{\Delta t}$$

Dabei ist:

$\mu$	die Wachstumsrate pro Tag
$N_t$	Anzahl der vorhandenen Bakterien an Tag $t$
$N_0$	Anzahl der vorhandenen Bakterien an Tag $t_0$
$\Delta t$	$t - t_0$

Insgesamt wurden verschiedene Parameter untersucht, wie der Einfluss der Temperatur, der Wasserqualität, des Sauerstoffgehalts und der Zugabe von Nährstoffe in Form von Pepton. Ein Überblick über die Versuche und die untersuchten Parameter ist in Tabelle 2.24 zusammengestellt. Bei den Versuchen mit Pepton wurde die beschriebene Menge Pepton jeweils an Tag 0, 1 und Tag 7 hinzugegeben. Zudem wurden bei diesem Versuch die frischen Bakterien auf R2A-Agar angezüchtet, anstatt auf DEV-Agar, um eine Art Vorbereitung auf die wenigen Nährstoffe im Wasser zu schaffen.

**Tabelle 2.24 Überblick über die durchgeführten Vermehrungsversuche.**

Versuch	Veränderter Parameter	Einheitliche Parameter	Stämme
Wasserqualität	Rohwasser R1/R2	Aerob	<i>Enterobacter</i>
	Reinwasser R1/R2	Steril	<i>Lelliottia</i>
	Oberflächenwasser R2	22 °C	<i>Serratia</i>
Temperatur	Temperatur (5 °C, 10 °C, 14 °C, 22 °C)	Rohwasser R2	<i>Enterobacter</i>
		Aerob	<i>Lelliottia</i>
		Steril	
Sauerstoff	Aerob/Anaerob Steril/Nicht steril	Rohwasser R2	<i>Enterobacter</i>
		22 °C	<i>Lelliottia</i>
Nährstoffe	Zugabe von Pepton (5 mg/l, 500 mg/l) Steril/Nicht steril	Rohwasser R2	<i>Enterobacter</i>
		22 °C	<i>Lelliottia</i>
		Aerob	

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methodenvergleich zur Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien

Für die Bewertung eines Nachweises von coliformen Bakterien ist es unerlässlich, die Spezies zu kennen (Gerhardy, 2019). Allerdings ist die taxonomische Einordnung von coliformen Bakterien schwierig (Brady *et al.*, 2013), zudem ist besonders für den *Enterobacter cloacae*-Komplex die Taxonomie nicht einwandfrei geklärt (Freier *et al.*, 2005; Hoffmann & Roggenkamp, 2003). Daher war es zu Beginn der Arbeit unumgänglich, eine akkurate Identifizierungsmöglichkeit für die talsperren-relevanten coliformen Bakterien zu etablieren.

Aus diesem Grund wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene Identifizierungs- und Typisierungsmethoden durchgeführt, wie die MLSA, RAPD, MALDI-TOF MS und die Genomsequenzierung, und die Ergebnisse untereinander verglichen, um eine genaue Identifizierung zu gewährleisten. Hierfür wurden die 17 für die Genomsequenzierung verwendeten Isolate der Gattungen *Lelliottia* und *Enterobacter* verwendet (Tabelle 2.5). Die Identifizierung mit dem MALDI-TOF beruht auf dem Abgleich der Proteinspektren mit einer Datenbank. Aus diesem Grund wurde diese Datenbank im Anschluss um ausgewählte Isolate erweitert (Tabelle 2.4, Tabelle 2.5). Einzelne dieser Untersuchungen werden in späteren Kapiteln genauer erläutert, in diesem Abschnitt soll der Fokus auf die Methodenetablierung, sowie den Vergleich der Identifizierungs- und Typisierungsmethoden, gelegt werden.

##### 3.1.1 Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS

Zu Beginn wurde eine Identifizierung der aus Talsperren und Seen isolierten coliformen Bakterien mittels MALDI-TOF MS durchgeführt. In Tabelle 3.1 sind die zwei jeweils besten Identifizierungsergebnisse exemplarischer Isolate zusammengestellt, die Bewertung der Ergebnisse erfolgt aufgrund des erzielten Score values und der Konsistenz zwischen diesen beiden Resultaten.

**Tabelle 3.1 Identifizierung und Typisierung mit dem MALDI-TOF.**

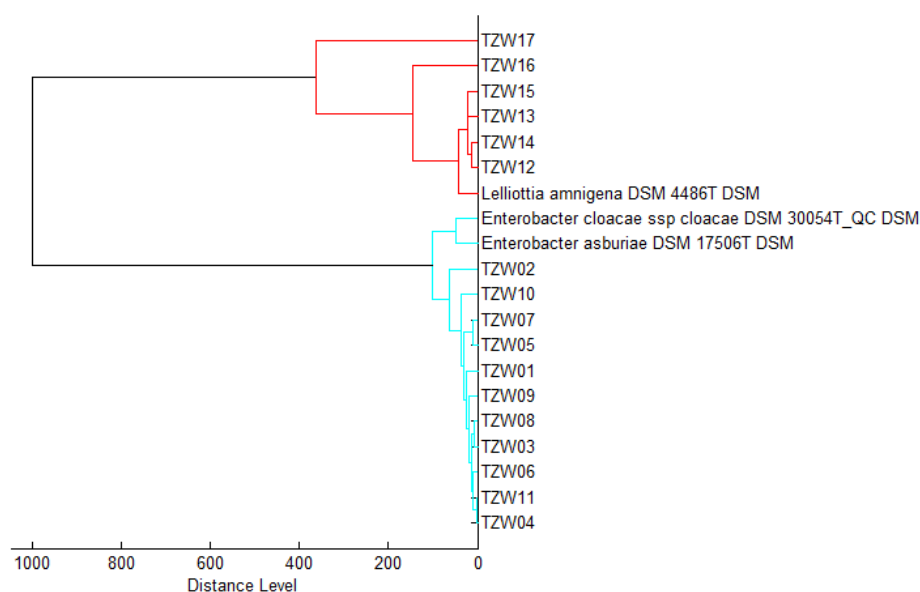
Stamm	Identifizierungsergebnis	Score value*	Konsistenz**	Cluster***
TZW01	<i>E. asburiae</i> CCM 4032	2,22	A	E'
	<i>E. asburiae</i> RV412 A1 2010 05	2,22		
TZW03	<i>E. asburiae</i> RV412 A1 2010 05 LBK	2,05	A	E'
	<i>E. asburiae</i> CCM 4032	2,03		
TZW04	<i>E. asburiae</i> RV412 A1 2010 05 LBK	2,06	B	E'
	<i>E. cloacae</i> MB11506 1 CHB	2,03		
TZW07	<i>E. asburiae</i> RV412 A1 2010 05	2,17	B	E'
	<i>E. cloacae</i> DSM 3264 BRB	2,09		
TZW09	<i>E. asburiae</i> RV412 A1 2010 05	2,12	A	E'
	<i>E. asburiae</i> CCM 4032	2,12		
TZW12	<i>L. amnigena</i> DSM 4486T	2,29	A	L'
	<i>L. amnigena</i> DSM 30055	2,24		
TZW17	<i>L. amnigena</i> 406028 2015 IMHM	2,30	B	L''
	<i>L. amnigena</i> LMG 3000	1,92		

\* ≥2,3: sehr wahrscheinliche Identifizierung der Art,  
 2,0–2,29: sichere Gattungsbestimmung, wahrscheinliche Arten Identifizierung  
 1,7–1,99: wahrscheinliche Gattungsbestimmung  
 \*\* A = Übereinstimmung der Art, B = Übereinstimmung der Gattung  
 \*\*\* Bestimmung des Clusters aufgrund Distanzlevel = 200 des Dendrogramms

Alle Isolate konnten sicher der Gattung *Enterobacter* oder *Lelliottia* zugeordnet werden. Die Artzuordnung war dagegen schwieriger. Anhand der Bewertung (Score value < 2,3) konnte lediglich in einem Fall von einer „sehr wahrscheinlichen Identifizierung der Art“ ausgegangen werden.

Bei einigen Isolaten (TZW01, TZW03, TZW09) konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um *Enterobacter asburiae* handelt. Bei anderen Isolaten (TZW04, TZW07) mussten dagegen sowohl *Enterobacter asburiae*, als auch *Enterobacter cloacae* als mögliche Arten in Betracht gezogen werden. Bei der Betrachtung des Dendrogramms (Abbildung 3.1), welches dazu verwendet wird Spektren zu vergleichen, verteilten sich die Isolate allerdings nicht wie zu erwarten in diese zwei Cluster, sondern sie waren sich stattdessen untereinander sehr ähnlich.

Ein Isolat (TZW12) konnte aufgrund des Score values „wahrscheinlich“ als *Lelliottia amnigena* identifiziert werden. Auffallend war dagegen das Isolat TZW17. Dieses wurde der Art *Lelliottia amnigena* zugeordnet, allerdings lag der Score value für das erste Ergebnis bei  $\geq 2,3$ , während das zweite Ergebnis bei 1,9 lag, was als eine Konsistenz lediglich auf Gattungsniveau zu werten ist. Bei der Betrachtung des Dendrogramms (Abbildung 3.1) zeigte sich, dass sich dieses Isolat zudem deutlich von den anderen *Lelliottia*-Isolaten unterschied. Eine genaue Artzuordnung konnte mit der vorhandenen Datenlage nicht vorgenommen werden. Allerdings muss festgehalten werden, dass als Referenz lediglich eine *Lelliottia*-Art in der MALDI-Datenbank vorhanden war, nämlich *Lelliottia amnigena*.



**Abbildung 3.1 Dendrogramm der MALDI-TOF Spektren.**

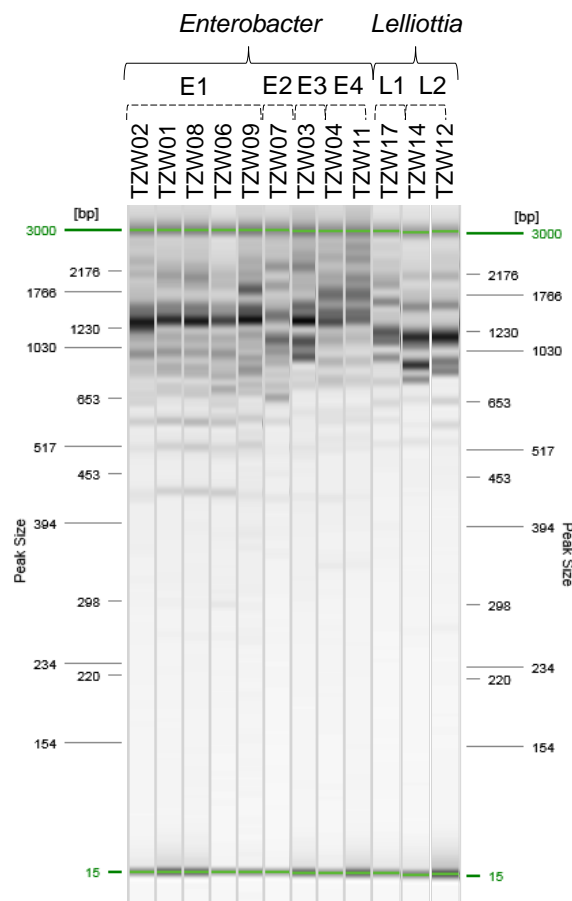
Dargestellt ist das Dendrogramm, welches aufgrund der MALDI-TOF Spektren der 17 Isolate berechnet wurde. Zur Distanzbestimmung wurde die Korrelations-Methode nach Pearson, für die Clusterbildung die UPGMA-Methode verwendet. Der „Distance Level“ zeigt an, wie ähnlich sich die Spektren untereinander sind, je kleiner der Wert, desto ähnlicher. Es wurden zudem drei Referenzspektren von Typstämmen der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* aus der Bruker-Datenbank als Vergleich hinzugezogen. Alle Isolate der Gattung *Enterobacter* sind in blau, der Gattung *Lelliottia* in rot dargestellt.

### 3.1.2 Typisierung mittels RAPD

Zur Typisierung der Bakterien wurde die DNA extrahiert und eine RAPD durchgeführt. Diese Methode dient dazu, Organismen taxonomisch einzuordnen und untereinander zu vergleichen. Für diese PCR wird lediglich ein Primer verwendet, der an mehrere variable Stellen innerhalb des Bakteriengenoms bindet, woraus sich stammspezifische Bandenmuster ergeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die Bandenmuster zwischen den beiden Gattungen unterschieden sich deutlich voneinander, aber auch innerhalb der Gattungen konnten Unterschiede festgestellt werden. Für *Enterobacter* konnten vier verschiedene Bandenmuster festgestellt werden, woraus sich demnach vier Stämme ergeben. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen des MALDI-Dendrogramms, wonach sich die *Enterobacter*-Isolate untereinander sehr ähnelten.

Für *Lelliottia* ergaben sich zwei verschiedene Cluster, das eine Cluster bestand aus TZW17, das andere aus TZW12 und TZW14. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Untersuchung mit dem MALDI-TOF, wonach sich der Stamm TZW17 von den anderen Stämmen unterscheidet. Ob es sich dabei um einen anderen Stamm, oder gar um eine andere Art handelt, kann mit dieser Methode nicht geklärt werden.



**Abbildung 3.2** Typisierung der Isolate coliformer Bakterien mittels RAPD.

Kapillarelektrophoretisch aufgetrenntes Bandenmuster der RAPD-PCR mit dem GTG<sub>5</sub>-Primer. Dieser Primer bindet an variable Stellen innerhalb des Bakteriengenoms, woraus sich stammspezifische Bandenmuster ergeben. Untersucht wurden Isolate der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia*.

### 3.1.3 Identifizierung mittels MLSA und Genomsequenzierung

Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Identifizierung der Bakterien mittels MLSA durchgeführt. Hierfür wurde die DNA der coliformen Bakterien extrahiert und die Gene *atpD*, *gyrB*, *infB* und *rpoB* nach Brady *et al.* (2008) analysiert (Kapitel 3.3). Darüber hinaus wurde eine Genomsequenzierung des gesamten Bakteriengenoms durchgeführt, aufgrund dessen die Taxonomie berechnet werden kann (Kapitel 3.8.2). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.2 dargestellt, diese beruht auf der phylogenetischen Analyse der isolierten Stämme, die in späteren Kapitel genauer beschrieben ist (Abbildung 3.12, Abbildung 3.41).

Insgesamt konnten die Stämme mit der MLSA sehr eindeutig einer Art zugeordnet werden. Lediglich bei Isolat TZW04 war die Zuordnung uneindeutig, es unterschied sich deutlich von den anderen *Enterobacter asburiae*-Isolaten, die dem Typstamm ATCC 35953<sup>T</sup> sehr ähnelten. Stattdessen bildete es ein gemeinsames Cluster mit *Enterobacter roggkampii*, *Enterobacter cloacae*, sowie vereinzelt *Enterobacter asburiae*-Isolaten. Dies bestätigt zwar die uneindeutigen Identifizierungsergebnisse mittels MALDI-TOF, die genaue Artzuordnung war dennoch nicht geklärt. Bei den *Lelliottia*-Isolaten bestätigte sich in einem der Fälle (TZW12) die Identifizierung als *Lelliottia amnigena*. Das andere Isolat (TZW17) wurde dagegen als *Lelliottia aquatilis* identifiziert. Diese Art wurde mit dem MALDI-TOF nicht erkannt, was allerdings auch nicht möglich war, da lediglich *Lelliottia amnigena* in der Datenbank vorhanden war. Was sich damit bestätigt, ist das Ergebnis des MALDI-Dendrogramms, wonach sich dieses Isolat von den anderen unterscheidet. Die Cluster, die sich im Stammbaum der MLSA zeigen, sind vergleichbar mit denen der RAPD.

Eine exakte Artzuordnung war lediglich mit der Genomsequenzierung möglich. Hier konnten alle Isolate eindeutig einem Typstamm zugeordnet werden. Alle *Enterobacter*-Isolate wurden als *Enterobacter asburiae* identifiziert, was die MALDI-TOF-Clusteranalyse bestätigt, wonach sich die Spektren der Isolate untereinander sehr ähnelten (Abbildung 3.1). Lediglich das Isolat TZW03 unterschied sich von den anderen und wurde dem Stamm HK169 zugeordnet. Anders als mit dem MALDI-TOF und der MLSA wurde das Isolat TZW04 deutlich als *Enterobacter asburiae* identifiziert. Die Ergebnisse der *Lelliottia*-Isolate aus der MLSA bestätigten sich ebenfalls, wonach es sich dabei um zwei verschiedene Arten handelt. Die Clusterbildung, die aufgrund der durchschnittlichen Nukleotididentität (ANI) (Abbildung 3.40) festgestellt wurden, entsprechen den Clustern der RAPD, sowie der MLSA.

**Tabelle 3.2 Identifizierung mittels MLSA und Genomsequenzierung.**

Stamm	MLSA	Genomsequenzierung	Cluster
TZW01	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	E1
TZW03	<i>E. asburiae</i> HK169	<i>E. asburiae</i> HK169	E3
	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	
TZW04	<i>E. asburiae</i> CAV1043	<i>E. asburiae</i> CAV1043	E4
	<i>E. asburiae</i> ENIPBJ-CG1	<i>E. asburiae</i> ENIPBJ-CG1	
	<i>E. roggkampii</i> DSM 16690 <sup>T</sup>	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	
	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 <sup>T</sup>		
TZW07	<i>E. asburiae</i> MRY18-106	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	E2
TZW09	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	<i>E. asburiae</i> ATCC 35953 <sup>T</sup>	E1
TZW12	<i>L. amnigena</i> NCTC12134 <sup>T</sup>	<i>L. amnigena</i> NCTC12134 <sup>T</sup>	L1
TZW17	<i>L. aquatilis</i> 6331-17 <sup>T</sup>	<i>L. aquatilis</i> 6331-17 <sup>T</sup>	L2

### 3.1.4 Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS und R nach der Datenbankerweiterung

Auf Basis der Identifizierungsergebnisse wurden die in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 genannten Stämme der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* der MALDI-TOF-Datenbank hinzugefügt. Dabei handelte es sich um 71 Stämme der Arten *Lelliottia amnigena* (11x), *Lelliottia aquatilis* (9x), *Lelliottia nimipressuralis* (6x), *Enterobacter asburiae* (30x), *Enterobacter ludwigii* (7x), *Enterobacter roggenkampii* (1x), sowie des *Enterobacter cloacae*-Komplexes (7x). Anschließend wurden die talsperren-relevanten Isolate der vorangegangenen Versuche erneut identifiziert, die Ergebnisse dieser Identifizierung sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt, das Dendrogramm ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Nach der Datenbankerweiterung konnte bei allen Isolaten eine Übereinstimmung der Art (Konsistenz A) zwischen den ersten zwei Ergebnissen erzielt werden. Die *Enterobacter*-Isolate konnten alle eindeutig als *Enterobacter asburiae* identifiziert werden, im Großteil der Fälle mit einem Score Value, der als sehr wahrscheinliche Identifizierung der Art gewertet werden kann ( $\geq 2,3$ ). Für *Lelliottia* konnten durch die Datenbankerweiterung ebenfalls eine „sehr wahrscheinliche Artidentifizierung“ erzielt werden. Dabei handelte sich um zwei verschiedene Arten, nämlich *Lelliottia amnigena* (TZW12), sowie *Lelliottia aquatilis* (TZW17). Dies ist vergleichbar zu den Ergebnissen der Genomsequenzierung. Auch anhand des Dendrogramms bestätigen sich diese Ergebnisse (Abbildung 3.3).

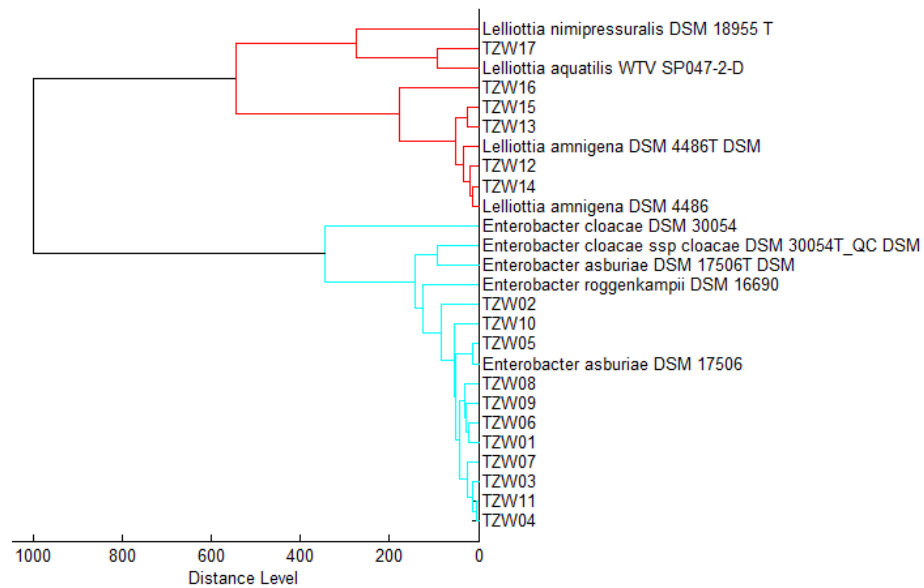
**Tabelle 3.3 Identifizierung und Typisierung mit dem MALDI-TOF nach der Erweiterung der Datenbank.**

Stamm	Identifizierungsergebnis	Score Value*	Konsistenz**	Cluster***
TZW01	<i>E. asburiae</i> CCM 4032	2,22	A	E'
	<i>E. asburiae</i> KGB10 18D1860-02	2,22		
TZW03	<i>E. asburiae</i> BS 1.7	2,39	A	E'
	<i>E. asburiae</i> WTV 2018T05827D	2,34		
TZW04	<i>E. asburiae</i> WTV 2018T05827D	2,36	A	E'
	<i>E. asburiae</i> BS 1.7	2,19		
TZW07	<i>E. asburiae</i> WTV 2018T05827D	2,37	A	E'
	<i>E. asburiae</i> BS 3.4	2,26		
TZW09	<i>E. asburiae</i> WTV 2018T05827D	2,30	A	E'
	<i>E. asburiae</i> WAG ROW 14-02	2,25		
TZW12	<i>L. amnigena</i> WKK03 04-C01	2,46	A	L'
	<i>L. amnigena</i> KGB02 18D0844-05	2,45		
TZW17	<i>L. aquatilis</i> KGB02 18D0844-08	2,62	A	L''
	<i>L. aquatilis</i> WTV 18D1551-01	2,61		

\*  $\geq 2,3$ : sehr wahrscheinliche Identifizierung der Art,  
2,0–2,29: sichere Gattungsbestimmung, wahrscheinliche Arten Identifizierung  
1,7–1,99: wahrscheinliche Gattungsbestimmung

\*\* A = Übereinstimmung der Art, B = Übereinstimmung der Gattung

\*\*\* Bestimmung des Clusters aufgrund Distanzlevel = 200 des Dendrogramms



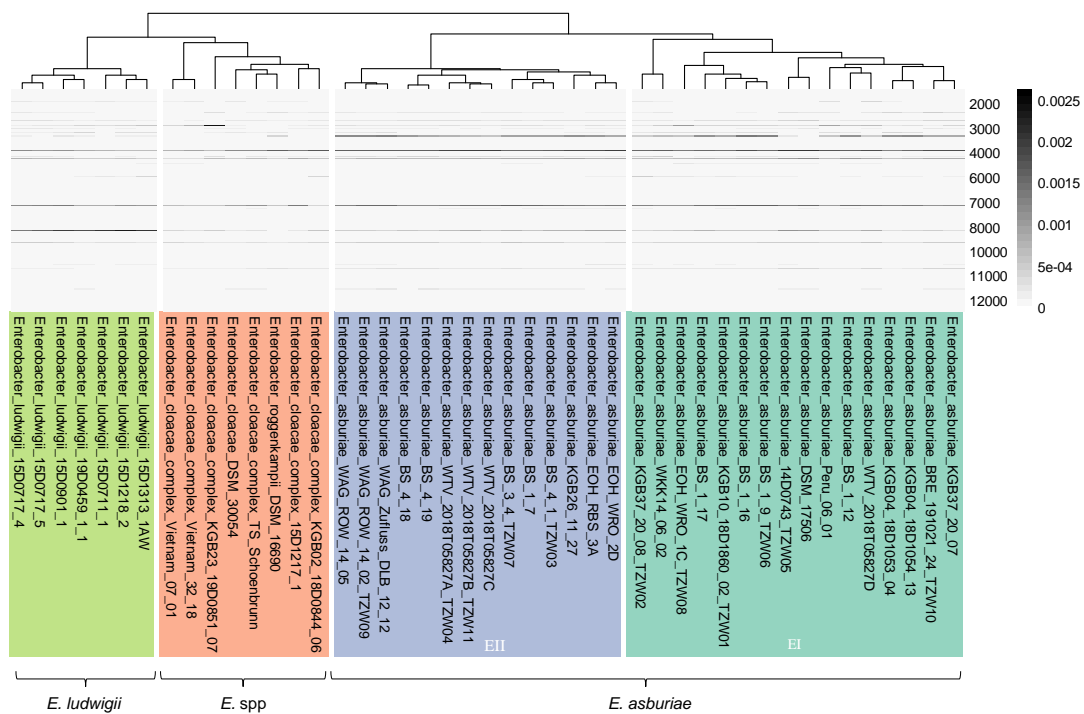
**Abbildung 3.3 Dendrogramm der MALDI-TOF Spektren nach der Datenbankerweiterung.**

Dargestellt ist das Dendrogramm, welches aufgrund der MALDI-TOF Spektren der 17 Isolate berechnet wurde. Zur Distanzbestimmung wurde die Korrelations-Methode nach Pearson, für die Clusterbildung die UPGMA-Methode verwendet. Der „Distance Level“ zeigt an, wie ähnlich sich die Spektren untereinander sind, je kleiner der Wert, desto ähnlicher. Es wurden zudem Referenzspektren von Typstämmen der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* aus Bruker-Datenbank als Vergleich hinzugezogen, sowie neu eingespeicherte Spektren von Typstämmen. Alle Isolate der Gattung *Enterobacter* sind in blau, der Gattung *Lelliottia* in rot dargestellt.

Mithilfe von R können selbsterstellte MALDI-TOF Spektren ebenfalls verglichen werden. Dies bietet die Möglichkeit einer genaueren statistischen Analyse, als dies mit der Bruker-Software MBT Compass Explorer möglich ist. Hierfür wurden die neu erstellten Datenbankeinträge mittels R untersucht und eine Clusteranalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der Clusteranalyse sind in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 dargestellt. Diese sind vergleichbar zu dem Dendrogramm des MBT Compass Explorer (Abbildung 3.3).

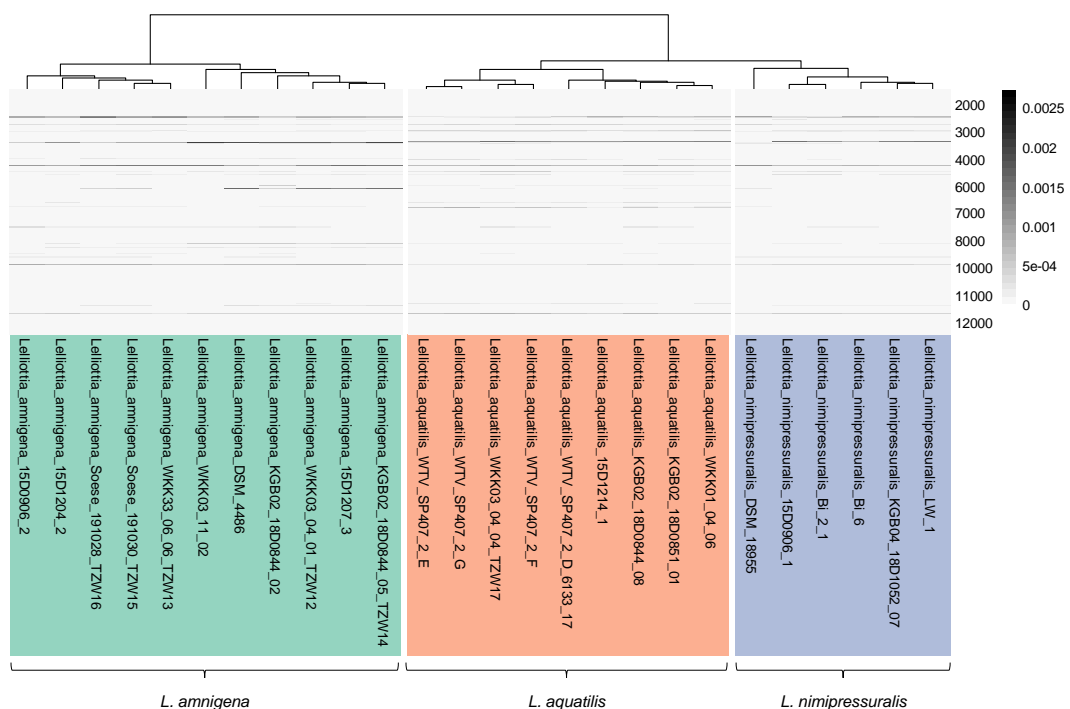
Die Clusteranalyse der *Enterobacter*-Isolate (Abbildung 3.4) zeigte, dass *Enterobacter asburiae* eindeutig von anderen Arten unterschieden werden kann, wobei sich zwei Cluster bildeten. Für weitere Arten, wie *Enterobacter roggenkampii*, *Enterobacter cloacae* und weitere Arten des *Enterobacter cloacae*-Komplexes war die Identifizierung noch immer uneindeutig. Diese Schwierigkeiten begründen sich besonders dadurch, dass nur sehr wenige Isolate eingespeichert wurden, weswegen hier weiterer Forschungsbedarf besteht, um diese Arten eindeutig unterscheiden zu können. Anders ist dies bei der Art *Enterobacter ludwigii*, hier konnten sehr viele Isolate der Datenbank zugefügt werden, was zu einer eindeutigen Unterscheidung dieser Art führte. Bei den *Lelliottia*-Isolaten war die Zuordnung sehr eindeutig, es konnte deutlich zwischen den Arten *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis* und *Lelliottia nimipressuralis* unterschieden werden.

Mit Hilfe der Datenbankerweiterung konnte also eine eindeutige Identifizierung von fünf Arten etabliert werden (*Enterobacter asburiae*, *Enterobacter ludwigii*, *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis*, *Lelliottia nimipressuralis*). Dies war relevant für die Identifizierung der Talsperren-Isolate (Kapitel 3.2) und garantierte eine korrekte Identifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Isolate.



**Abbildung 3.4 Clusteranalyse der MALDI-TOF Spektren der Gattung *Enterobacter*.**

Dargestellt ist eine Heatmap, die die Peaks des jeweiligen Spektrums im Bereich 2000 bis 12000 m/z zeigt, je dunkler der Strich, desto höher der jeweilige Peak (Intensität). Zudem wurde ein Dendrogramm berechnet, aufgrund euklidischer Abstandsmaße, sowie der Average-Linkage-Methode zur Clusterbildung. Pro Stamm wurden 20 Spektren analysiert.



**Abbildung 3.5 Clusteranalyse der MALDI-TOF Spektren der Gattung *Lelliottia*.**

Dargestellt ist eine Heatmap, die die Peaks des jeweiligen Spektrums im Bereich 2000 bis 12000 m/z zeigt, je dunkler der Strich, desto höher der jeweilige Peak (Intensität). Zudem wurde ein Dendrogramm berechnet, aufgrund euklidischer Abstandsmaße, sowie der Average-Linkage-Methode zur Clusterbildung. Pro Stamm wurden 20 Spektren analysiert.

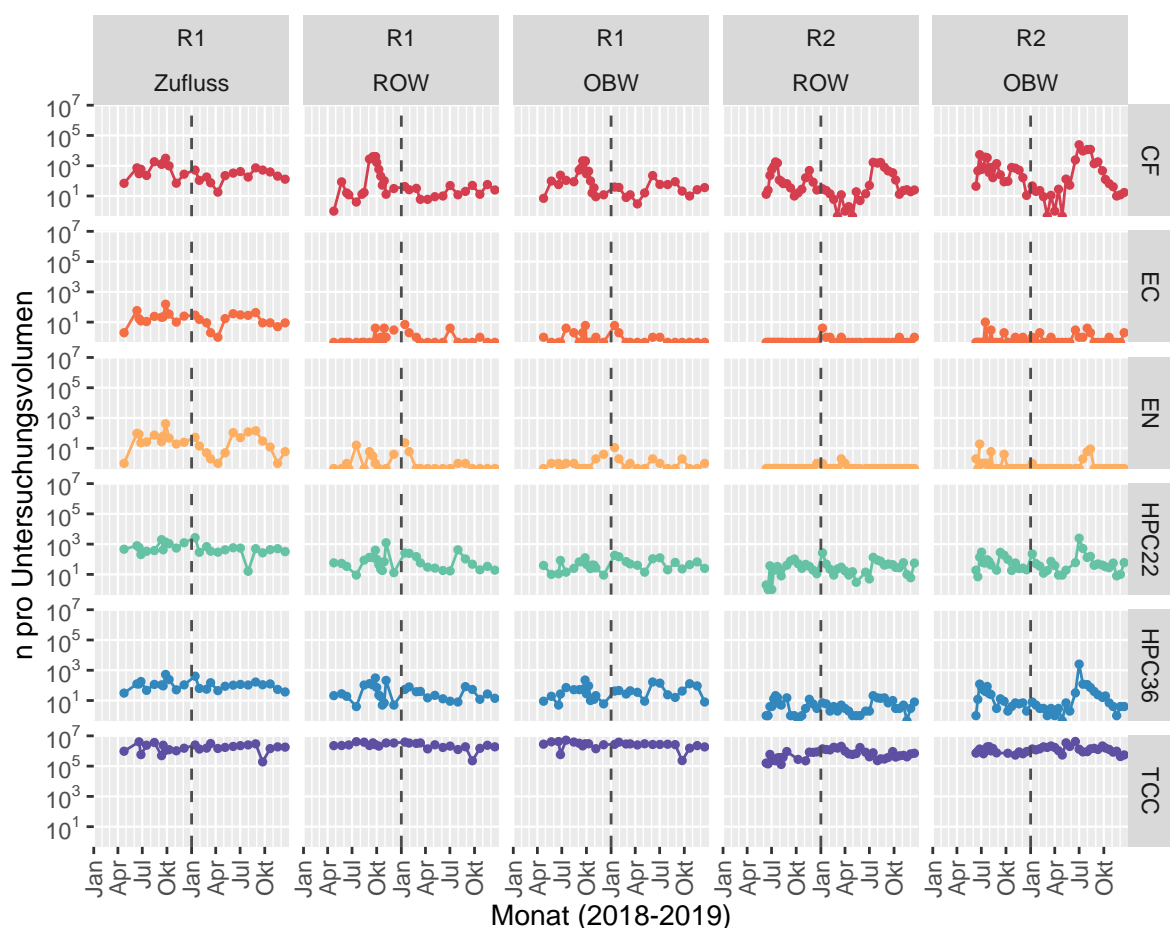


## 3.2 Mikrobiologisches Monitoring in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig

### 3.2.1 Mikrobiologische Parameter

Um das Phänomen des massenhaften Auftretens coliformer Bakterien in Talsperren genauer zu untersuchen, wurde ein ausführliches Monitoringprogramm durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Monitoringprogramms wurden bereits publiziert (Reitter *et al.*, 2021b). Hierfür wurden mikrobiologische Parameter in dem Rohwasser und Oberflächenwasser der Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig in den Jahren 2018 und 2019 untersucht. Für die Talsperre Klingenberg konnte zusätzlich der Hauptzufluss beprobt werden. Die mikrobiologische Überwachung umfasste die Parameter *E. coli*, coliforme Bakterien, Enterokokken, Koloniezahl (bei 22 °C und 36 °C) und Gesamtzellzahl. Anschließend wurden die coliformen Bakterien und Enterokokken identifiziert.

Die beiden Talsperren wurden ausgewählt, da in beiden in den vorangegangenen Jahren jeweils hohe Konzentrationen an coliformen Bakterien nachgewiesen wurden, zudem sind sie sich von der Größe her ähnlich, aber ansonsten unterschiedlich und können als repräsentativ für typische schwach mesotrophe (Klingenberg) und oligotrophe (Kleine Kinzig)



**Abbildung 3.6** Mikrobiologische Parameter in der Talsperre Klingenberg, sowie Kleine Kinzig von 2018 bis 2019.

Untersucht wurden der Zufluss, das Rohwasser (ROW), sowie das Oberflächenwasser (OBW) der Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2). Das untersuchte Volumen betrug für coliforme Bakterien (CF), *Escherichia coli* (EC) und Enterokokken (EN) 100 ml, sowie für die Koloniezahl bei 22 und 36 °C (HPC22, HPC36) und Gesamtzellzahl (TCC) 1 ml.

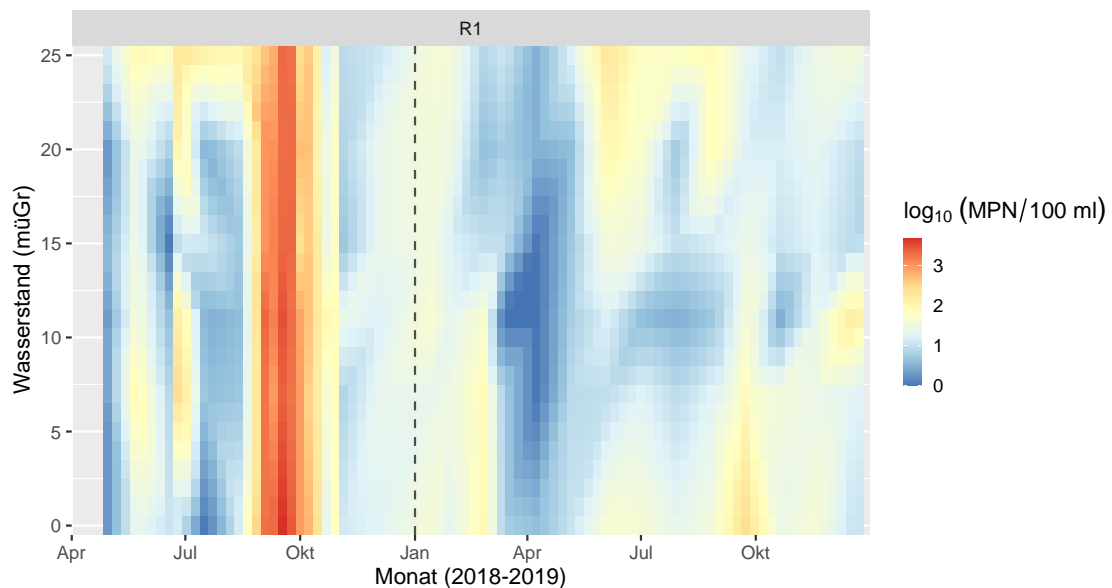
Trinkwassertalsperren angesehen werden (Tabelle 2.13). Abbildung 3.6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen.

In der Talsperre Kleine Kinzig wurden im Rahmen der Arbeit jeweils 44 Wasserproben analysiert. Im Großteil der Proben konnten die FIB *E. coli* und Enterokokken in 100 ml Wasserproben nicht nachgewiesen werden. Mit einer Häufigkeit von 34 % der Proben wurde *E. coli* in den Oberflächenwasserproben häufiger nachgewiesen als in den Rohwasserproben (14 %). Dies war vergleichbar mit dem Nachweis von Enterokokken mit 27 % positiven Proben im Oberflächenwasser im Vergleich zu 9 % im Rohwasser. Die maximale Konzentration von *E. coli* betrug 10 MPN/100 ml im Oberflächenwasser und 4 MPN/100 ml im Rohwasser. Bei den Enterokokken wurden die höchsten Werte mit 19 KBE/100 ml im Oberflächenwasser und 2 KBE/100 ml im Rohwasser festgestellt. Die dominierende Spezies war der Umweltstamm *Enterococcus rotai* (61 % der positiven Ergebnisse).

Im Gegensatz dazu wurden coliforme Bakterien in allen bis auf zwei Proben (98 %) nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, variierte die Konzentration coliformer Bakterien im Roh- und Oberflächenwasser über drei bis vier Größenordnungen und reichte von unter der Nachweisgrenze in 100 ml bis zu  $5,4 \times 10^3$  MPN/100 ml (2018) beziehungsweise über  $2,4 \times 10^4$  MPN/100 ml (2019). In beiden Wasserschichten wurden 2018, sowie 2019 hohe Konzentrationen beobachtet, beginnend von Ende Juni bis Ende September. Während die Konzentration an coliformen Bakterien im Jahr 2019 über den gesamten Sommer hinweg hoch blieb, konnte im Jahr 2018 nach dem anfänglichen Peak im Juni/Juli ein Rückgang der Konzentration beobachtet werden und wobei ein zweiter Peak im November 2018 auftrat. Die höchsten Zahlen an coliformen Bakterien wurden im Oberflächenwasser mit einem Maximum von  $5,4 \times 10^3$  MPN/100 ml im Juni 2018 und etwa der zehnfachen Menge im Juli 2019 ( $>2,4 \times 10^4$  MPN/100 ml) beobachtet. Im Rohwasser waren die Zahlen niedriger mit einem Maximum von etwa  $1,7 \times 10^3$  MPN/100 ml in beiden Jahren.

In der Talsperre Klingenberg wurden ebenfalls regelmäßige Probenahmen durchgeführt ( $n = 32$ ). Die fäkalen Indikatoren *E. coli* und Enterokokken wurden häufiger nachgewiesen als in der anderen Talsperre. *E. coli* wurde in 31 % aller Oberflächenwasserproben und in 34 % aller Rohwasserproben nachgewiesen. Enterokokken wurden in 59 % der Oberflächenwasser- und in 50 % der Rohwasserproben nachgewiesen. Die höchsten Werte von *E. coli* lagen bei 7 MPN/100 ml, sowohl im Oberflächenwasser als auch im Rohwasser. Enterokokken erreichten den Höchstwert von 11 KBE/100 ml im Rohwasser und 23 KBE/100 ml im Oberflächenwasser.

Coliforme Bakterien wurden in allen Proben nachgewiesen. Im Gegensatz zur Talsperre Kleine Kinzig wurden im Rohwasser mit  $4,0 \times 10^3$  MPN/100 ml im September 2018 die höchsten Zahlen an coliformen Bakterien erreicht. Im Oberflächenwasser wurden die Höchstzahlen ebenfalls im September 2018 nachgewiesen, erreichten aber eine etwas geringere Konzentration von  $2,1 \times 10^3$  MPN/100 ml. Überraschenderweise wurden diese hohen Zahlen von coliformen Bakterien lediglich im Jahr 2018 beobachtet. Im Jahr 2019 lag die maximale Konzentration an coliformen Bakterien bei  $2,3 \times 10^2$  MPN/100 ml, die im September im Oberflächenwasser erreicht wurde. Bei der Betrachtung des Tiefenschnittes in der Talsperre Klingenberg zeigt sich zudem, dass alle Tiefenstufen von diesem Anstieg betroffen sind (Abbildung 3.7).

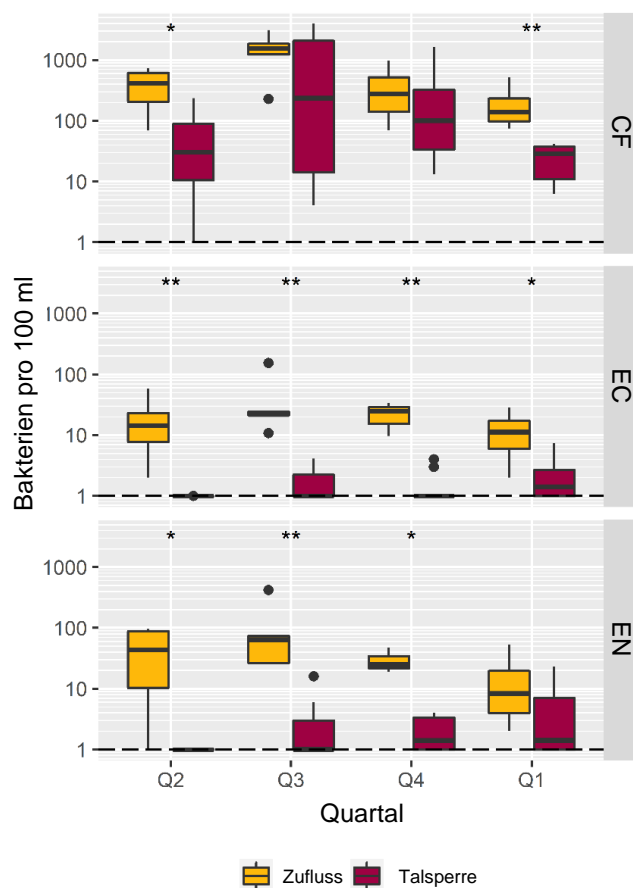


**Abbildung 3.7 Konzentration coliformer Bakterien im Tiefschnitt der Talsperre Klingenberg von 2018 bis 2019.**

Dargestellt ist die Konzentration coliformer Bakterien über den zeitlichen Verlauf im Tiefschnitt der Talsperre Klingenberg (R1) von 2018 bis 2019. Es zeigt sich, dass bei einem Anstieg der Konzentration coliformer Bakterien alle Tiefenstufen betroffen sind.

In Klingenberg wurde der Hauptzufluss der Talsperre (Wilde Weißeritz) ebenfalls regelmäßig beprobt ( $n = 26$ ). Im Gegensatz zur Talsperre (Oberflächen- und Rohwasser) wies der Zufluss keine starken saisonalen Unterschiede auf, zudem wurden in allen Proben die FIB *E. coli* und Enterokokken nachgewiesen. Sie erreichten Maximalwerte von  $1,5 \times 10^2$  MPN/100 ml für *E. coli* und  $4,2 \times 10^2$  KBE/100 ml für Enterokokken, also etwa 1,5  $\log_{10}$ -Stufen höher als in der Talsperre. Coliforme Bakterien wurden ebenfalls in allen Proben beobachtet. Hier lag die maximale Anzahl bei  $3,1 \times 10^3$  MPN/100 ml (Abbildung 3.6).

Um Unterschiede zwischen der Talsperre Klingenberg (Roh- und Oberflächenwasser) und ihrem Hauptzufluss (Wilde Weißeritz) festzustellen, wurden die ersten vier Quartale des Monitoringprogramms (April 2018 – März 2019) miteinander verglichen (Abbildung 3.8, Tabelle A 1). Es konnte beobachtet werden, dass die Zahlen aller drei Indikatoren im Zufluss meist mindestens zehnmal höher waren als in der Talsperre. Nur in den Sommermonaten erreichten die Zahlen der coliformen Bakterien in der Talsperre höhere Maxima als im Zufluss. Die FIB *E. coli* und Enterokokken waren jedoch im Zulauf signifikant höher ( $p \leq 0,05$ ). Außerdem lagen die FIB in vielen Proben der Talsperre unter der Nachweisgrenze (1 pro 100 ml), während im Zufluss diese Bakterien in allen Proben nachweisbar waren. Dies zeigt, dass die Talsperre und ihr Zufluss sich signifikant unterschieden.



**Abbildung 3.8 Unterschiede der mikrobiologischen Parameter zwischen der Talsperre Klingenberg und ihrem Zufluss.**

Verglichen wurden die Talsperre Klingenberg, bestehend aus Roh- und Oberflächenwasser, mit ihrem Hauptzufluss mit den Parametern coliforme Bakterien (CF), *E. coli* (EC) und Enterokokken (EN). Q2: Apr – Juni 2018, Q3: Juli – Sep 2018, Q4: Okt – Dez 2019, Q1: Jan – Mär 2019. Die schwarze Linie stellt die Nachweisgrenze von 1 dar. Zur grafischen Veranschaulichung wurden Werte unterhalb der Nachweisgrenze (<1) auf 0,99 gesetzt. Zur Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Zufluss- und Rückhalteproben wurde der Mann-WhitneyU-Test durchgeführt (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ ).

### 3.2.2 Identifizierung coliformer Bakterien

Eine saisonbedingte Dynamik wurde nicht nur in Bezug auf die Konzentration coliformer Bakterien, sondern auch in Bezug auf die Artzusammensetzung gefunden, wie Abbildung 3.9 zeigt. Insgesamt konnten 45 Arten coliformer Bakterien identifiziert werden, welche 20 Gattungen angehörten. Die fünf häufigsten Gattungen waren *Serratia*, *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Citrobacter* und *Buttiauxella*.

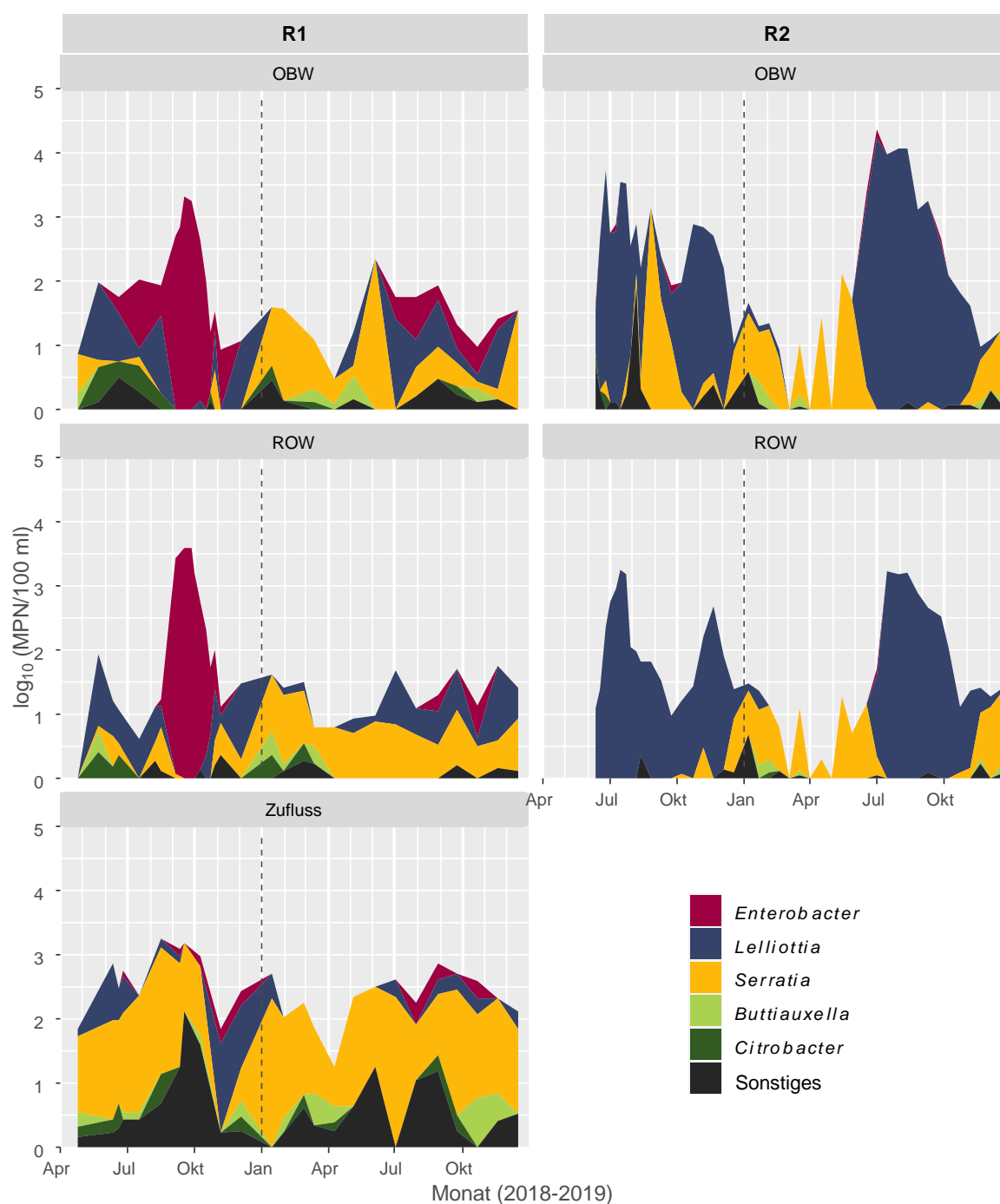
In der Talsperre Kleine Kinzig (Oberfläche und Rohwasser) wurden 16 Arten aus 13 Gattungen identifiziert (Tabelle 3.4). Dabei zeigten sich zwei dominante Gattungen, und zwar *Lelliottia* (72 %) und *Serratia* (21 %). Im Winter wurde letztere häufiger identifiziert, sobald allerdings die Konzentrationen der coliformer Bakterien insgesamt anstieg, dominierte *Lelliottia*. Die Diversität nahm während dieser Zeit ab, von drei bis vier effektiven Arten bis zu lediglich zwei, und zwar *Lelliottia amnigena* und *Lelliottia aquatilis*.

Die Talsperre Klingenberg unterschied sich davon erheblich. In der Talsperre (Oberfläche und Rohwasser) wurden 25 Arten aus 14 Gattungen identifiziert. Wie in der Talsperre Kleine Kinzig dominierte auch hier *Serratia* während der Winterperiode, bei einer hohen Diversität an coliformen Bakterien. Die Gattung *Lelliottia* trat ebenfalls häufig auf, besonders im Frühjahr kam es zu einer starken Zunahme dieser Gattung. Ab dem Spätsommer 2018, der Zeit mit der höchsten gemessenen Konzentration an coliformen Bakterien, dominierte *Enterobacter*. Die Diversität nahm zu diesem Zeitpunkt deutlich ab, bis ausschließlich *Enterobacter asburiae* nachzuweisen war (Tabelle 3.4). Während dieser Monitoringstudie wurde diese Art zum ersten Mal im Frühsommer beider Jahre im Oberflächenwasser nachgewiesen. Während sie 2019 insgesamt lediglich sporadisch auftrat, dominierte sie 2018 dagegen ab September die gesamte Talsperre.

Einen Kontrast dazu bildete der Hauptzufluss der Talsperre Klingenberg. Hier wurden insgesamt 30 Arten aus 18 Gattungen identifiziert. Artenreichtum und Diversität waren hier insgesamt höher als in der Talsperre. Zudem zeigten beide Parameter keine starken Änderungen, wenn man die beiden Zeitpunkte mit hoher und niedriger Konzentration coliformer Bakterien getrennt betrachtet. Die dominante Gattung war *Serratia*. In den seltenen Fällen, in denen *Enterobacter* nachgewiesen wurde, wurde diese als *Enterobacter cloacae* identifiziert.

**Tabelle 3.4 Artenreichtum und Diversität innerhalb der Talsperrenproben zu Zeitpunkten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien.**

Probe			Arten- reichtum	Shannon Index	Shannon Effective	Simpson Index	Simpson Effective
R1	Oberfläche	hoch	2	0,1	1,1	0,9	1,1
		niedrig	19	2,2	9,5	0,2	6,4
	Rohwasser	hoch	6	0,3	1,3	0,9	1,1
		niedrig	16	2,1	8,1	0,2	5,5
Zufluss	hoch	17	2,2	9,4	0,2	6,2	
	niedrig	26	2,5	12,2	0,1	6,7	
R2	Oberfläche	hoch	6	1,0	2,7	0,5	2,1
		niedrig	13	1,7	5,7	0,2	4,3
	Rohwasser	hoch	3	0,8	2,2	0,5	1,9
		niedrig	10	1,4	4,2	0,3	3,3

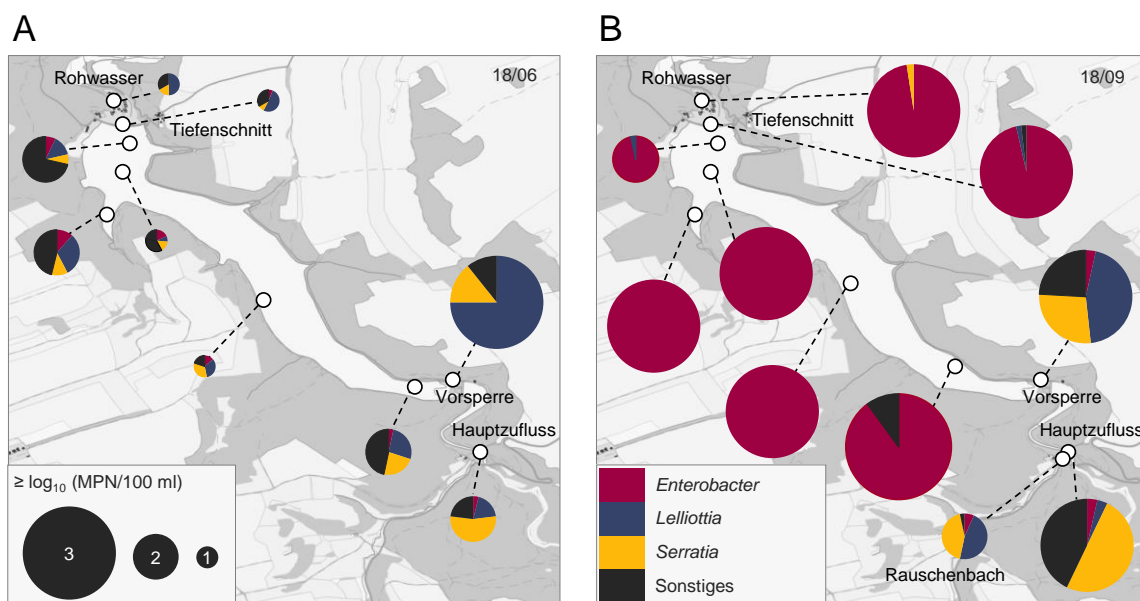


**Abbildung 3.9 Konzentration und Identifizierung coliformer Bakterien in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig von 2018 bis 2019.**

Beprobte wurden in den Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2) jeweils das Rohwasser (ROW), sowie das Oberflächenwasser (OBW). Für die Talsperre Klingenberg konnte zudem der Zufluss untersucht werden. Insgesamt wurden fünf dominante Gattungen gefunden: *Enterobacter*, *Lelliottia*, *Serratia*, *Buttiauxella* und *Citrobacter*. Zudem wurden folgende Gattungen identifiziert, die unter „Sonstiges“ zusammengefasst wurden: *Dickeya*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Moellerella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella* und *Yersinia*.

### 3.2.3 Probenahmekampagne in der Talsperre Klingenberg

Um zu klären, inwieweit die coliformen Bakterien die komplette Talsperre besiedeln, wurden die Untersuchungen durch zwei Probenahmekampagnen in der Talsperre Klingenberg im Juni und September 2018 ergänzt. Hierfür wurden die sechs Entnahmehorizonte, sowie die Zuflüsse und Oberflächenwasserproben der Talsperre beprobt und die coliformen Bakterien quantifiziert und identifiziert. Im September 2018 wurde auch ein Zulauf aus der Talsperre Rauschenbach mit beprobt, da zu diesem Zeitpunkt aufgrund der niedrigen Wasserstände der Talsperre Klingenberg Wasser aus diesem Reservoir zugeführt wurde. Zusätzlich zu den coliformen Bakterien erfolgte im Zuge der Probenahmekampagne die Untersuchung von Fäkalmarkern (MST) und die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft.



**Abbildung 3.10 Probenahmekampagne an der Talsperre Klingenberg.**

Quantifizierung und Identifizierung coliformer Bakterien an der Talsperre Klingenberg (R1) während der Probenahmekampagne im Juni (A) und September (B) 2018.

Abbildung 3.10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse in ausgewählten Proben. Wie in Abbildung 3.10A zu sehen, waren die Zahlen coliformer Bakterien im Juni 2018 sehr gering mit einem Median von  $3,3 \times 10^2$  MPN/100 ml ( $n = 19$ ). Lediglich die Zuflüsse zeigten höhere Konzentrationen, beispielsweise hatte der Abfluss der Vorsperre eine Konzentration von  $2,6 \times 10^3$  MPN/100 ml, was einer  $\log_{10}$ -Stufen mehr entspricht. Die Identifizierung zeigte ein sehr variables Bild. Es wurden mehrere Gattungen coliformer Bakterien identifiziert, wie *Lelliottia* spp. (23 %), *Serratia* spp. (19 %), *Citrobacter* spp. (14 %) und *Enterobacter* spp. (11 %), wobei die meisten davon als *Enterobacter asburiae* identifiziert wurden.

Im September waren die Zahlen insgesamt etwa zwei  $\log_{10}$ -Stufen höher als im Juni ( $n = 20$ ) mit einem Median von  $1,4 \times 10^3$  MPN/100 ml (Abbildung 3.10B). Auch die Zusammensetzung hatte sich stark verändert und *Enterobacter asburiae* (95 %) dominierte die Talsperre. Lediglich in den Zuflüssen hatte sich die Zusammensetzung im Vergleich zum Juni wenig geändert und *Serratia* spp. dominierte noch immer den Hauptzufluss (52 %), sowie *Lelliottia* spp. in die Vorsperre (43 %). In der Wasserleitung aus der Rauschenbach Talsperre hatten beide Gattungen in etwa die gleiche Konzentration (>40 %). Insgesamt gehörten weniger als 5 % aller Isolate aus den drei Zuflüssen *Enterobacter* spp. an, die meisten wurden als *Enterobacter ludwigii* identifiziert.

### 3.2.4 Microbial Source Tracking (MST)

Der Nachweis von MST-Markern deutet auf potentiell hygienisch-relevante Bakterien innerhalb der Talsperre hin, zudem kann mit dieser Methode die potentielle Fäkaleintragsquelle einer Wasserprobe identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden zu je zwei Zeitpunkten in den beiden Talsperren Proben genommen und auf MST-Marker untersucht: einmal zu einem Zeitpunkt mit vielen coliformen Bakterien (hoch), einmal zu einem Zeitpunkt mit wenigen coliformen Bakterien (niedrig).

Im Falle der Klingenberg Talsperre war dies im Juni und September 2018, als das Oberflächenwasser der Talsperre, das Tiefenprofil, sowie die Zuflüsse im Rahmen der Probenahmekampagne beprobt wurden. In der Talsperre Kleine Kinzig wurde die Probenahme im Juli und Dezember 2019 aus dem Tiefenprofil entnommen. Die DNA der Proben wurde extrahiert und eine qPCR mit wirtsspezifischen 16S rRNA-Sequenzen von *Bacteroidales* Bakterien durchgeführt, um Fäkalkontamination von Mensch, Wiederkäuer und Schweinen zu identifizieren. Die Quantifizierung lässt sich vergleichen mit den Gesamtzellzahlen, gemessen mit der Durchflusszytometrie, sowie den 16S rRNA-Genen, welche mit der qPCR gemessen wurden (Tabelle 3.5).

Insgesamt wurden etwa  $10^6$  Bakterien/ml nachgewiesen. Bei der Gesamtzellzahl wurde ein Mittelwert ( $n = 24$ ) von  $7,3 \times 10^5$  Bakterien/ml gemessen, bei der 16S rRNA ( $n = 31$ ) ein Mittelwert von  $1,1 \times 10^6$  Bakterien/ml. Unspezifische Markergene, mit denen alle *Bacteroides* in den Proben nachgewiesen werden, und die daher eine Gesamtmenge der fäkalen Kontamination angeben, machten einen Anteil von etwa 0,2 % der gesamten 16S rRNA aus ( $2 \times 10^3$  Genkopien/ml). Weder Fäkalmarker aus Mensch noch Wiederkäuern konnte in einer der Proben detektiert werden ( $<LOQ$ ). Lediglich in einer Probe ( $n = 31$ ) konnten Fäkalmarker aus Schweinen nachgewiesen werden. Bei dieser Probe handelte es sich um den Hauptzufluss (Wilde Weißeritz) der Klingenberg Talsperre im September 2018. Die Konzentration betrug  $4 \times 10^2$  Genkopien/ml, was einen Anteil von 0,04 % aller Bakterien ausmacht. In diesen Zuflussproben konnten ebenfalls regelmäßig Fäkalindikatorbakterien nachgewiesen werden. Außer im Zufluss zeigte sich somit keine erhöhte fäkale Belastung in den beiden Talsperren zum Zeitpunkt der hohen Konzentration coliformer Bakterien.

**Tabelle 3.5 Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtzellzahl (TCC), sowie Genkopien (GC) der 16S rRNA Gene und der Fäkalmarker Gene (in 1 ml), bei hohen und niedrigen Konzentrationen coliformer Bakterien.**

		Klingenberg (R1)		Kleine Kinzig (R2)	
		niedrig	hoch	niedrig	hoch
n		15	5	5	6
Zeitpunkt		Juni 2018	Sept 2018	Dez 2019	Juli 2019
TCC	n/ml	$7,4 \times 10^5 \pm 6,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^5$
HNA	%	37,2	31,8	15,5	12,9
16S rRNA	GC/ml	$1,3 \times 10^6 \pm 9,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$	$5,9 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$
unspezifisch	GC/ml	$1,1 \times 10^2 \pm 5,2 \times 10^1$	$2,0 \times 10^3 \pm 6,5 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$
Mensch	GC/ml	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Wiederkäuer	GC/ml	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Schwein	GC/ml	<LOQ	$4,0 \times 10^2$ *	<LOQ	<LOQ

GC = Genkopie (engl. *gene copy*), \* nur in einer Probe nachgewiesen



### 3.2.5 Mikrobielle Gemeinschaft

Um die mikrobielle Gemeinschaft zwischen den zwei Talsperren zu vergleichen, sowie die Zeitpunkte mit hoher und niedriger Konzentration an coliformen Bakterien, wurde eine 16S rRNA Gene Amplicon Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden in beiden Talsperren Wasserproben zu zwei Zeitpunkten genommen: einmal mit hoher, einmal mit niedriger Konzentration an coliformen Bakterien. Für die Talsperre Klingenberg war dies im Juni (niedrig) und im September 2018 (hoch), in der Talsperre Kleine Kinzig im Juli (hoch) und Dezember 2019 (niedrig).

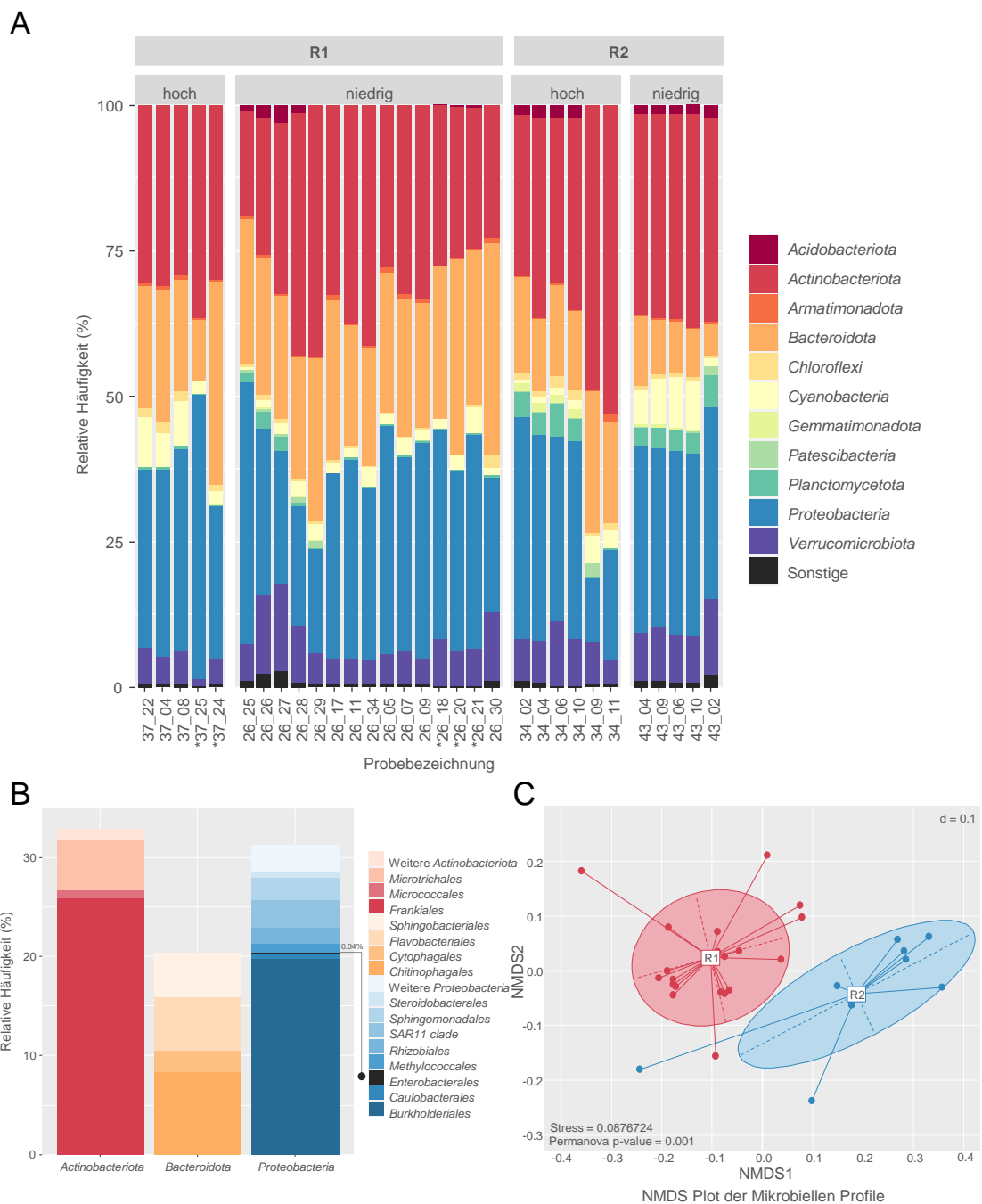
Insgesamt wurden 869.073 Sequenzen aus 31 Wasserproben sequenziert (demultiplexing). Nachdem die Qualität und mögliche Chimäre überprüft wurden, konnten 504.886 Sequenzen weiter untersucht werden. Insgesamt wurden 362 OTUs in den Wasserproben nachgewiesen. Die Alpha-Diversität zeigte eine Artenvielfalt von  $225 \pm 6$  OTUs pro Probe (Tabelle 3.6). Nach Shannon wurden  $72 \pm 4$  sogenannte „effective OTUs“ pro Probe nachgewiesen. Die Untersuchung nach Simpson, welche mehr Gewicht auf häufige Arten legt, zeigte  $39 \pm 3$  „effective OTUs“ pro Probe. Sowohl Artenvielfalt als auch die Diversität waren in der Talsperre Kleine Kinzig etwas höher als in der Talsperre Klingenberg. Es zeigten sich zudem lediglich minimale Unterschiede in der Artenvielfalt oder Diversität der Proben mit hoher oder niedriger Konzentration coliformer Bakterien.

**Tabelle 3.6 Artenvielfalt und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft zu Zeiten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien.**

Probe	Probenahmezeitpunkt	Anzahl Proben	Artenvielfalt	Shannon		Simpson	
				Index	Effective	Index	Effective
Alle	-	31	$225 \pm 6$	$4,24 \pm 0,06$	$72 \pm 4$	$0,03 \pm 0,002$	$39 \pm 3$
R1	niedrig Juni 2018	15	$220 \pm 10$	$4,20 \pm 0,08$	$69 \pm 5$	$0,03 \pm 0,002$	$38 \pm 4$
	hoch Sept 18	5	$235 \pm 9$	$4,19 \pm 0,09$	$67 \pm 5$	$0,03 \pm 0,004$	$34 \pm 4$
R2	niedrig Dez 2019	5	$241 \pm 6$	$4,40 \pm 0,05$	$82 \pm 4$	$0,02 \pm 0,002$	$42 \pm 3$
	hoch Juli 2019	6	$218 \pm 17$	$4,23 \pm 0,22$	$76 \pm 13$	$0,03 \pm 0,010$	$45 \pm 9$

Die OTUs konnten 17 Phyla zugeordnet werden (Abbildung 3.11A). Die drei häufigsten waren *Actinobacteriota* (32,9 %), *Proteobacteria* (31,2 %) und *Bacteroidota* (20,4 %). Abbildung 3.11B gibt einen Überblick über die Ordnungen, welche diesen drei Phyla angehören. Die häufigste war *Frankiales* (*Actinobacteraeota*) mit der Familie *Sporichthyaceae* (25,9 %). Die häufigste Ordnung innerhalb der *Proteobacteria* war *Burkholderiales* mit der Familie *Comamonadaceae*. Die Ordnung, zu welcher die coliformen Bakterien gehören (*Enterobacterales*) war dagegen nicht sehr häufig mit lediglich 0,04 %. Beim Vergleich der beiden Talsperren mit dem Kruskal-Wallis Rank Sum Test konnte festgestellt werden, dass *Bacteroidota* signifikant häufiger in der Talsperre Klingenberg, als in der Talsperre Kleine Kinzig vorkam ( $p < 0,001$ ), wohingegen *Planctomycetota* in der letzteren signifikant häufiger war ( $p < 0,001$ ) (Daten nicht gezeigt).

Die zweidimensionale nichtparametrische multidimensionale Analyse (NMDS, engl. *nonparametric multidimensional scaling*) der phylogenetischen Distanz zwischen den Proben zeigte, dass Cluster anhand der jeweiligen Talsperre gebildet werden (Abbildung 3.11C). Keine signifikanten Unterschiede konnten dagegen zwischen den Zeitpunkten mit hohen oder niedrigen Zahlen coliformer Bakterien festgestellt werden.



**Abbildung 3.11 Mikrobielle Gemeinschaft in den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig.**

Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft in den Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2). Die mit \* gekennzeichneten Proben stellen Zuflüsse dar (**A**). Detaillierte Darstellung der drei am häufigsten vorkommenden Phyla *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* und *Proteobacteria* (**B**). Die *Enterobacteriales* sind mit dem schwarzen Pfeil hervorgehoben. Zweidimensionale nichtparametrische multidimensionale Analyse (NMDS) der beiden Talsperren basierend auf generalisierten UniFrac-Distanzen (**C**).

### 3.3 Identifizierung coliformer Bakterien in weiteren Talsperren

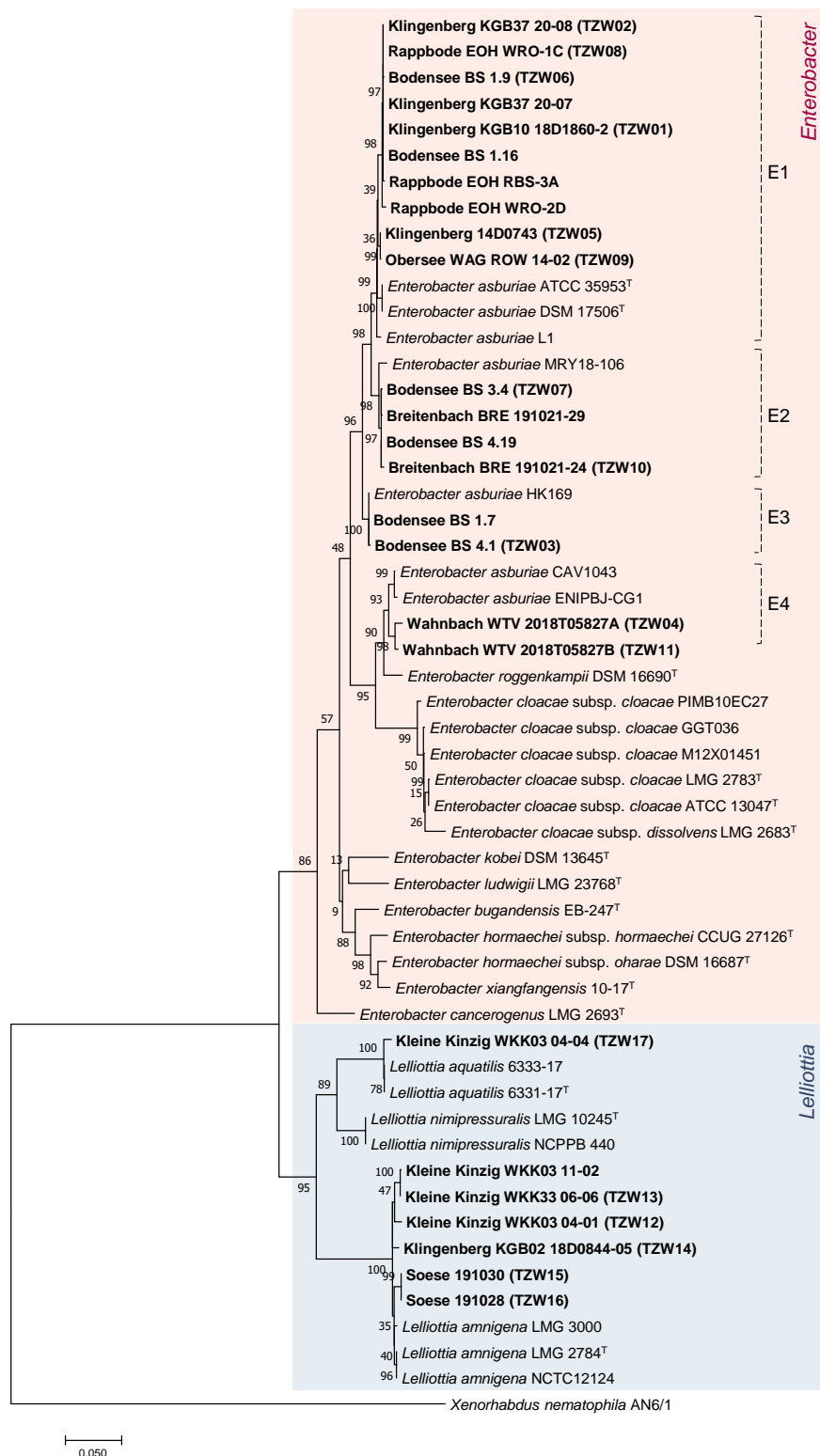
In den in Kapitel 3.2 beschriebenen Trinkwassertalsperren Klingenberg und Kleine Kinzig wurden im Sommer hohen Konzentrationen coliformer Bakterien festgestellt, als deren Ursprung die Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* identifiziert wurden. Dabei stellte sich die Frage, wie die Situation in anderen Trinkwassertalsperren und Seen aussieht, in denen ebenfalls hohe Konzentrationen coliformer Bakterien beobachtet wurden. Hierfür wurden Wasserproben und Isolate von coliformen Bakterien aus verschiedenen Seen und Talsperren in Deutschland analysiert. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.7 dargestellt, die phylogenetische Analyse der isolierten Stämme mittels MLSA ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (Reitter *et al.*, 2021b).

Es stellte sich heraus, dass *Enterobacter asburiae* in mehreren anderen Talsperren und Seen zu Zeiten mit hohen Zahlen coliformer Bakterien nachgewiesen werden konnte, wie z. B. im Bodensee, der Rappbode Talsperre (Sachsen-Anhalt), der Wahnbach Talsperre (Nordrhein-Westfalen), der Breitenbach Talsperre (Nordrhein-Westfalen) und dem Obersee (Nordrhein-Westfalen). *Lelliottia amnigena* konnte in der Talsperre Söse im Harz (Niedersachsen) nachgewiesen und identifiziert werden. Der Zeitpunkt, zu dem diese auftrat war in den Talsperren Wahnbach und Söse im Juli, in den anderen Talsperren dagegen im August oder September. Insgesamt waren sich die Stämme aus verschiedenen Quellen sehr ähnlich, lediglich einzelne Stämme stellten eine Ausnahme dar (Abbildung 3.12). So waren beispielsweise die Isolate der Wahnbach Talsperre deutlich von den anderen Isolaten zu unterscheiden, zudem zeigten auch einige Isolate aus dem Bodensee und der Breitenbach Talsperre Unterschiede.

**Tabelle 3.7 Trinkwassertalsperren und Seen, in denen ebenfalls hohe Konzentrationen coliformer Bakterien detektiert werden konnte, mit Hintergrunddaten zur Probenahme, sowie maximaler Konzentration coliformer Bakterien im Jahr der Probenahme.**

	Wahnbach	Breitenbach	Rappbode	Bodensee	Obersee (Rur)	Söse
Methode	Colilert	Colilert	Colilert	Colilert	Colilert	CCA
Konzentration (Maximum) (n/100 ml)	19863 (ROW)	7940 (ROW)	>2420 (OBW)	>200 (ROW, OBW)	-	>200 (ROW)
Datum (Maximum)	18.07.2018 (ROW)	18.09.2019 (ROW)	01./09.08.2018 (S)	27.08./16.09.2015 (ROW, OBW)	-	22.07.2019 (ROW)
Konzentration (Probenahme) (n/100 ml)	6800 (ROW)	326 (ROW)	>2420 (OBW) 1986 (ROW)	172 (ROW)	770 (ROW)	264 (ROW)
Datum (Probenahme)	19.07.2018	21.10.2019 (ROW)	09.08.2018 (OBW), 28.08.2018 (ROW)	02.11.2015 (ROW)	06.08.2018 (ROW)	30.10.2019 (ROW)
Identifizierung (Probenahme)	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>

OBW: Oberflächenwasser; ROW: Rohwasser



**Abbildung 3.12 Phylogenetische Analyse der isolierten Stämme mittels MLSA.**

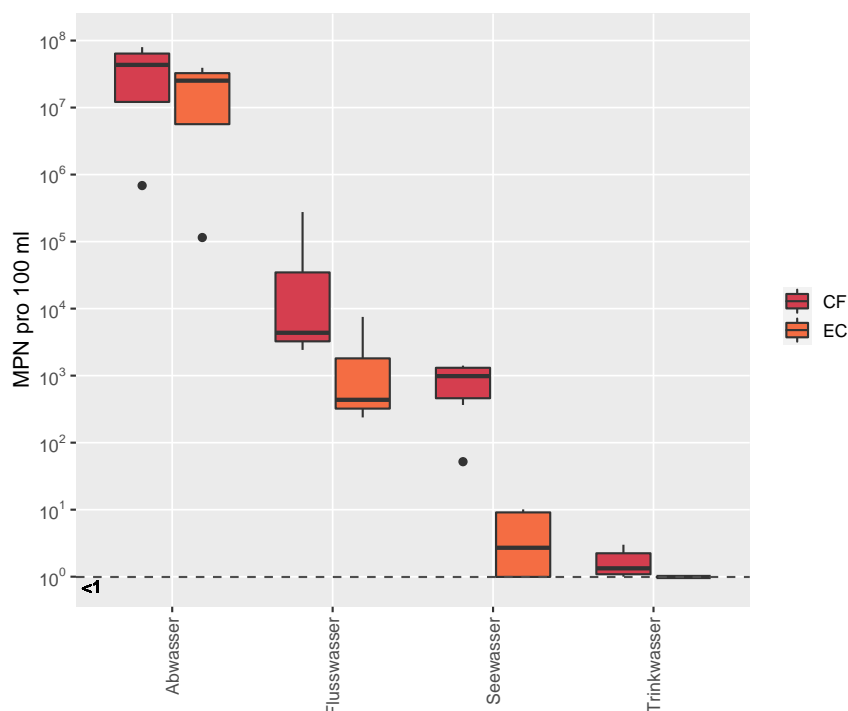
Der Stammbaum basiert auf den Genen *atpD*, *gyrB*, *infB* und *rpoB*, berechnet nach der Maximum-Likelihood-Methode mit 1000 Bootstraps. Als Outgroup wurde *Xenorhabdus nematophila* AN6/1 verwendet. Der Referenzbalken repräsentiert einen Unterschied der Sequenzen von 5 %.

### 3.4 Identifizierung coliformer Bakterien in anderen Wasserproben

Um die aus Talsperren gewonnenen Erkenntnisse mit anderen Wässern zu vergleichen, wurden zudem 18 Trinkwasser-, 6 Seewasser-, 3 Flusswasser- und 4 Abwasserproben auf coliforme Bakterien und *E. coli* untersucht. Im Anschluss wurden die coliformen Bakterien dann identifiziert. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den Trinkwasserproben zum Teil um Anreicherungsproben handelt. Zudem wurden lediglich Trinkwasserproben mit einbezogen, die einen Positivnachweis coliformer Bakterien aufwiesen, um im Anschluss die Möglichkeit zu haben, die coliformen Bakterien identifizieren zu können.

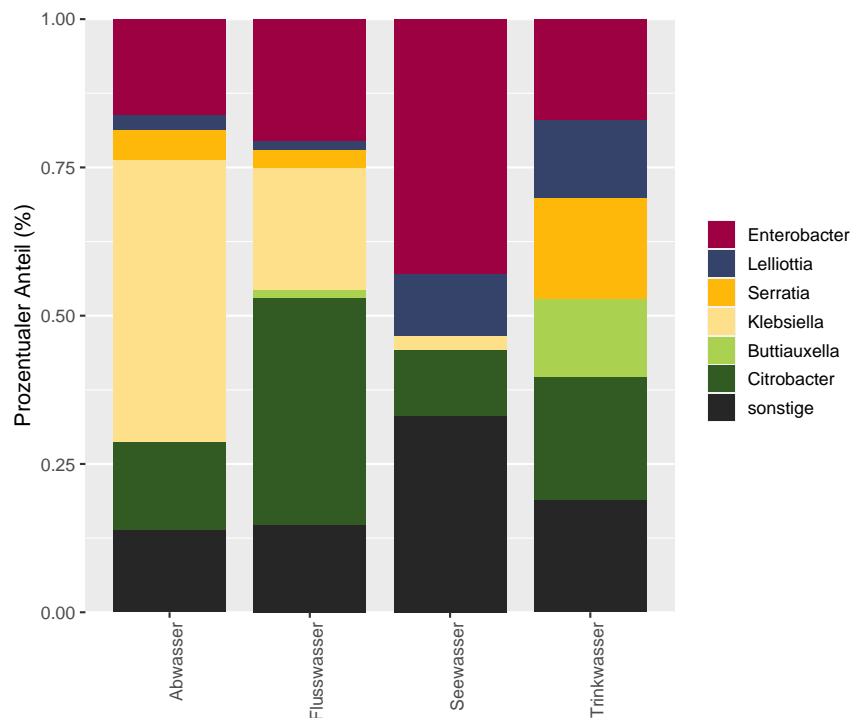
Die Ergebnisse der Quantifizierung coliformer Bakterien und *E. coli* sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Wie erwartet wurden im Abwasser die meisten coliformen Bakterien gefunden, mit einem Mittelwert von  $3,9 \times 10^7$  MPN/100 ml, gefolgt von Flusswasser ( $9,2 \times 10^4$  MPN/100 ml), Seewasser ( $9,0 \times 10^2$  MPN/100 ml) und Trinkwasser (1 MPN/100 ml). Für die Trinkwasserproben muss jedoch beachtet werden, dass lediglich Positivnachweise coliformer Bakterien, sowie Anreicherungsproben, in die Berechnung mit eingeflossen sind, um anschließend die coliformen Bakterien identifizieren zu können. In der Regel sind in Trinkwasserproben keine coliformen Bakterien nachweisbar.

Im Abwasser waren die Unterschiede zwischen den beiden Parametern coliforme Bakterien und *E. coli* nur gering ( $4,3 \times 10^7$  MPN/100 ml bzw.  $2,3 \times 10^7$  MPN/100 ml). Beim den Fluss- und Seewasserproben waren die Unterschiede dagegen deutlich höher und betragen eine bis drei  $\log_{10}$ -Stufen. Besonders die Seewasserproben waren hierbei vergleichbar mit den Proben aus den Talsperren, da auch hier nur selten *E. coli* nachgewiesen wurde.



**Abbildung 3.13** Konzentration coliformer Bakterien und *E. coli* in Abwasser, Flusswasser, Seewasser und Trinkwasser.

Bestimmung der Konzentration coliforme Bakterien (CF) und *E. coli* (EC) in weiteren Wasserproben. Die gestrichelte Linie stellt die Nachweisgrenze von  $<1$  MPN/100 ml dar.



**Abbildung 3.14 Identifizierung coliformer Bakterien in Abwasser, Flusswasser, Seewasser und Trinkwasser.**

Prozentualer Anteil der identifizierten coliformen Bakterien ohne *E. coli*. Sonstige Arten bezeichnet *Hafnia*, *Kluyvera*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Providencia* und *Raoultella*.

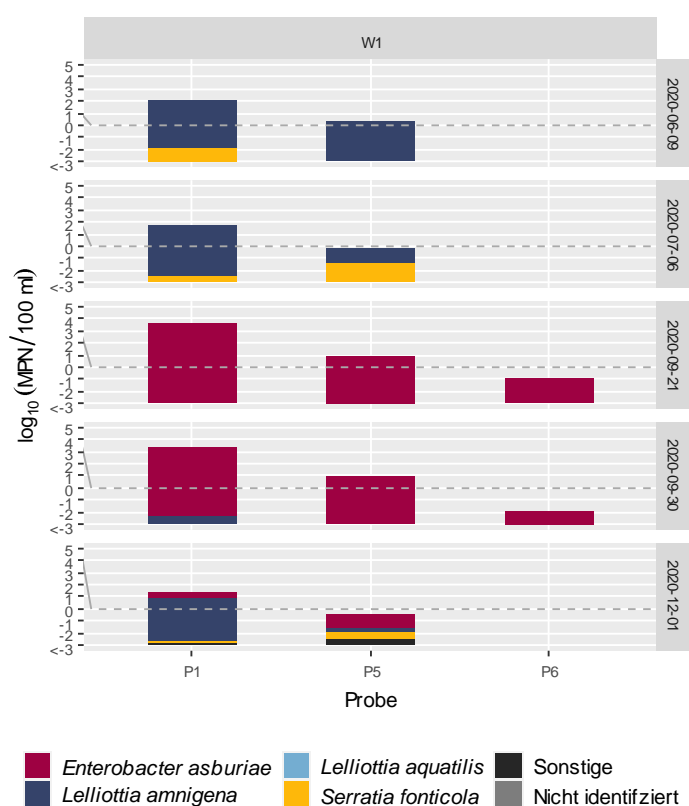
Bei der Identifizierung der coliformen Bakterien mit MALDI-TOF MS konnten ähnliche Gattungen wie in den Talsperrenproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Im Trinkwasser konnten im Vergleich zu den anderen Proben besonders häufig die Gattungen *Serratia* und *Buttiauxella* nachgewiesen werden, in den anderen Wässern spielten diese beiden Gattungen dagegen kaum eine Rolle. Das Gegenteil war für *Klebsiella* der Fall, diese Gattung dominierte im Abwasser und war zudem auch in Flusswasser häufig. Die Gattung *Lelliottia* war besonders in See- und Trinkwasser häufig. Die Gattungen *Citrobacter* und *Enterobacter* kamen in allen Wässern vor, wobei *Citrobacter* am häufigsten in Flusswasser vorkamen. Auffällig war zudem, dass die Gattung *Enterobacter* besonders häufig in Seewasser zu finden war, verglichen mit den anderen Proben und somit vergleichbar mit den Talsperrenproben. Anders als erwartet konnte kein Unterschied im Anteil der beiden Arten *Enterobacter asburiae* und *Enterobacter cloacae* in den verschiedenen Wässern festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.5 Monitoring im Wasserwerk

Die hohen Konzentrationen coliformer Bakterien, die im Rohwasser der Talsperren auftreten können, stellen für die Aufbereitung in den Talsperren-Wasserwerken eine besondere Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurde die Aufbereitungsleistung verschiedener Wasserwerke bestimmt, indem die Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser (P1), nach bestimmten Aufbereitungsschritten (P2–P5) bis hin zum Reinwasser nach der Abschlussdesinfektion (P6) untersucht wurde. Um die Nachweisbarkeit zu erhöhen, wurden Anreicherungen durchgeführt, bei welchen 100 Liter Wasser untersucht wurden. Lediglich in Wasserwerk 4 konnten keine Anreicherungen durchgeführt werden, weswegen stattdessen 10 Liter Wasser mittels Membranfiltration untersucht wurden. Im Anschluss an einen Nachweis wurden die Arten coliformer Bakterien mit dem MALDI-TOF MS identifiziert.

#### 3.5.1 Wasserwerk 1 (W1)

In Wasserwerk 1 (W1) erfolgt die Aufbereitung über eine einstufige Flockungsfiltration mit Aluminiumsalzen als Flockungsmittel, gefolgt von einer Abschlussdesinfektion mit  $\text{Cl}_2/\text{ClO}_2$ . Das Wasserwerk verfügt zudem über einen Ozonbehälter, welcher jedoch zum Zeitpunkt der Probenahme außer Betrieb war. Beprobte wurden das Rohwasser (P1), das Reinwasser vor (P5), sowie nach der Desinfektion (P6) zu fünf Probenahmezeitpunkten. Bei zwei Probenahmeterminen lagen hohe Konzentrationen coliformer Bakterien im Rohwasser vor. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 und Tabelle 3.8 dargestellt.



**Abbildung 3.15 Monitoring coliformer Bakterien in W1.**

Die Konzentration der coliformen Bakterien wurde zu fünf Zeitpunkten bestimmt, sowie die Arten identifiziert. Folgende Proben wurden untersucht: Rohwasser (P1), Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6). Die gestrichelte Linie beschreibt die Nachweisgrenze bei einer Standarduntersuchung von 100 ml Wasserprobe.

Insgesamt konnten drei Zeitpunkte mit niedrigen Konzentrationen, sowie zwei Zeitpunkte mit hohen Konzentrationen coliformer Bakterien untersucht werden. Dies spiegelt sich zum einen an der Konzentration an coliformen Bakterien im Rohwasser wider, sowie an der Identifikation der Bakterien mittels MALDI-TOF MS. Im Juni und Juli waren die Zahlen noch relativ niedrig, die dominanten Arten waren *Lelliottia amnigena*, sowie *Serratia fonticola*. Ab September stiegen die Werte im Rohwasser stark an und *Enterobacter asburiae* dominierte. Im Dezember waren die Werte wieder am Abklingen, ebenso wie das Auftreten von *Enterobacter*. Bei allen Untersuchungen konnten die Arten, welche im Rohwasser gefunden wurden, auch im Reinwasser nachgewiesen werden. Sobald sich die Artzusammensetzung im Rohwasser änderte, änderte sich auch die des Reinwassers.

Bei allen Untersuchungen waren im Reinwasser vor der Desinfektion (P5) noch coliforme Bakterien nachweisbar. Die Höhe des Nachweises war abhängig von der Ausgangskonzentration. Die Eliminationsleistung der Flockungsfiltration betrug unabhängig von der Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser 97,8–99,7 %, was etwa 1,5–2,5  $\log_{10}$ -Stufen entspricht. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Desinfektion zum Zeitpunkt der hohen Konzentration unvollständig war, da hier auch nach der Desinfektion noch coliforme Bakterien nachgewiesen werden konnten. Die Eliminationsleistung der Desinfektion betrug 2–4  $\log_{10}$ -Stufen. Insgesamt konnten in diesem Wasserwerk 5  $\log_{10}$ -Stufen eliminiert werden.

**Tabelle 3.8 Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W1.**

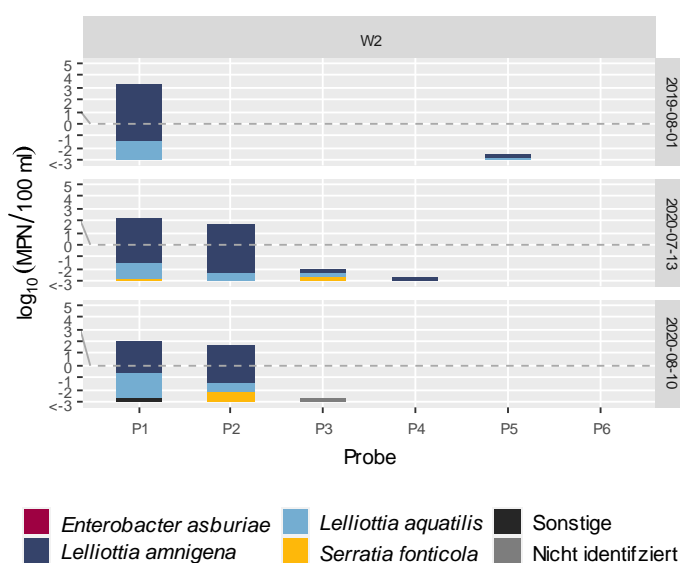
Datum	Rohwasser (n/100 ml)	Reinwasser vor Desinfektion (n/100 ml)	Reinwasser nach Desinfektion (n/100 ml)	Elimination vor Desinfektion (%)
09.06.2020	108	2,340	<0,0005	97,83
06.07.2020	43,5	0,791	<0,0005	98,18
21.09.2020	3441	9,580	0,116	99,72
30.09.2020	>2420*	8,110	0,013	99,66*
01.12.2020	25,9	0,326	<0,0005	98,74

\* Für die Berechnung der Eliminationsleistung, sowie für die grafische Darstellung wurden 2420 coliforme Bakterien pro 100 ml verwendet.



### 3.5.2 Wasserwerk 2 (W2)

Im Wasserwerk 2 erfolgt zunächst eine Vorreinigung des Rohwassers über einen Kohle-Sand-Filter, gefolgt von einem Ozonungsschritt und einer Flockung mit dem Flockungsmittel Aluminiumchlorid. Im Anschluss an die Flockung befinden sich zwei Mehrschicht-Filter (Filterstufe I, Filterstufe II). Zur Abschlussdesinfektion wird Chlor verwendet. Im Wasserwerk 2 konnten zu drei Zeitpunkten das Rohwassers (P1), sowie das Reinwassers vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6) untersucht werden. Zusätzlich konnten zu zwei Zeitpunkten auch das Wasser nach der Vorreinigung (P2), der Ozonung (P3), sowie der Filterstufe I (P4) beprobt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16, sowie Tabelle 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.16 Monitoring coliformer Bakterien in W2.**

Die Konzentration der coliformen Bakterien wurde zu drei Zeitpunkten bestimmt, sowie die Arten identifiziert. Folgende Proben wurden untersucht: Rohwasser (P1), Vorreinigung (P2), Ozonung (P3), Filterstufe I (P4), Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6). Die gestrichelte Linie beschreibt die Nachweisgrenze bei einer Standarduntersuchung von 100 ml Wasserprobe.

Die erste Untersuchung im August 2019 fand statt, während hohe Konzentrationen coliformer Bakterien detektiert wurden, sodass Werte von  $>10^3$  MPN/100 ml gemessen wurden, während die Werte der beiden späteren Zeitpunkte etwa eine  $\log_{10}$ -Stufe niedriger waren. Dominant waren die beiden Arten *Lelliottia amnigena*, sowie *Lelliottia aquatilis*. Zu keinem der Zeitpunkte wurden im Reinwasser nach der Desinfektion (P6) noch coliforme Bakterien nachgewiesen, die Eliminationsleistung betrug  $>99,99$  %. Lediglich bei der Untersuchung im Jahr 2019 waren noch coliforme Bakterien vor der Abschlussdesinfektion (P5) nachweisbar. Es zeigte sich, dass durch die Ozonung (P3) etwa 3–4  $\log_{10}$ -Stufen eliminiert werden, in der anschließenden Flockungfiltration (P4) wird eine weitere Reduktion um 1–2  $\log_{10}$ -Stufen erreicht. Insgesamt wurden also etwa 5–6  $\log_{10}$ -Stufen eliminiert. Wie auch bei Wasserwerk 1 wurden im Reinwasser die gleichen Arten gefunden, die auch im Rohwasser dominierten. Es zeigte sich keine Änderung der Artenzusammensetzung über die Aufbereitung.

**Tabelle 3.9** Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W2.

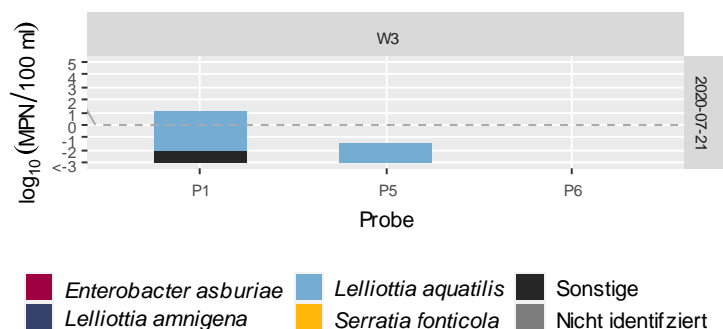
Datum	Rohwasser (n/100 ml)	Reinwasser vor Desinfektion (n/100 ml)	Reinwasser nach Desinfektion (n/100 ml)	Elimination vor Desinfektion (%)
01.08.2019	1504,6	0,0030	<0,0023	>99,99
13.07.2020	137,4	<0,0025*	<0,0027	>99,99
10.08.2020	98,8	<0,0022*	<0,0018	>99,99

\* Für die Berechnung der Eliminationsleistung wurden 0,0025 bzw. 0,0022 coliforme Bakterien pro 100 ml verwendet.

### 3.5.3 Wasserwerk 3 (W3)

Die Aufbereitung im Wasserwerk 3 umfasst eine einstufige Flockungsfiltration und eine Abschlussdesinfektion mit  $\text{ClO}_2$ . Das Wasserwerk 3 wurde nur zu einem Zeitpunkt beprobt, da es im Untersuchungszeitraum nicht zu einem Anstieg der Konzentration coliformer Bakterien kam. Es konnte sowohl das Rohwasser (P1), das Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6) untersucht werden. Die Ergebnisse der Beprobung sind in Abbildung 3.17 und Tabelle 3.10 dargestellt.

Die Konzentration coliformer Bakterien war zum Zeitpunkt der Probenahme sehr gering, die dominante Art war *Lelliottia aquatilis*. Diese konnte auch nach der Aufbereitung im Wasserwerk noch nachgewiesen werden. Die Eliminationsleistung betrug 99,7 %, also als 2,5  $\log_{10}$ -Stufen. Nach Desinfektion (P6) konnten keine coliformen Bakterien mehr nachgewiesen werden. Inwieweit dies auch im Falle erhöhter Konzentrationen coliformer Bakterien im Rohwasser der Fall ist konnte für das Wasserwerk 3 nicht geprüft werden.

**Abbildung 3.17** Monitoring coliformer Bakterien in W3.

Die Konzentration der coliformen Bakterien wurde zu einem Zeitpunkt bestimmt, sowie die Arten identifiziert. Folgende Proben wurden untersucht: Rohwasser (P1), Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6). Die gestrichelte Linie beschreibt die Nachweisgrenze bei einer Standarduntersuchung von 100 ml Wasserprobe.

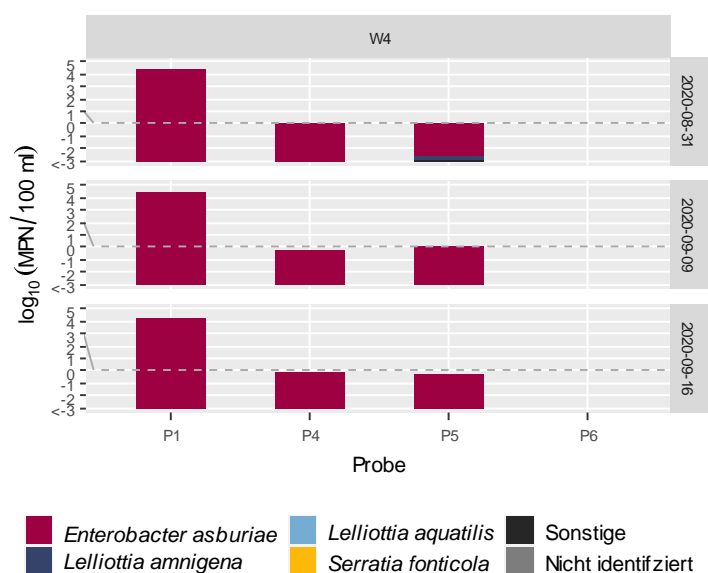
**Tabelle 3.10** Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W3.

Datum	Rohwasser (n/100 ml)	Reinwasser vor Desinfektion (n/100 ml)	Reinwasser nach Desinfektion (n/100 ml)	Elimination vor Desinfektion (%)
01.08.2019	12,2	0,036	<0,0011	99,70

### 3.5.4 Wasserwerk 4 (W4)

Die Aufbereitung des Wasserwerk 4 umfasst eine zweistufige Schnellfiltrationsanlage mit geschlossenen Filtern. Als Flockungsmittel wird Aluminiumsulfat vor der Filterstufe 1 dosiert. Die Abschlussdesinfektion erfolgt mit Chlordioxid. Bei dem Wasserwerk 4 konnten das Rohwasser (P1), sowie das Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6) untersucht werden. Zusätzlich wurde der Ablauf der Filterstufe I (P4) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 und Tabelle 3.11 dargestellt.

Die Probenahme erfolgte in allen drei Fällen zum Zeitpunkt der erhöhten Konzentration coliformer Bakterien. Im Vergleich zu den anderen Talsperren wurden hier deutlich höhere Werte an coliformen Bakterien im Rohwasser erzielt ( $>10^4$  MPN/100 ml). Die dominante Art war *Enterobacter asburiae*, welche sowohl im Rohwasser, als auch im Reinwasser vorherrschte. Nach der ersten Filterstufe, sowie vor der Abschlussdesinfektion konnten zwar noch coliforme Bakterien nachgewiesen, allerdings war die Eliminationsrate mit 4,5  $\log_{10}$ -Stufen ( $>99,99\%$ ) deutlich höher als in den anderen Wasserwerken mit konventioneller Aufbereitung. Nach der Abschlussdesinfektion waren keine coliforme Bakterien mehr nachweisbar.



**Abbildung 3.18 Monitoring coliformer Bakterien in W4.**

Die Konzentration der coliformen Bakterien wurde zu drei Zeitpunkten bestimmt, sowie die Arten identifiziert. Folgende Proben wurden untersucht: Rohwasser (P1), Ablauf Filterstufe I (P4), Reinwasser vor (P5) und nach der Abschlussdesinfektion (P6). Die gestrichelte Linie beschreibt die Nachweisgrenze bei einer Standarduntersuchung von 100 ml Wasserprobe.

**Tabelle 3.11 Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser, Reinwasser vor und nach der Desinfektion, sowie Eliminationsleistung des W4.**

Datum	Rohwasser (n/100 ml)	Reinwasser vor Desinfektion (n/100 ml)	Reinwasser nach Desinfektion (n/100 ml)	Elimination vor Desinfektion (%)
31.08.2020	28800	1	<0,11*	>99,99
09.09.2020	24600	1	<0,10*	>99,99
16.09.2020	15960	0,54	<0,10*	>99,99

\* Für die Berechnung der Eliminationsleistung wurden 0,11 bzw. 0,10 coliforme Bakterien pro 100 ml verwendet.

### 3.5.5 Zusammenfassung Untersuchungen Wasserwerke

Die hohen Konzentrationen coliformer Bakterien, die im Rohwasser der Talsperren auftreten, stellen die Trinkwasseraufbereitung vor eine besondere Herausforderung. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen im Wasserwerk durchgeführt, um zu testen, inwieweit die Aufbereitung auch hohen Konzentrationen coliformer Bakterien gewachsen ist. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Höhe eines Nachweises coliformer Bakterien im Reinwasser abhängig von der Ausgangskonzentration war, während die Eliminationsleistung für die Trinkwasseraufbereitung davon unabhängig war. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Artenzusammensetzung über die Aufbereitung nicht änderte.

In Wasserwerken mit konventioneller Aufbereitung, also einer Flockungsfiltration, betrug die Eliminationsleistung der coliformen Bakterien 1,5–4,5  $\log_{10}$ -Stufen. In Wasserwerk 2, in dem der Flockungsfiltration eine Ozonung vorgeschaltet ist, wurde eine deutlich höhere Eliminationsrate erreicht, nämlich 3–4  $\log_{10}$ -Stufen durch die Ozonung, sowie weitere 1–2  $\log_{10}$ -Stufen durch die anschließende Flockungsfiltration, und somit insgesamt 5–6  $\log_{10}$ -Stufen.

In allen untersuchten Wasserwerken konnten bei mindestens einer Beprobung noch coliforme Bakterien im Reinwasser vor der Abschlussdesinfektion (P5) in angereicherten Proben nachgewiesen werden. Die Werte lagen dabei zeitweise über dem Grenzwert der TrinkwV (1 MPN/100 ml). Diese Grenzwertüberschreitungen traten in Wasserwerken mit konventioneller Aufbereitung zu Zeiten hoher Konzentrationen coliformer Bakterien im Rohwasser auf.

Durch die anschließende Desinfektion wird eine weitere Reduktion der coliformen Bakterien erreicht. Wie im Falle der untersuchten Wasserwerke gezeigt, konnten in der Regel nach der Abschlussdesinfektion keine coliformen Bakterien mehr nachgewiesen werden. Lediglich in einem Wasserwerk mit konventioneller Aufbereitung (WW1) konnten zum Zeitpunkt der erhöhten Konzentration coliformer Bakterien auch nach der Abschlussdesinfektion (P6) noch coliforme Bakterien in angereicherten Proben nachgewiesen werden. Die Konzentration lag allerdings unter dem Grenzwert der TrinkwV (<1 MPN/100 ml).

## 3.6 Statistische Datenanalyse zur Ursachenuntersuchung

Um festzustellen, welche Faktoren für die Vermehrung coliformer Bakterien relevant sind und warum es überhaupt zu einer solchen kommt, wurde eine statistische Datenanalyse mit Daten aus fünf Talsperren durchgeführt. Hierfür wurden mikrobiologische, physikochemische und meteorologische Daten von 2018 bis 2020, die von den Wasserversorgern während ihrer Routineuntersuchung gemessen wurden, analysiert und mit dem Auftreten der coliformen Bakterien korreliert, um mögliche Zusammenhänge zu untersuchen.

Die Talsperren, deren Daten im Rahmen der Datenanalyse verwendet wurden, waren die bereits in Kapitel 3.2 untersuchten Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2), sowie drei weiteren Talsperren, nämlich die Wahnbach Talsperre (R3, Siegburg-Seligenthal, Nordrhein-Westfalen), Breitenbach Talsperre (R4, Rothaargebirge, Nordrhein-Westfalen), sowie die Rappbode Talsperre (R5, Harz, Sachsen-Anhalt). Die Lage der Talsperren kann Abbildung 2.1 entnommen werden, weitere Informationen über die fünf Talsperren wurden in Tabelle 2.13 zusammengestellt.

Da von den Talsperren Rappbode, Wahnbach und Breitenbach fast ausschließlich mikrobiologischen Daten des Rohwassers vorlagen, wurden diese mit den physikochemischen Daten des Rohwasserentnahmehorizontes verglichen und für die Korrelationsanalyse verwendet. Darüber hinaus wurde mit den Daten aus den Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig eine Redundanzanalyse durchgeführt. Hier wurden zusätzlich die Daten des Oberflächenwassers untersucht und zudem nicht nur die coliformen Bakterien im Allgemeinen, sondern die sich vermehrende Art im Speziellen analysiert.

### 3.6.1 Mikrobiologische Daten

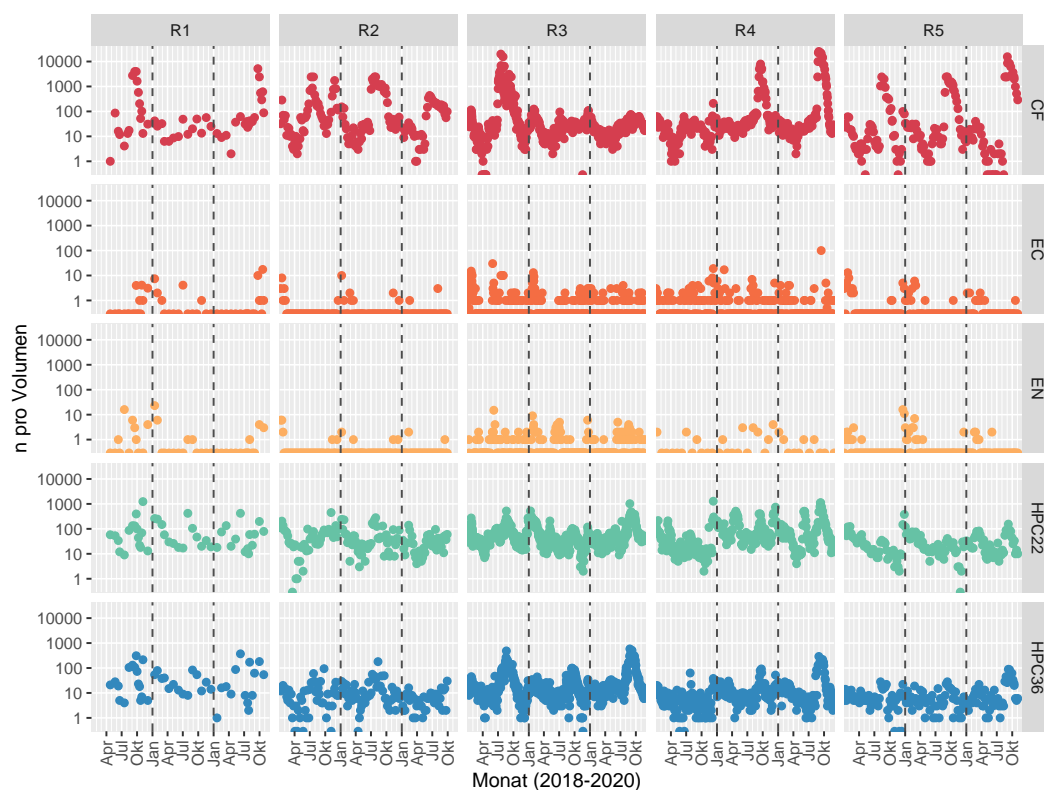
In allen fünf Talsperren wurden die Parameter coliforme Bakterien (CF), *E. coli* (EC), Enterokokken (EN), Koloniezahl bei 22 °C (HPC22), sowie Koloniezahl bei 36 °C (HPC36) untersucht. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen im Rohwasser der fünf Talsperren sind in Abbildung 3.19 dargestellt, sowie in Tabelle A 2 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Talsperren Klingenberg sowie Kleine Kinzig aus dem Monitoringzeitraum (2018–2019) wurden bereits in Kapitel 3.2.1 genauer beschrieben.

Im Untersuchungszeitraum konnten in allen fünf Talsperren hohe Konzentrationen coliformer Bakterien festgestellt werden. Die Konzentration nahm sprunghaft zu und hielt sich dann meist über mehrere Wochen auf hohem Niveau. In den Talsperren Kleine Kinzig (R2) und Rappbode (R5) traten in allen drei untersuchten Jahren hohe Konzentrationen coliformer Bakterien auf. In der Talsperre Kleine Kinzig wurde das Maximum im Juli 2018 und 2019 erreicht ( $1,7 \times 10^3$  MPN/100 ml), wie in Kapitel 3.2.1 bereits ausführlich beschrieben wurde. In der Rappbode Talsperre wurde das Maximum im September 2020 erreicht ( $1,6 \times 10^4$  MPN/100 ml), wobei hohe Konzentrationen in allen drei Jahren zwischen August und Oktober erreicht wurden. In der Talsperre Klingenberg (R1) war die Konzentration coliformer Bakterien lediglich in zwei Jahren (2018, 2020) erhöht, ebenso in der Breitenbach Talsperre (R4; 2019, 2020). Dieses Phänomen wurde in der Breitenbach Talsperre zuvor noch nie beobachtet. Das Maximum wurde in der Breitenbach Talsperre Ende August 2020 erreicht ( $2,5 \times 10^4$  MPN/100 ml), wobei hohe Werte in beiden Jahren im August und September erreicht wurden. In der Talsperre Klingenberg wurden am 21.09.2020 die höchsten Werte gemessen ( $5,2 \times 10^3$  MPN/100 ml), sogar höher als die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Werte aus 2018. In der Wahnbach

Talsperre wurden lediglich 2018 hohe Konzentrationen coliformer Bakterien beobachtet. Das Maximum wurde im Juli erreicht ( $2,0 \times 10^4$  MPN/100 ml), wobei die Zahlen bis in den August hinein auf einem hohen Niveau blieben.

Insgesamt wurden also in allen fünf Talsperren hohe Werte ( $>10^3$  MPN/100 ml) coliformer Bakterien detektiert. Diese traten im Sommer auf, wobei sich die einzelnen Talsperren unterschieden. In der Talsperre Kleine Kinzig waren die Werte vor allem im Frühsommer (Juni/Juli) erhöht, die Wahnbach Talsperre erreichte ihre maximale Konzentration im Juli. In den anderen drei Talsperren kam es dagegen erst im Spätsommer (August bis Oktober) zu erhöhten Werten. Interessanterweise ist die Talsperre Kleine Kinzig auch die einzige der fünf Talsperren, in welcher *Lelliottia* spp. dominiert, während in den anderen vier Talsperren *Enterobacter asburiae* dominiert (Kapitel 3.3). Von den isolierten *Enterobacter asburiae*-Stämmen unterschied sich zudem der aus der Wahnbach Talsperre isolierte Stamm deutlich von den anderen Stämmen (Kapitel 3.3). Der Zeitpunkt der Konzentrationserhöhung scheint daher abhängig von dem sich vermehrenden Stamm zu sein.

Um Unterschiede zwischen den Zeitpunkten mit hohen und niedrigen Werten an coliformen Bakterien vergleichen zu können, wurde eine Konzentration von 200 MPN/100 ml an coliformen Bakterien als Wert angenommen und die Parameter zu Zeitpunkten über und unter diesem Wert mit dem Mann-WhitneyU Test verglichen. Die Werte für *E. coli* und Enterokokken lagen in allen fünf Talsperren auf einem sehr niedrigen Niveau, und betragen im Durchschnitt zwischen 0 und 3 Bakterien/100 ml (Tabelle 3.12). Für die Parameter *E. coli* und Enterokokken konnten nur geringe oder keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten festgestellt werden (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.19 Mikrobiologischer Parameter im Rohwasser der fünf Talsperren.**

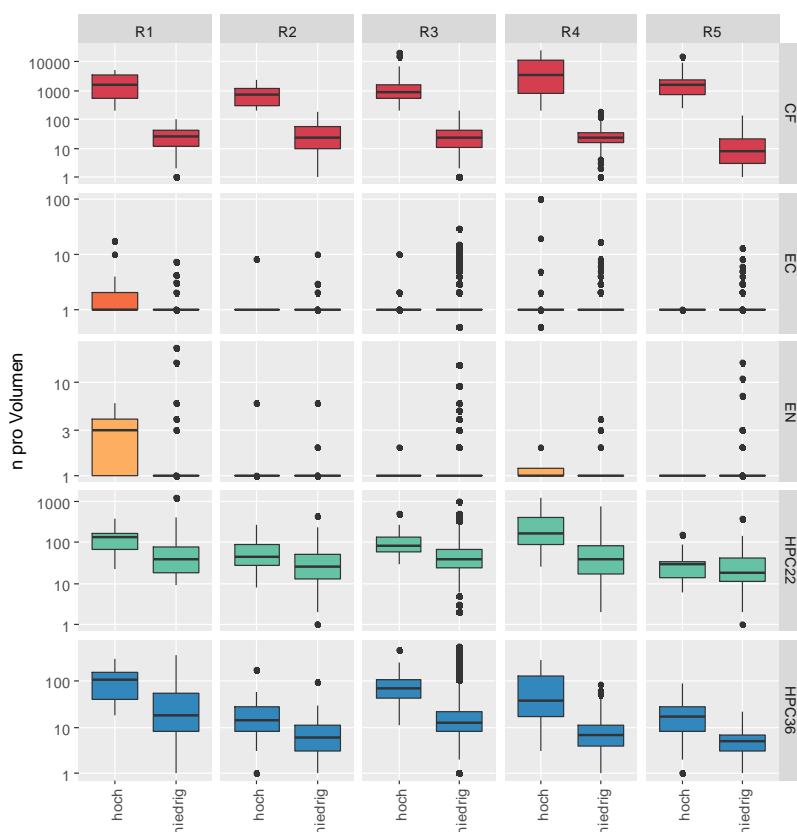
Für die Parameter coliforme Bakterien (CF), *E. coli* (EC) und Enterokokken (EN) wurde jeweils 100 ml untersucht, für die Koloniezahl bei 22 und 36 °C (HPC22, HPC36) betrug das Untersuchungsvolumen 1 ml. Untersucht wurden die Talsperren Klingenberg (R1), Kleine Kinzig (R2), Wahnbach (R3), Breitenbach (R4) und Rappbode (R5). Untersucht wurden die Jahre 2018–2020.

Dagegen konnten bei den Koloniezahlen deutliche Unterschiede festgestellt werden. Waren viele coliforme Bakterien vorhanden, war auch die Koloniezahl hoch und umgekehrt. In allen fünf Talsperren konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) für die Koloniezahl bei 36 °C festgestellt werden, sowie in drei der Talsperren für die Koloniezahl bei 22 °C ( $p < 0,001$ ). Die Koloniezahl war somit ebenfalls erhöht, zu Zeitpunkten mit einer erhöhten Konzentration an coliformen Bakterien.

**Tabelle 3.12 Mittelwerte der mikrobiologischen Parameter der Jahre 2018–2020, bei hohen Werten coliformer Bakterien ( $\leq 200$  MPN/100 ml) und niedrigen Werten, sowie Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-WhitneyU Test.**

Parameter	Einheit	R1		R2		R3		R4		R5	
		hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig
CF	n/100 ml	2015	30	885	43	1618	31	7455	29	2592	16
EC	n/100 ml	3	1	0	0	1	1	3	1	0	1
EN	n/100 ml	3	2	0	0	0	1	1	1	0	1
HPC22	n/1 ml	146	108	72	44	106	66	307	76	35	33
HPC36	n/1 ml	120	46	24	8	87	30	77	9	23	6
CF		***		***		***		***		***	
EC		*		NS		**		NS		*	
EN		*		NS		NS		NS		**	
HPC22		NS		***		***		***		NS	
HPC36		*		***		***		***		***	

Die statistische Signifikanz wurde dargestellt mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ). NS bedeutet keine Signifikanz.



**Abbildung 3.20 Unterschiede der mikrobiologischen Parameter zu Zeitpunkten hoher und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien der Jahre 2018–2020.**

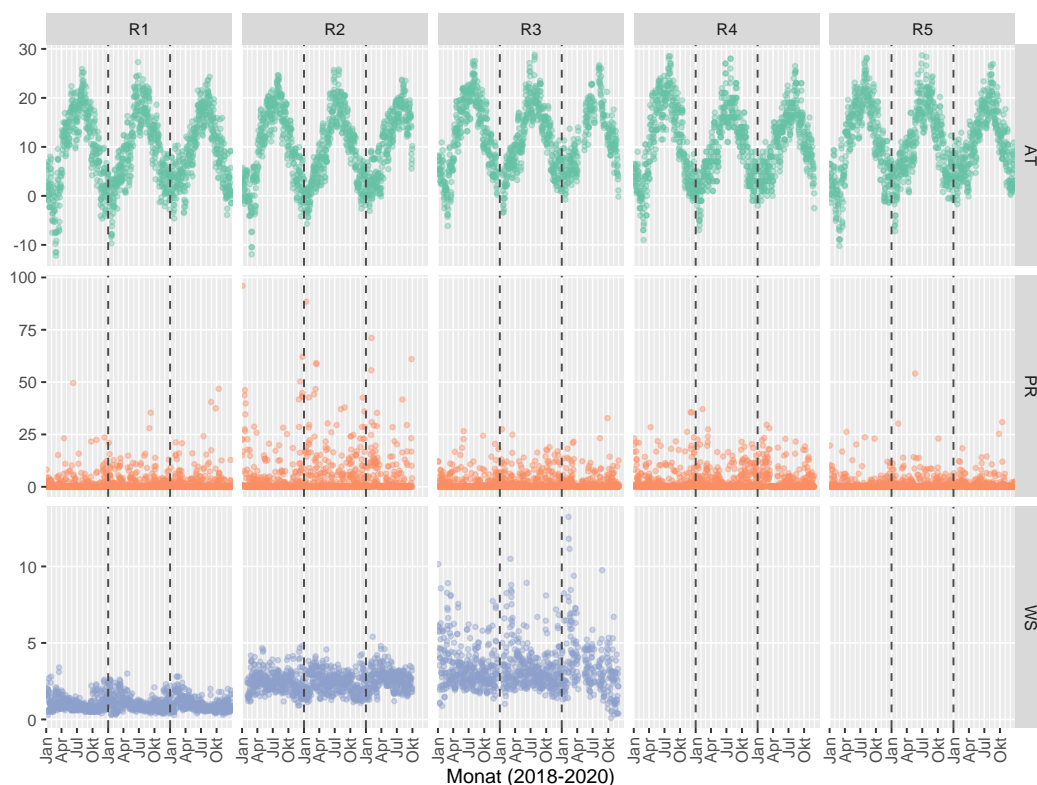
Dargestellt sind Unterschiede der mikrobiologischen Parameter zu Zeitpunkten hoher ( $\leq 200$  MPN/100 ml) und niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien. Für die Parameter coliforme Bakterien (CF), *E. coli* (EC) und Enterokokken (EN) wurde jeweils 100 ml untersucht, für die Koloniezahl bei 22 und 36 °C (HPC22, HPC36) betrug das Untersuchungsvolumen 1 ml. Zur grafischen Darstellung der Werte unter dem Detektionslimit ( $< 1$ ) wurden diese als 0,99 angegeben. Untersucht wurden die Talsperren Klingenberg (R1), Kleine Kinzig (R2), Wahnbach (R3), Breitenbach (R4) und Rappbode (R5).

### 3.6.2 Meteorologische Daten

Zusätzlich zu den mikrobiologischen Daten wurden auch die meteorologischen Parameter Lufttemperatur (AT), Niederschlag (PR) und Windgeschwindigkeit (WT) erfasst. Die Ergebnisse der meteorologischen Untersuchungen an den fünf Talsperren sind in Abbildung 3.21, sowie in Tabelle A 3 zusammengefasst. Das erste Jahr der Studie war geprägt von starken Regenfällen im ersten Quartal des Jahres, gefolgt von einem trockenen und heißen Sommer. Es war das wärmste Jahr in Deutschland seit Beginn der Wetteraufzeichnungen im Jahr 1881 mit einer Durchschnittstemperatur von 10,5 °C und eines der niederschlagsärmsten Jahre (DWD, 2018). Auch die beiden darauffolgenden Jahre gehörten zu den heißesten Jahren in Deutschland. Das zweite Jahr, 2019, hatte eine Jahresmitteltemperatur von 10,3 °C (DWD, 2019), während 2020 mit 10,4 °C das zweitwärmste Jahr in Deutschland war (DWD, 2020). Beide Jahre waren zudem erneut sehr trocken.

Die Lufttemperatur betrug in den fünf Talsperren im Durchschnitt zwischen 9,1 und 12,1 °C (Tabelle A 3). Die beiden Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig, sowie Breitenbach und Rappbode waren untereinander vergleichbar, während die Wahnbach Talsperre im Durchschnitt eine höhere Lufttemperatur hatte. In der Wahnbach Talsperre wurde im Jahr 2018 eine höhere Lufttemperatur gemessen werden, als in den anderen beiden Jahren, in der es zu keiner Erhöhung der Konzentration coliformer Bakterien kam. Zudem war die gemessene Jahresdurchschnittstemperatur in der Talsperre Kleine Kinzig in allen drei Jahren deutlich über dem langjährigen Mittel von 6,6 °C (ZVWKK, 2018; ZVWKK, 2019).

Der Jahresgesamt-Niederschlag unterschied sich dagegen deutlich zwischen den fünf Talsperren (Tabelle A 3). In der Kleinen Kinzig Talsperre fiel die meiste Regenmenge, gefolgt



**Abbildung 3.21 Ergebnisse der meteorologischen Messungen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse der meteorologischen Parameter Lufttemperatur (AT, °C), Niederschlag (PR, l/m³) und Windgeschwindigkeit (WS, m/s) der Jahre 2018–2020. Untersucht wurden die Talsperren Klingenberg (R1), Kleine Kinzig (R2), Wahnbach (R3), Breitenbach (R4) und Rappbode (R5).



von der Breitenbach Talsperre, Wahnbach Talsperre, Klingenberg Talsperre und der Rappbode Talsperre, in welcher am wenigsten Niederschlag gemessen wurde. In allen fünf Talsperren wurde 2019 deutlich mehr Niederschlag gemessen als 2018. 2020 fiel in den meisten Talsperren wieder weniger Niederschlag als 2019, lediglich in der Klingenberg Talsperre wurde mehr Niederschlag gemessen. Für die Breitenbach Talsperre lag die Niederschlagsmenge in den Jahren 2018 und 2020 deutlich unter dem langjährigen Mittel von 1.114 l/m<sup>2</sup>. Auch in der Talsperre Kleine Kinzig konnte dieser Effekt bemerkt werden, auch hier war die Niederschlagsmenge geringer als in den Vorjahren (Mittel: 1.681 l/m<sup>2</sup>), 2018 sogar um 14 % (ZVWKK, 2018; ZVWKK, 2019).

Die Windgeschwindigkeit wurde lediglich an drei der fünf Talsperren gemessen und war sehr unterschiedlich (Tabelle A 3). Sie war in der Wahnbach Talsperre am höchsten, gefolgt von der Kleinen Kinzig und Klingenberg. Zwischen den drei untersuchten Jahren konnten kaum Unterschiede festgestellt werden.

Es wird vermutet, dass hohe Konzentrationen coliformer Bakterien besonders in warmen Jahren mit wenig Niederschlag auftreten. Darauf deuten auch die Ergebnisse der Redundanzanalyse hin (Kapitel 3.6.5). Von einem Zusammenhang mit der Windgeschwindigkeit wird nicht ausgegangen.

### 3.6.3 Physikochemische Daten

Über den Zeitraum von 2018 bis 2020 wurden in den fünf Talsperren nicht nur die mikrobiologischen Parameter, sondern auch physikalisch-chemische Parameter gemessen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle A 4 aufgeführt, in dieser Tabelle werden zudem die Abkürzungen und Einheiten der Parameter aufgelistet. Auf einige der Parameter soll im Folgenden genauer eingegangen werden, weitere Parameter sind zudem im Anhang in den Abbildung A 1 bis Abbildung A 5 dargestellt.

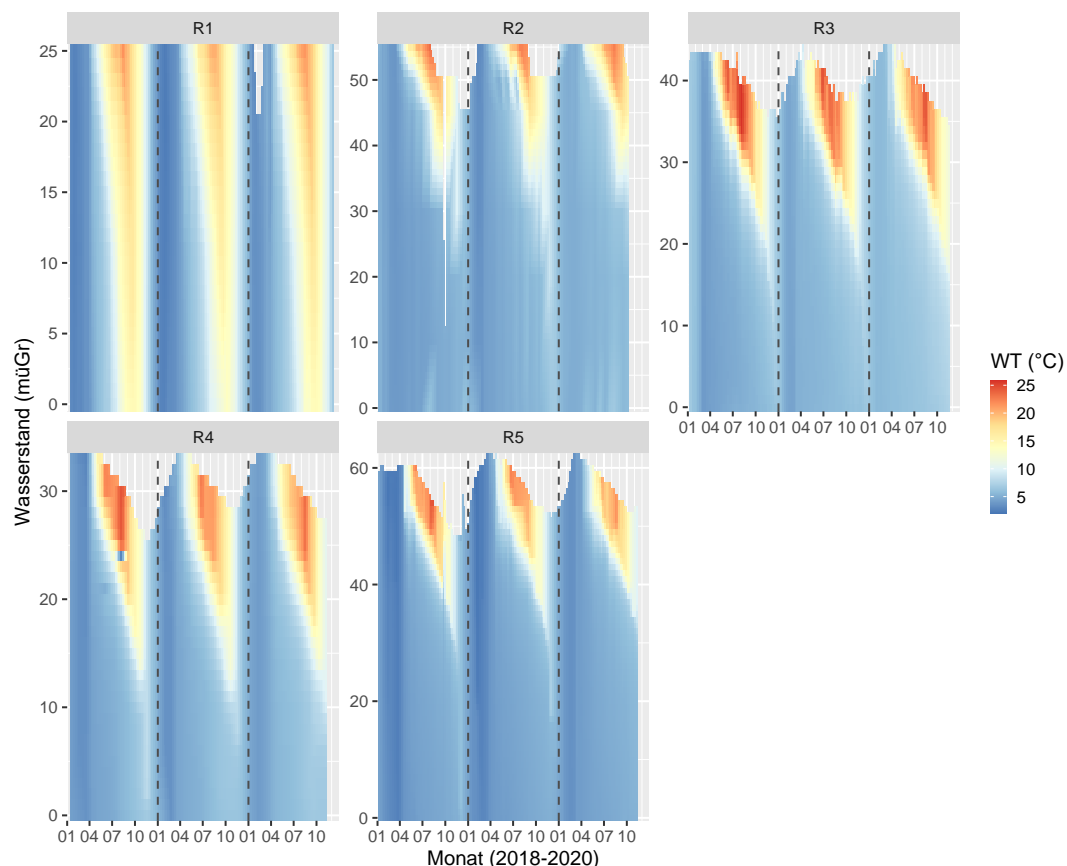
Unterschiede zwischen den Talsperren fanden sich bei verschiedenen Parametern. Die Talsperre Klingenberg (R1) ist die flachste der fünf untersuchten Talsperren. Dies beeinflusst auch einige physikochemischen Eigenschaften, so war sie die einzige Talsperre, die auch im Hypolimnion hohe Wassertemperaturen aufwies. Zudem waren der TOC-Wert (engl. *total organic carbon*), sowie der Nitrat- und Silikatgehalt in dieser Talsperre am höchsten. Die Talsperre Kleine Kinzig (R2) war dagegen relativ kühl und hatte im Vergleich zu den anderen Talsperren einen niedrigen pH-Wert, eine niedrige Leitfähigkeit und einen geringen Nitratgehalt. Zudem war der SAK-Wert (Spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm) hier am höchsten. Die Wahnbach Talsperre (R3) hatte im Vergleich den höchsten Gehalt an Gesamtphosphat, besonders im Hypolimnion wurden sehr hohe Werte gemessen. Aus diesem Grund ist sie auch als oligo- bis mesotrophe Talsperre einzuordnen. Die Breitenbach Talsperre (R4) unterschied sich von den anderen durch den sehr niedrigen Sauerstoffgehalt im Hypolimnion im Sommer und die dadurch bedingte hohe Konzentration an Mangan im Sedimentbereich. Von der Rappbode Talsperre (R5) lagen einige Daten lediglich aus dem Rohwasser vor, was den Vergleich erschwert. Sie ist allerdings die kälteste der fünf Talsperren, was vor allem daran liegt, dass sie gleichzeitig die tiefste der fünf Talsperren ist.

### 3.6.3.1 Wassertemperatur

Die Wassertemperatur (WT) ist ein entscheidender Faktor für die physikochemischen Abläufe eines Gewässers. Sie bedingt die thermische Schichtung, die während des Sommers in einer Talsperre auftritt. Zu dieser Zeit ändert sich die Temperatur im Hypolimnion kaum noch, sie bleibt bei etwa 5 °C während sie im Epilimnion weiter ansteigt. Zwischen beiden Schichten bildet sich das Metalimnion, die sogenannte Sprungschicht aus. Ein Überblick über die interpolierten Daten der Wassertemperatur in den fünf Talsperren ist in Abbildung 3.22 dargestellt, die Mittelwerte sind Tabelle A 4 zusammengefasst.

In der Talsperre Klingenberg (R1) war die mittlere Wassertemperatur im Jahr 2020 ( $9,6 \pm 4,7$  °C) am höchsten (Tabelle A 4). Im Jahr 2019, als es nicht zu einer Erhöhung der Konzentration coliformer Bakterien kam, war sie am niedrigsten ( $8,8 \pm 4,6$  °C). In dieser Talsperre wurden, anders als in den anderen Talsperren, auch im Tiefenwasser hohe Temperaturen ( $>5$  °C) gemessen (Abbildung 3.22), die Schichtung war also nicht so stabil. Dies kann an ihrer Tiefe liegen, denn verglichen mit den anderen Talsperren ist sie die flachste Talsperre mit lediglich 25 müGr. Die maximale Wassertemperatur betrug 21,6 °C und wurde im August 2018 gemessen. Insgesamt wurden zudem nur selten und auch nur im August Temperaturen über 20 °C in der Talsperre gemessen.

In der Talsperre Kleine Kinzig (R2) war die Wassertemperatur im Jahr 2020 am höchsten ( $7,0 \pm 3,4$  °C), 2018 dagegen am niedrigsten ( $6,2 \pm 3,3$  °C). Der höchste maximale Wert wurde im Juli 2018 mit 23,4 °C gemessen. Temperaturen über 20 °C konnten jeweils ab Juni/Juli bis



**Abbildung 3.22 Tiefenschnitt der Wassertemperatur in den fünf untersuchten Talsperren.**

Gezeigt sind die interpolierten Daten der Wassertemperatur (WT, °C) in den verschiedenen Tiefen der fünf Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach, R5 = Rappbode.

August in der Talsperre gemessen werden. Die durchschnittliche Wassertemperatur in dieser Talsperre lag deutlich unter der der Talsperre Klingenberg, während das Maximum höher war und über einen längeren Zeitraum gemessen werden konnte. Die Talsperre Kleine Kinzig ist allerdings auch fast doppelt so tief wie die Talsperre Klingenberg. Da sich lediglich die oberen Meter einer Talsperre in den Sommermonaten aufwärmen, bleibt ein Großteil des Wasservolumens kalt, was sich auf die durchschnittliche Temperatur auswirkt.

In der Wahnbach Talsperre (R3) schwankten die Temperaturen im Schnitt zwischen  $7,8 \pm 4,7$  °C (2018) und  $8,8 \pm 4,4$  °C (2020). Die Werte waren niedriger als in Klingenberg, allerdings höher als in der Kleinen Kinzig. Dies lag zum einen an der Tiefe der Talsperre, die ebenfalls zwischen den beiden vorherigen einzuordnen ist, sowie daran, dass deutlich höhere Maximalwerte erreicht wurden, bis  $25,9$  °C im August 2018. Auffallend ist, dass in diesem Jahr die einzige Erhöhung der Konzentration coliformer Bakterien in der Talsperre gemessen wurde. Es wurden häufig Werte über  $20$  °C erreicht, in der Regel zwischen Juni und September und somit deutlich länger verglichen mit den anderen Talsperren. Im Jahr 2018 wurden sogar bereits Ende Mai Wassertemperaturen über  $20$  °C gemessen.

Die Breitenbach Talsperre (R4) hatte eine ähnliche Durchschnittstemperatur wie die Wahnbach Talsperre mit  $7,4 \pm 4,7$  °C (2018) und  $8,2 \pm 4,6$  °C (2020). Der höchste Wert wurde – wie auch in den Talsperren Wahnbach und Klingenberg – im August 2018 mit  $24,5$  °C gemessen, welches allerdings im Mittel das kälteste Jahr war. Temperaturen über  $20$  °C zwischen Juni/Juli bis in den August hinein gemessen werden konnten und somit vergleichbar mit der Talsperre Kleine Kinzig.

Die Rappbode Talsperre (R5) war im Durchschnitt die kälteste der untersuchten Talsperren. Ihre Wassertemperatur lag im Schnitt zwischen  $5,9 \pm 4,0$  °C (2018) und  $6,2 \pm 3,6$  °C (2020). Sie ist gleichzeitig die tiefste Talsperre mit 60 müGr bei Vollstau. Das Maximum wurde wie in den anderen Talsperren im August 2018 mit  $24,5$  °C gemessen. Wassertemperaturen über  $20$  °C wurden in der Regel zwischen Juni und September, im Jahr 2018 bereits, wie in der Wahnbach Talsperre, Ende Mai gemessen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass hohe Konzentrationen coliformer Bakterien besonders in Jahren auftraten, in denen die Wassertemperatur hoch war. Zu diesem Zeitpunkt finden sich die maximalen Wassertemperaturen von mehr als  $20$  °C in der Talsperre. Allerdings weisen die verschiedenen Talsperren durchaus unterschiedliche Wassertemperaturen. Zusätzlich kamen die sich vermehrenden Bakterien nicht nur in den warmen Schichten des Epilimnions vor, sondern auch im kalten Hypolimnion. Zudem bedeutete eine hohe Wassertemperatur nicht direkt eine Erhöhung der Konzentration coliformer Bakterien, wie beispielsweise die Breitenbach Talsperre im Jahr 2018 zeigte. Der genaue Zusammenhang zwischen Wassertemperatur und dem Auftreten der coliformen Bakterien bedarf also weiterer Klärung.

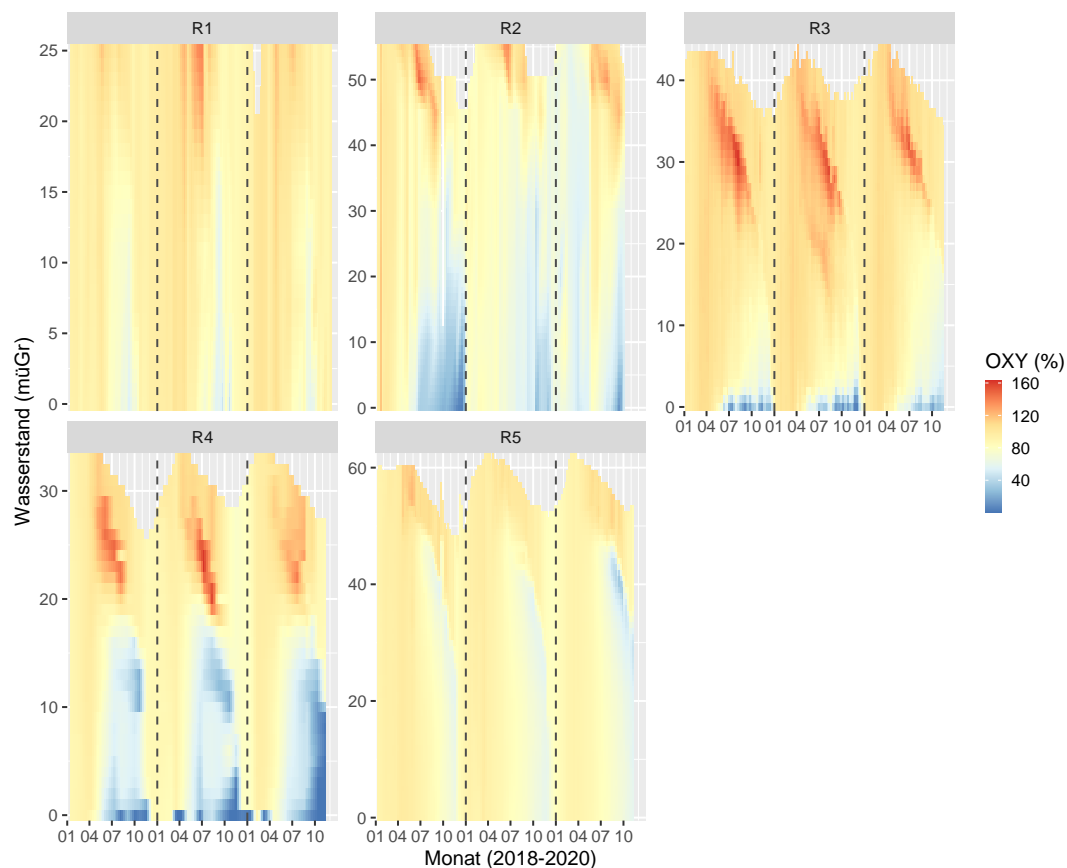
### 3.6.3.2 Sauerstoffsättigung

Die interpolierten Daten der Sauerstoffsättigung in den fünf Talsperren sind in Abbildung 3.23 dargestellt, die Mittelwerte sind Tabelle A 4 zusammengefasst. In allen fünf Talsperren konnte eine Sommerstagnation festgestellt werden, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt genauer beschrieben wurde. Da im Hypolimnion durch oxidative Prozesse konstant Sauerstoff verbraucht wird, ein Austausch mit dem darüber liegenden Epilimnion allerdings bedingt durch die Schichtung nicht mehr möglich ist, findet sich in dieser Schicht das Sauerstoffminimum. Dagegen kommt es im Metalimnion zum Sauerstoffmaximum. Dieser Anstieg ist bedingt durch das sauerstoffproduzierende Phytoplanktons, welches besonders häufig im Metalimnion

vorkommt, da die Nährstoffkonzentration hier deutlich höher als im Epilimnion ist (Wetzel, 2001). Besonders häufig finden sich metalimnischen Sauerstoffmaxima in Gewässern, die zu einer starken Schichtung neigen und somit in der Regel sehr tief sind.

Besonders deutlich zeigten sich diese Unterschiede zwischen den Schichten in den Talsperren Kleine Kinzig (R2), Wahnbach (R3) und Breitenbach (R4), mit einer niedrigen Sauerstoffsättigung im Hypolimnion und einer hohen Sauerstoffsättigung im Metalimnion. In der Talsperre Klingenberg (R1) gab es dagegen vergleichsweise geringe Unterschiede in der Sauerstoffsättigung des Hypo- und Epilimnions. Wie auch bei der Wassertemperatur konnte beobachtet werden, dass die Schichtung der Talsperre kürzer anhält, als bei den anderen Talsperren.

Die Unterschiede zwischen den Jahren waren in allen Talsperren vergleichsweise gering. In der Talsperre Breitenbach (R4) wurden im Durchschnitt im Jahr 2018 (85,0 %) die höchsten Werte gemessen, in diesem Jahr, war die Konzentration coliformer Bakterien nicht erhöht. In der Talsperre Klingenberg (R1) wurden 2019, in welchem keine Erhöhung der Konzentration coliformer Bakterien gemessen wurde, im Epilimnion höhere Sauerstoffwerte gemessen als in den anderen Jahren. Insgesamt lässt sich daher festhalten, dass hohe Konzentrationen coliformer Bakterien vermutlich eher in Jahren detektiert wurden, in denen die Sauerstoffsättigung niedriger war. Allerdings lässt sich dieser Zusammenhang nicht direkt pauschalisieren und muss daher weiter geprüft werden.



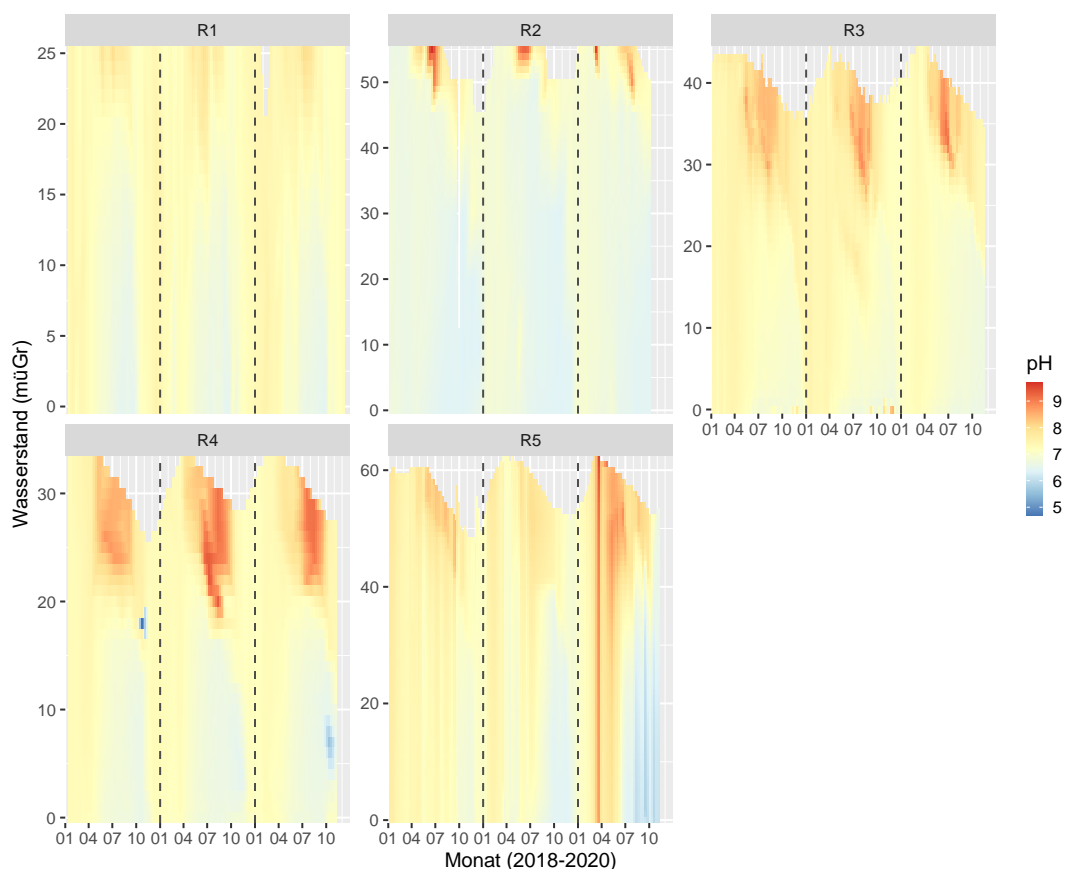
**Abbildung 3.23 Tiefenschnitt der Sauerstoffsättigung in den fünf untersuchten Talsperren.**

Gezeigt sind die interpolierten Daten der Sauerstoffsättigung (OXY, %) in den verschiedenen Tiefen der fünf Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach, R5 = Rappbode.

### 3.6.3.3 pH-Wert

Der pH-Wert ist von erheblicher Bedeutung für in Gewässern ablaufende Prozesse. Im Frühjahr, während der Primärproduktion, kommt es zur Erhöhung des pH-Wertes im Epilimnion, da in dieser Zeit  $\text{CO}_2$  im Rahmen der Photosynthese fixiert wird. Dagegen verringert sich der pH-Wert im Hypolimnion im Sommer bedingt durch die Freisetzung von  $\text{CO}_2$  aus Biomasse. Die interpolierten Daten der pH-Werte in den fünf Talsperren sind in Abbildung 3.24 zusammengestellt, die Mittelwerte sind in Tabelle A 4 zusammengefasst.

Unterschiede zwischen dem pH-Wert zeigten sich besonders zwischen den Talsperren, nicht aber zwischen den drei untersuchten Jahren. Die niedrigsten pH-Werte konnten jeweils während der Stagnationsphase im Hypolimnion festgestellt werden, während die höchsten Werte im Epilimnion gemessen werden konnten. Auffallend war, dass beim pH-Wert Unterschiede zwischen der Talsperre Kleine Kinzig, in welcher die Gattung *Lelliottia* dominiert, und den anderen vier Talsperren, in welchen die Gattung *Enterobacter* dominiert, gefunden werden konnten. In der Kleinen Kinzig Talsperre lag der pH-Wert im Schnitt bei 6,7–6,8, während er bei den anderen vier Talsperren höher war mit 7,1–7,4. Der niedrigere pH-Wert in der Kleinen Kinzig Talsperre lässt sich durch das Vorhandensein von Huminsäuren erklären (Hoehn, 2011), da niedrige pH-Werte häufig in natürlichen Gewässern vorliegen, die einen hohen Gehalt an gelösten organischen Substanzen enthalten (Wetzel, 2001). Aufgrund des niedrigen pH-Wertes muss das Trinkwasser der Talsperre Kleine Kinzig im Rahmen der Aufbereitung auch entsäuert werden.



**Abbildung 3.24 Tiefenschnitt des pH-Wertes in den fünf untersuchten Talsperren.**

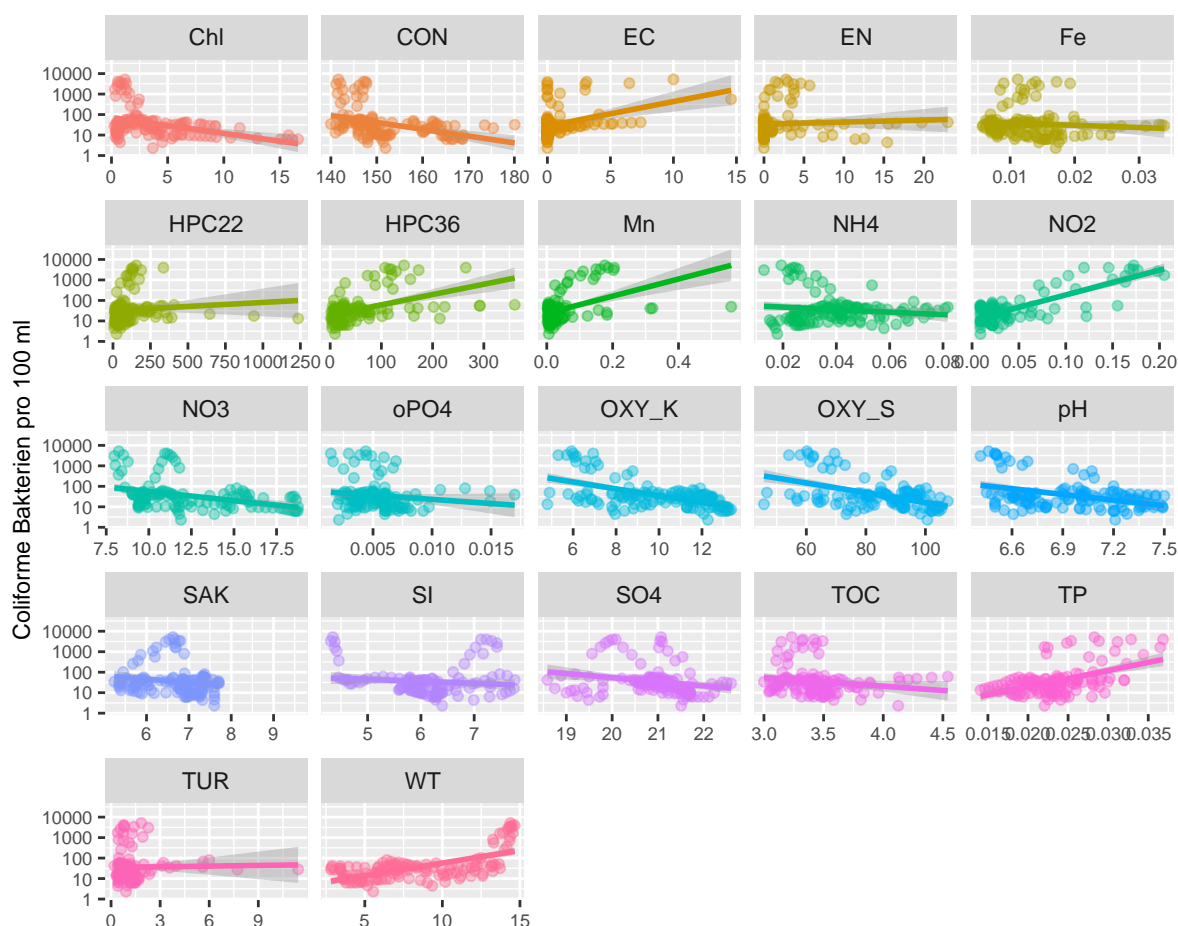
Gezeigt sind die interpolierten Daten des pH-Wertes in den verschiedenen Tiefen der fünf Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach, R5 = Rappbode.

### 3.6.4 Korrelationsanalyse und Hauptkomponentenanalyse (PCA)

#### 3.6.4.1 Klingenberg Talsperre (R1)

Zwischen der Konzentration coliformer Bakterien und weiteren mikrobiologischen, sowie physikochemischen Parametern wurden Korrelationsanalysen und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Da von den meisten Talsperren lediglich die mikrobiologischen Daten des Rohwassers vorlagen, wurden diese mit den physikochemischen Daten des Rohwasserentnahmehorizontes verglichen. In der Talsperre Klingenberg liegt der Entnahmehorizont des Rohwassers bei einer Höhe von 360 müNN (0 müGr).

Die Regressionsanalyse ist in Abbildung 3.25, der zugehörige Korrelationskoeffizient in Tabelle 3.13 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation ( $p \leq 0,05$ ) konnte zwischen den coliformen Bakterien, sowie den Parametern Mangan, Nitrit, Phosphat und der Wassertemperatur festgestellt werden. Verglichen mit den anderen Talsperren war die Wassertemperatur auch im Rohwasserentnahmehorizont sehr hoch. Zusätzlich zeigten alle mikrobiologischen Parameter eine signifikante positive Korrelation. Eine negative Korrelation zeigte sich zwischen den coliformen Bakterien, sowie Parametern der Wasserbeschaffenheit (Chlorophyll, Leitfähigkeit, Sauerstoff, pH-Wert, SAK), sowie Nährstoffen und Metallen (Eisen,

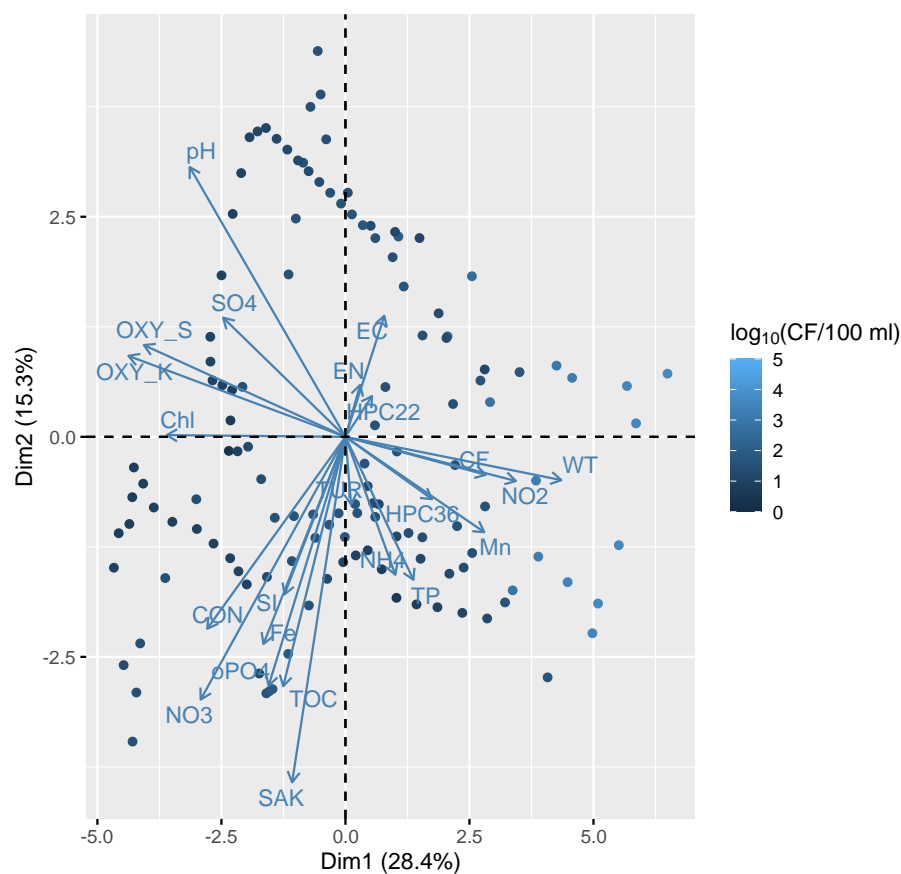


**Abbildung 3.25 Regressionsanalyse der Daten der Talsperre Klingenberg (R1).**

Dargestellt ist die Regressionsanalyse zwischen der Konzentration coliformer Bakterien (pro 100 ml), sowie weiteren mikrobiologischen und physikochemischen Parametern im Rohwasser der Talsperre Klingenberg. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die Linie stellt die lineare Regression dar, die umgebenden grauen Flächen das 95 % Konfidenzintervall.

ortho-Phosphat, Silikat, Nitrat, Sulfat und TOC). Im Vergleich mit den anderen Talsperren war der TOC-, Nitrat- und Silikatgehalt in dieser Talsperre am höchsten.

Die PCA ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Sie dient als einfaches Visualisierungsinstrument, um die Varianz von Datensätzen zusammenzufassen und die dominanten Gradienten im niedrigdimensionalen Raum aufzuzeigen (Paliy & Shankar, 2016) und lineare Zusammenhänge zu zeigen (Ramette, 2007). Sie bestätigt die bereits in der Regressionsanalyse festgestellte positive Korrelation der coliformen Bakterien mit der Koloniezahl (bei 36 °C), der Wassertemperatur, sowie dem Mangan-, Phosphat- und Nitritgehalt. Eine negative Korrelation konnte dagegen mit den Parametern Sauerstoff, Chlorophyll, pH-Wert und Sulfat festgestellt werden. Die anderen negativ korrelierten Parameter der Regressionsanalyse wurden nicht bestätigt. Interessanterweise zeigt die PCA den Zusammenhang der mikrobiologischen Parameter *E. coli*, Enterokokken, sowie Koloniezahl (bei 22 °C), die jedoch nicht mit den coliformen Bakterien, sowie der Koloniezahl (bei 36 °C) zusammenhängen.



**Abbildung 3.26 Hauptkomponentenanalyse der Daten der Talsperre Klingenberg (R1).**

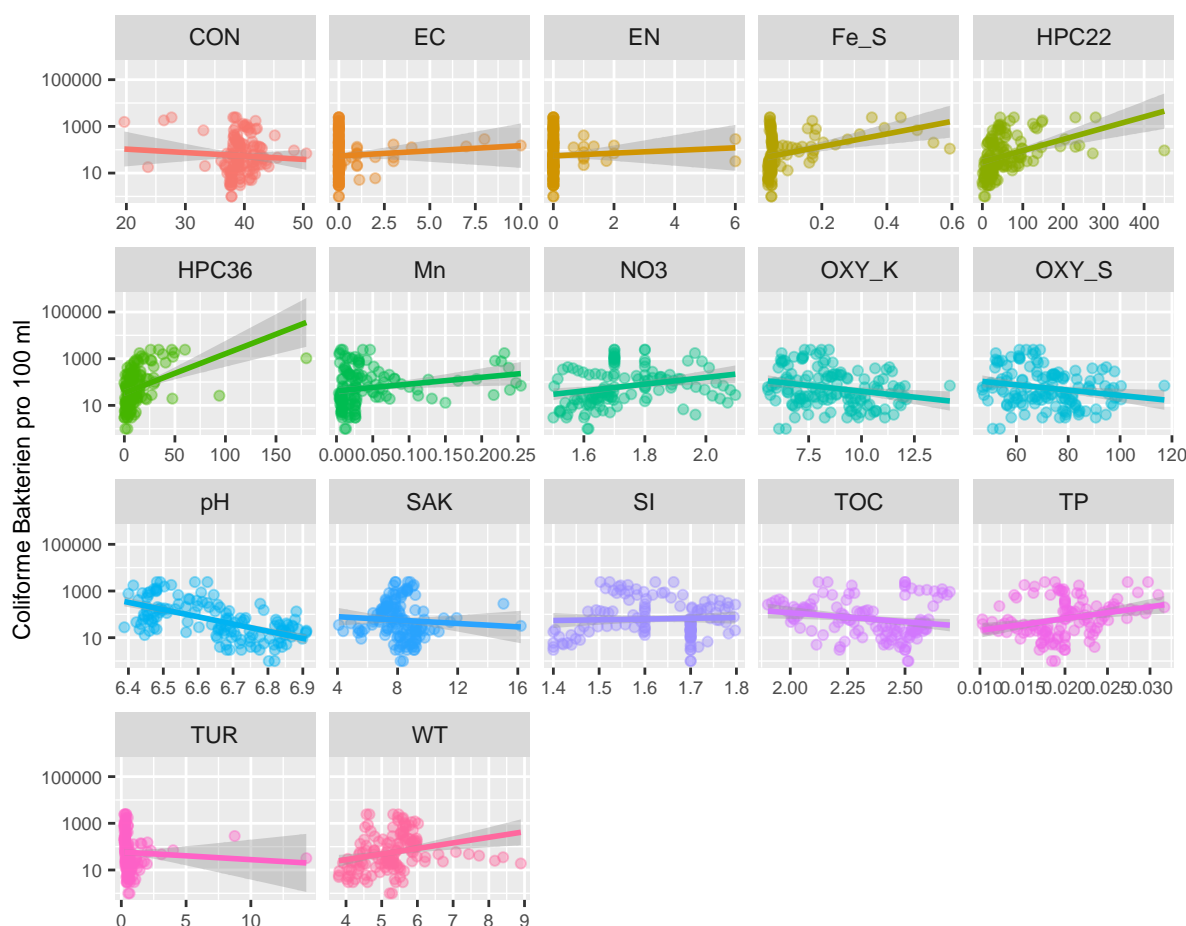
Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mikrobiologischen und physikochemischen Parameter im Rohwasser der Talsperre Klingenberg. Die Blaufärbung der Punkte richtet sich nach der Konzentration coliformer Bakterien ( $\log_{10}(\text{CF}/100 \text{ ml})$ ). Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden.

### 3.6.4.2 Kleine Kinzig Talsperre (R2)

Das Rohwasser der Talsperre Kleine Kinzig wurde während des Versuchszeitraums die meiste Zeit aus einer Höhe von 564 müNN (20 müGr) entnommen, weswegen die Korrelationsanalyse mit den Daten dieser Höhe durchgeführt wurde. Der Entnahmehorizont ist somit etwas höher als der in der Talsperre Klingenberg.

Die Regressionsanalyse ist in Abbildung 3.27, der zugehörige Korrelationskoeffizient in Tabelle 3.13 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation konnte zwischen der Konzentration coliformer Bakterien und Metallen (Eisen, Mangan), Nährstoffen (Nitrat, Phosphat), sowie der Koloniezahl (bei 22 und 36 °C) festgestellt werden. Eine signifikante negative Korrelation wurde dagegen mit den Parametern Sauerstoff, pH-Wert, TOC, SAK und Trübung festgestellt.

Die PCA ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Diese bestätigt die bei der Regressionsanalyse genannten Parameter mit positiver Korrelation. Eine negative Korrelation zeigt sich mit dem pH-Wert, sowie dem TOC-Gehalt. Der Sauerstoffgehalt, SAK-Wert und die Trübung zeigten dagegen zwar untereinander, nicht aber mit den coliformen Bakterien einen Zusammenhang.



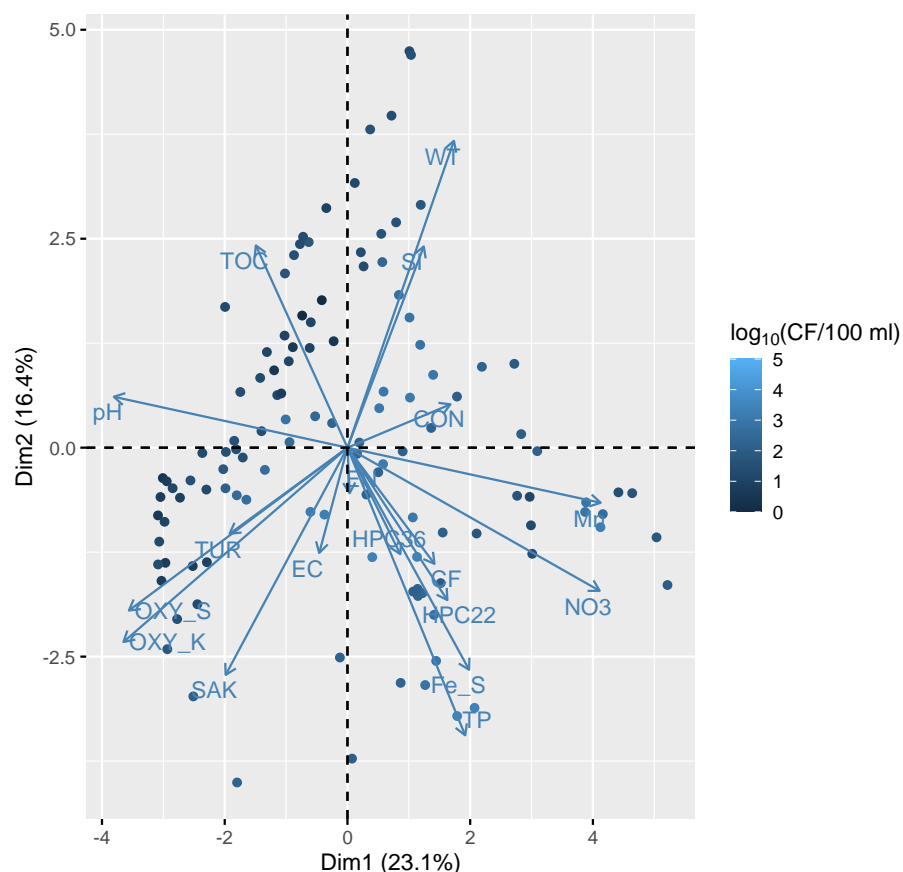
**Abbildung 3.27 Regressionsanalyse der Daten der Talsperre Kleine Kinzig (R2).**

Dargestellt ist die Regressionsanalyse zwischen der Konzentration coliformer Bakterien (pro 100 ml), sowie weiteren mikrobiologischen und physikochemischen Parametern im Rohwasser der Talsperre Kleine Kinzig. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die Linie stellt die lineare Regression dar, die umgebenden grauen Flächen das 95 % Konfidenzintervall.



Auffallend war, dass die Talsperre Kleine Kinzig die einzige war, in welcher eine positive Korrelation mit dem Nitratgehalt gefunden werden konnte. Sie war zudem die Talsperre, mit dem niedrigsten Nitratgehalt, verglichen mit den anderen Talsperren (Abbildung A 3, Tabelle A 4), so war dieser beispielsweise in der Breitenbach Talsperre beinahe doppelt, in den Talsperren Klingenberg und Wahnbach nahezu zehnmal so hoch.

Eine signifikante positive Korrelation mit der Wassertemperatur konnte hier nicht gefunden werden. Allerdings stieg die Konzentration coliformer Bakterien in dieser Talsperre deutlich vor den anderen Talsperren an (Kapitel 3.2) und somit bevor die maximale Wassertemperatur erreicht wurde. Wie sich allerdings in Kapitel 3.6.5 zeigt, hat die Wassertemperatur sehr wohl einen Einfluss auf die coliformen Bakterien, die sich allerdings erst zeigt, wenn man nicht die Gesamt-Konzentration aller coliformer Bakterien betrachtet, sondern lediglich die sich vermehrenden Gattung *Lelliottia*. Zudem ist der Zusammenhang zwischen coliformen Bakterien und Wassertemperatur im Oberflächenwasser, begründet durch die niedrigen Temperaturen im Rohwasser, deutlich stärker, wie später ebenfalls ausgeführt wird.



**Abbildung 3.28 Hauptkomponentenanalyse der Daten der Talsperre Kleine Kinzig (R2).**

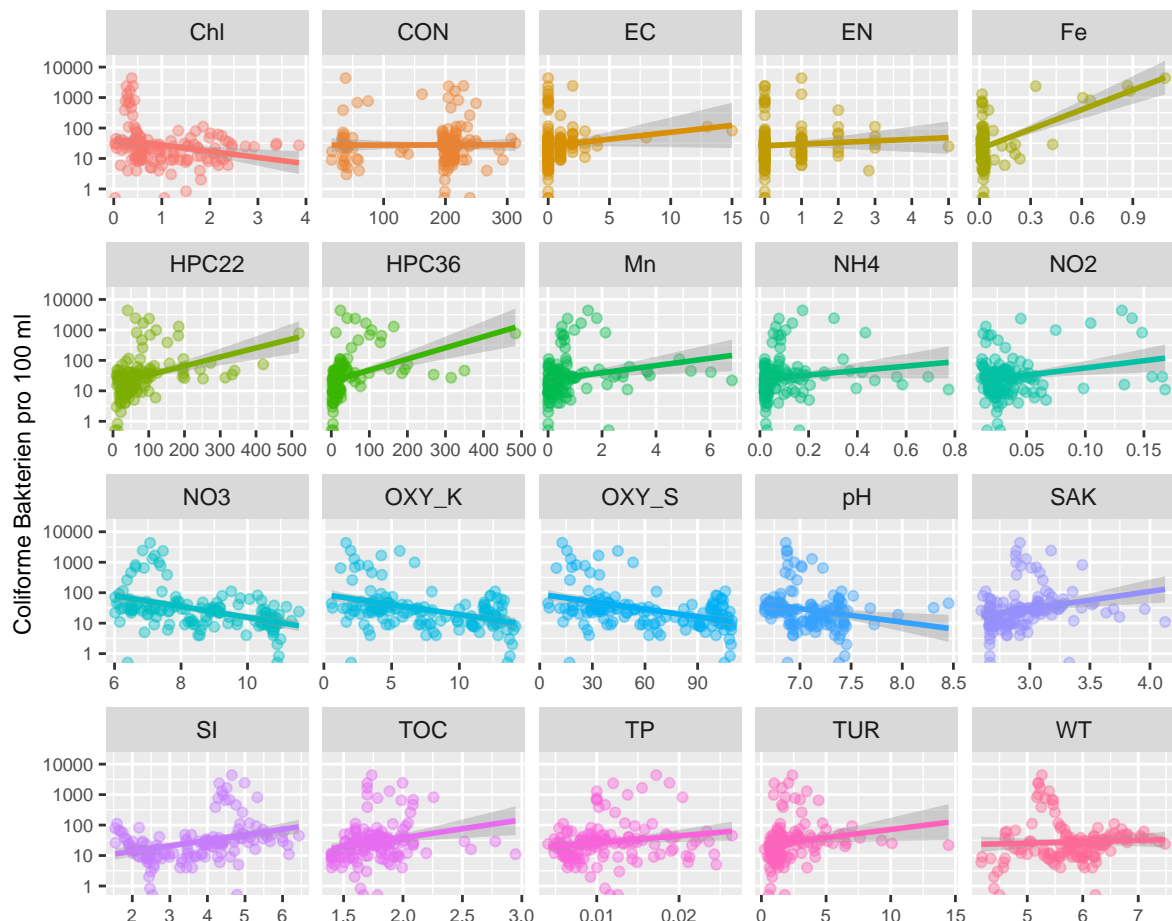
Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mikrobiologischen und physikochemischen Parameter im Rohwasser der Talsperre Kleine Kinzig. Die Blaufärbung der Punkte richtet sich nach der Konzentration coliformer Bakterien ( $\log_{10}(\text{CF}/100 \text{ ml})$ ). Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden.

### 3.6.4.3 Wahnbach Talsperre (R3)

Das Rohwasser der Wahnbach Talsperre wurde bei 80 müNN (0 müGr) entnommen. Das Wasser wurde daher vergleichbar mit der Talsperre Klingenberg auf Grundhöhe entnommen, somit niedriger als bei der Talsperre Kleine Kinzig.

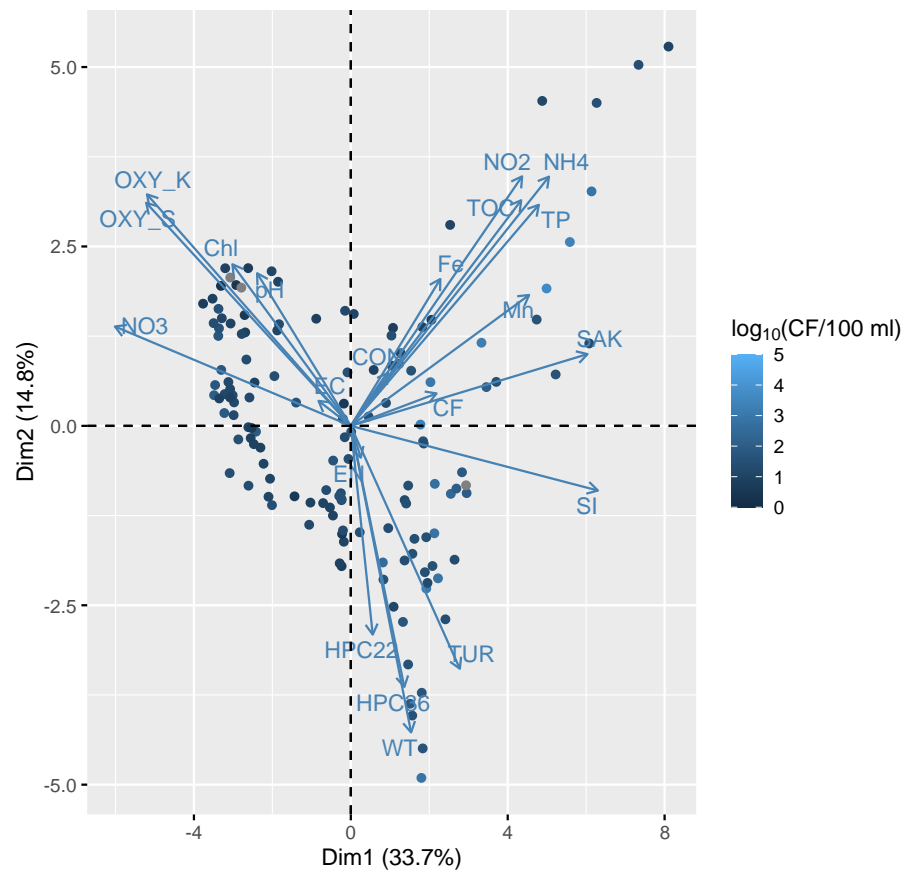
Die Regressionsanalyse ist in Abbildung 3.29, der zugehörige Korrelationskoeffizient in Tabelle 3.13 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation wurde zwischen den coliformen Bakterien und den Parametern Koloniezahl (bei 22 und 36 °C), Mangan, Ammoniak, SAK, Silikat, TOC, Phosphat, Trübung und Wassertemperatur festgestellt. Eine signifikante negative Korrelation wurde dagegen mit den Parametern Chlorophyll, Nitrat, Sauerstoff und pH-Wert gefunden.

Die PCA ist in Abbildung 3.30 dargestellt. An der Länge der Pfeile der PCA zeigt sich, dass die Konzentration coliformer Bakterien nur wenig Einfluss auf die Hauptkomponenten hat, andere Parameter also eine deutlich größere Rolle spielen. Sie korreliert positiv mit Mangan und SAK, eine eindeutige negative Korrelation ist nicht feststellbar.



**Abbildung 3.29 Regressionsanalyse der Daten der Wahnbach Talsperre (R3).**

Dargestellt ist die Regressionsanalyse zwischen der Konzentration coliformer Bakterien (pro 100 ml), sowie weiteren mikrobiologischen und physikochemischen Parametern im Rohwasser der Wahnbach Talsperre. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die Linie stellt die lineare Regression dar, die umgebenden grauen Flächen das 95 % Konfidenzintervall.



**Abbildung 3.30 Hauptkomponentenanalyse der Daten der Wahnbach Talsperre (R3).**

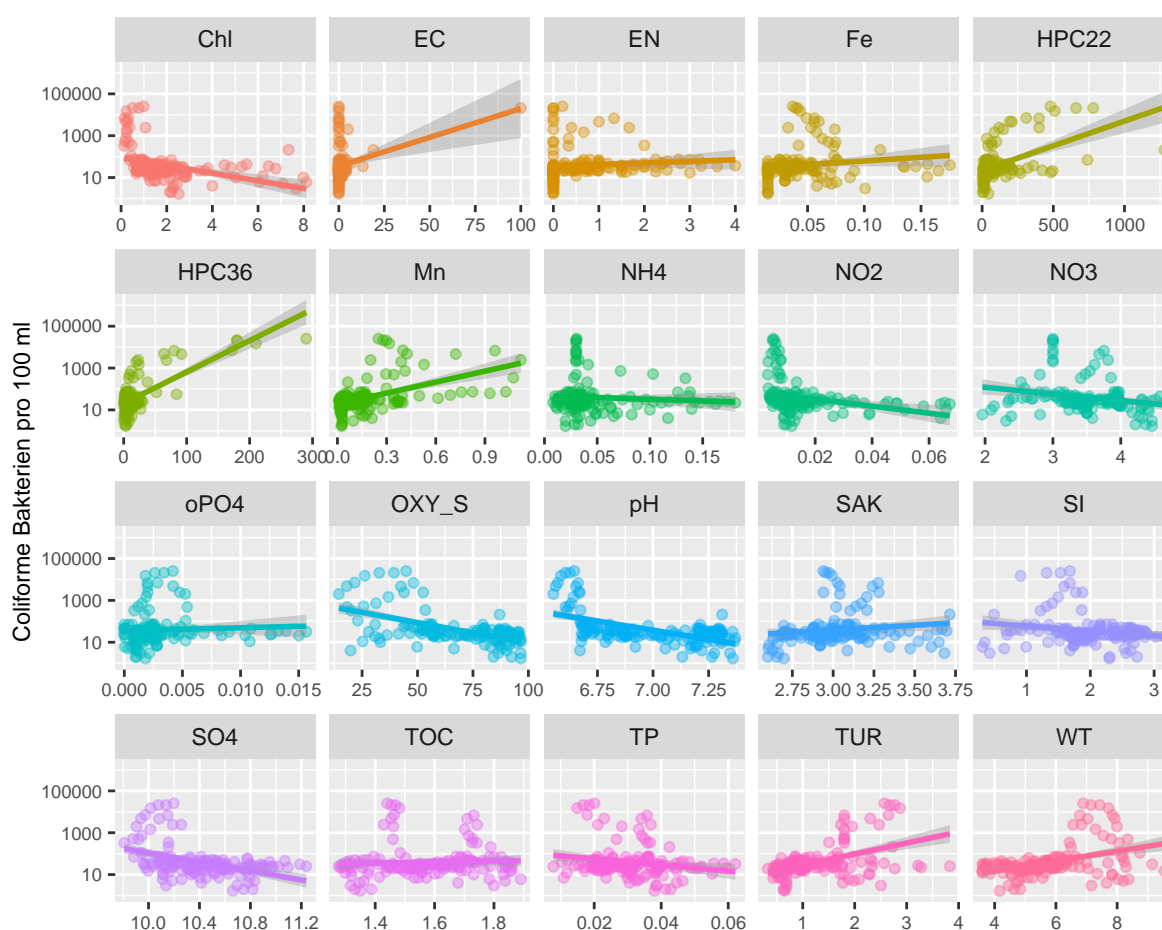
Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mikrobiologischen und physikochemischen Parameter im Rohwasser der Wahnbach Talsperre. Die Blaufärbung der Punkte richtet sich nach der Konzentration coliformer Bakterien ( $\log_{10}(\text{CF}/100 \text{ ml})$ ). Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden.

### 3.6.4.4 Breitenbach Talsperre (R4)

Das Rohwasser der Breitenbach Talsperre wurde aus 345 müNN (10 müGr) entnommen. Die Entnahmehöhe befindet sich somit zwischen denen der Talsperre Klingenberg und Wahnbach (0 müGr), sowie der Talsperre Kleine Kinzig (20 müGr).

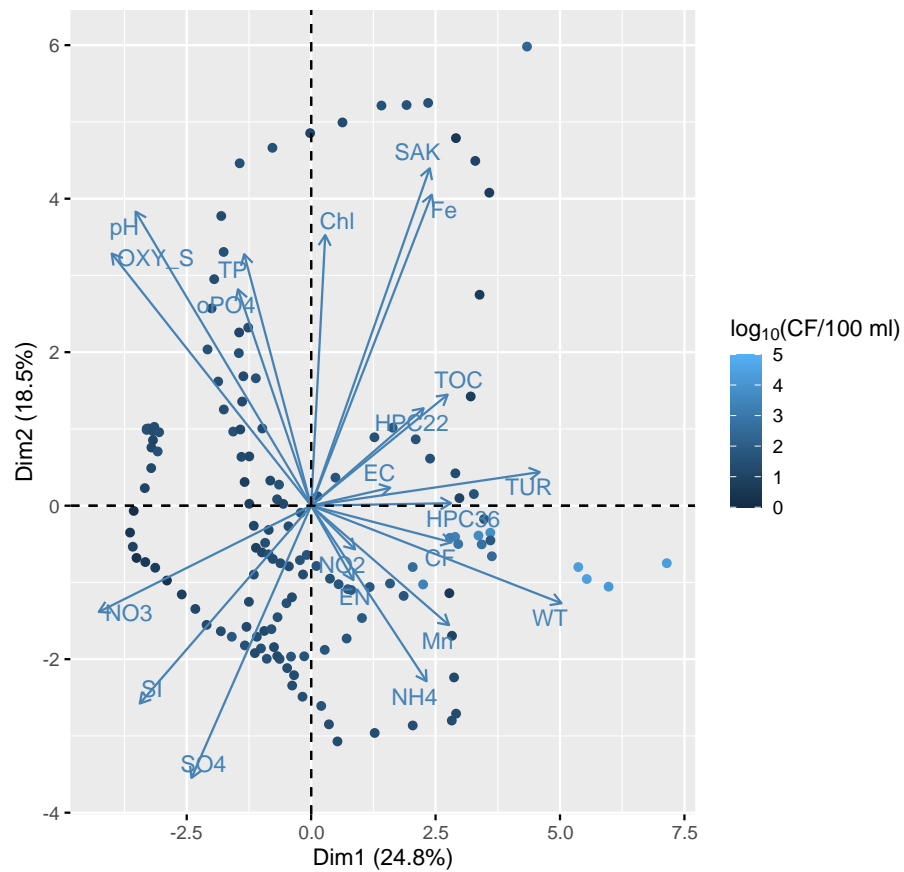
Die Regressionsanalyse ist in Abbildung 3.31, der zugehörige Korrelationskoeffizient in Tabelle 3.13 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation wurde zwischen den coliformen Bakterien mit den Parametern Enterokokken, Koloniezahl (bei 22 und 36 °C), Eisen, Mangan, SAK, TOC, Trübung, sowie Wassertemperatur festgestellt. Eine signifikante negative Korrelation wurde dagegen mit den Parametern Chlorophyll, Nitrit, Nitrat, Sauerstoffsättigung, pH-Wert und Sulfat gemessen.

Die PCA ist in Abbildung 3.32 dargestellt. Hier zeigt sich die positive Korrelation mit der Wassertemperatur am deutlichsten, sowie mit dem Mangangehalt. Eine negative Korrelation wurde auch hier mit Sauerstoffsättigung, pH-Wert, sowie Gesamtphosphatgehalt und ortho-Phosphatgehalt festgestellt.



**Abbildung 3.31 Regressionsanalyse der Daten der Breitenbach Talsperre (R4).**

Dargestellt ist die Regressionsanalyse zwischen der Konzentration coliformer Bakterien (pro 100 ml), sowie weiteren mikrobiologischen und physikochemischen Parametern im Rohwasser der Breitenbach Talsperre. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die Linie stellt die lineare Regression dar, die umgebenden grauen Flächen das 95 % Konfidenzintervall.



**Abbildung 3.32 Hauptkomponentenanalyse der Daten der Breitenbach Talsperre (R4).**

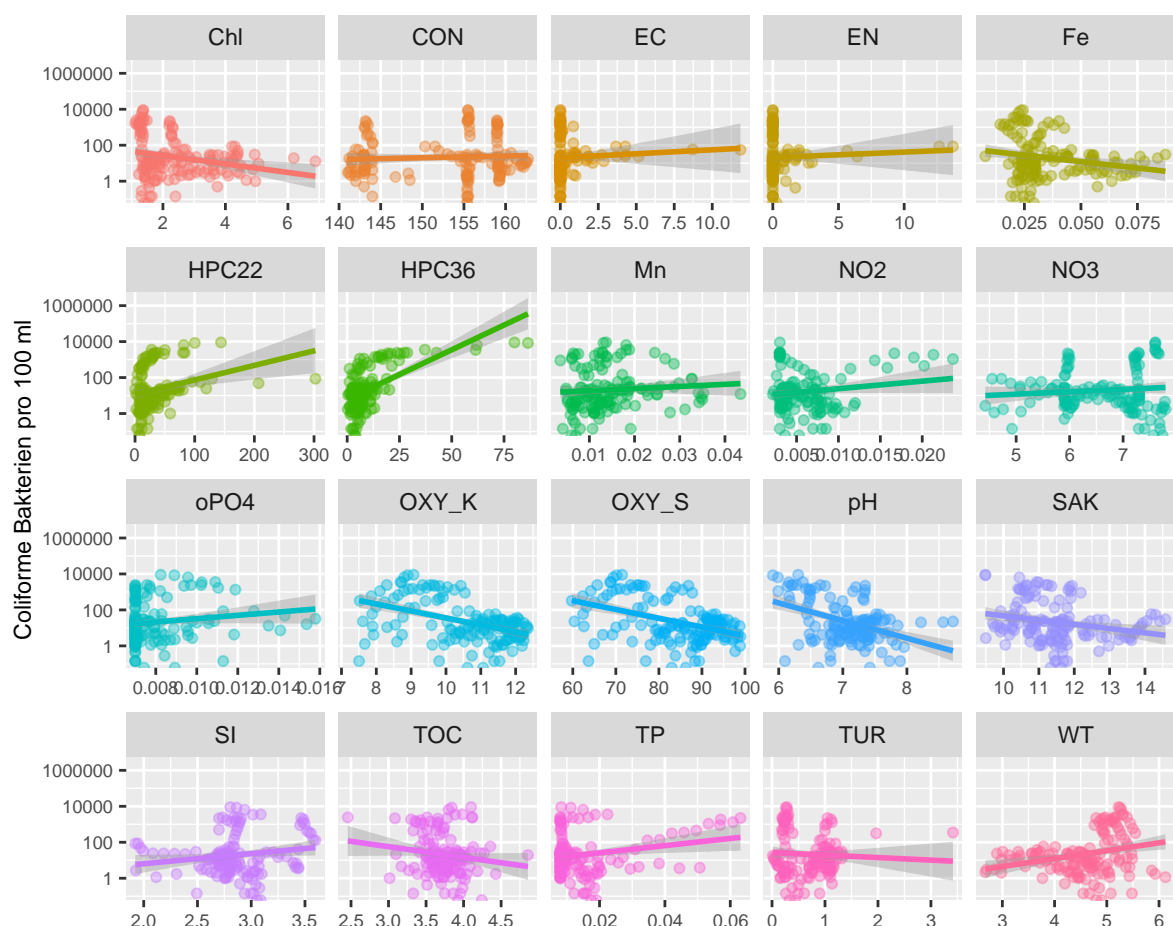
Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mikrobiologischen und physikochemischen Parameter im Rohwasser der Breitenbach Talsperre. Die Blaufärbung der Punkte richtet sich nach der Konzentration coliformer Bakterien ( $\log_{10}(\text{CF}/100 \text{ ml})$ ). Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden.

### 3.6.4.5 Rappbode Talsperre (R5)

Das Rohwasser der Rappbode Talsperre wurde aus 370 müNN (10 müGr) entnommen, was vergleichbar ist mit der Breitenbach Talsperre.

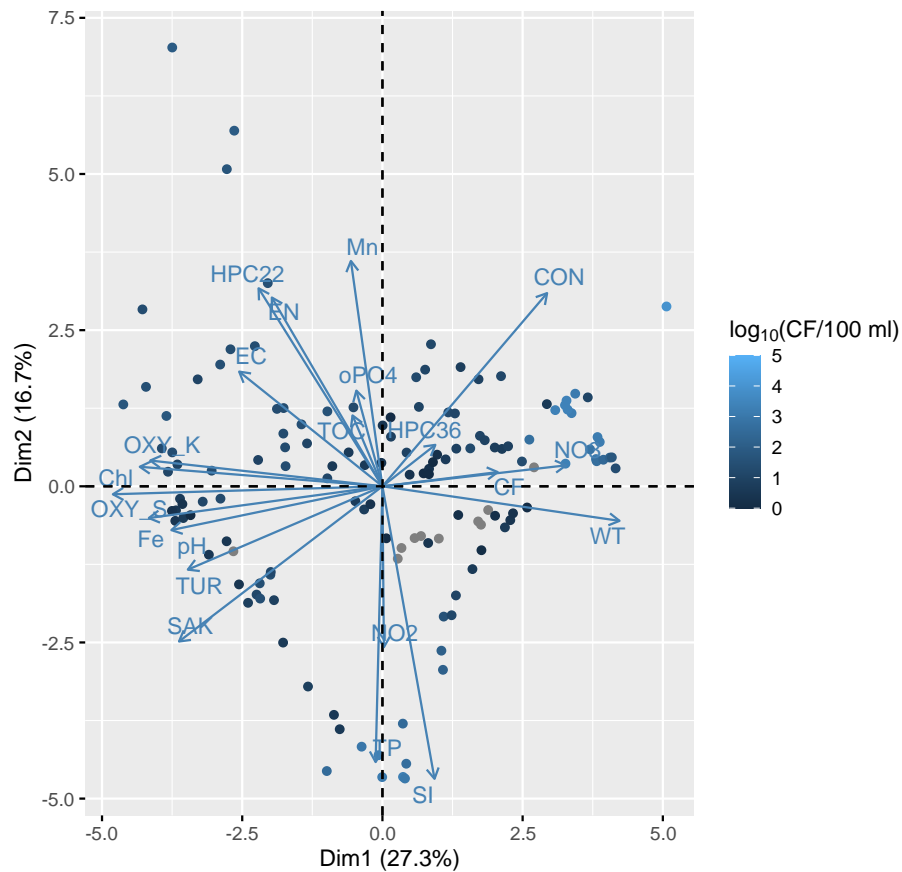
Die Regressionsanalyse ist in Abbildung 3.33, der zugehörige Korrelationskoeffizient in Tabelle 3.13 dargestellt. Eine signifikante positive Korrelation wurde lediglich mit der Koloniezahl (bei 36 °C) festgestellt, während lediglich bei der Sauerstoffkonzentration eine signifikante negative Korrelation gemessen wurde. Dennoch ist bei der Rappbode Talsperre die Korrelation mit der Wassertemperatur und dem Mangangehalt ebenfalls positiv, sowie jene mit dem Chlorophyllgehalt, sowie dem pH-Wert negativ, wenn auch nicht signifikant.

Die PCA ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Hier zeigt sich ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen coliformen Bakterien und Wassertemperatur, dies ist vergleichbar mit den Talsperren Klingenberg und Wahnbach. Der Zusammenhang mit dem Nitratgehalt ist laut der PCA bei dieser Talsperre ebenfalls positiv, anders als dies beispielsweise bei anderen Talsperren der Fall war. Ein negativer Zusammenhang zeigte sich erneut mit den Parametern Sauerstoff, Chlorophyll, sowie dem pH-Wert.



**Abbildung 3.33 Regressionsanalyse der Daten der Rappbode Talsperre (R5).**

Dargestellt ist die Regressionsanalyse zwischen der Konzentration coliformer Bakterien (pro 100 ml), sowie weiteren mikrobiologischen und physikochemischen Parametern im Rohwasser der Rappbode Talsperre. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die Linie stellt die lineare Regression dar, die umgebenden grauen Flächen das 95 % Konfidenzintervall.



**Abbildung 3.34 Hauptkomponentenanalyse der Daten der Rappbode Talsperre (R5).**

Dargestellt ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mikrobiologischen und physikochemischen Parameter im Rohwasser der Rappbode Talsperre. Die Blaufärbung der Punkte richtet sich nach der Konzentration coliformer Bakterien ( $\log_{10}(\text{CF}/100 \text{ ml})$ ). Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden.

### 3.6.4.6 Zusammenfassung Korrelationsanalyse

Eine positive Korrelation konnte bei allen Talsperren, zwischen der Konzentration coliformer Bakterien, sowie der Wassertemperatur und dem Mangengehalt festgestellt werden. Eine negative Korrelation lag dagegen bei allen Talsperren mit den Parametern Chlorophyll, Sauerstoff, pH-Wert und Sulfat vor, wobei diese Parameter zum Teil nicht in allen Talsperren gemessen wurden. Bei den mikrobiologischen Parametern konnte eine positive Korrelation zwischen fast allen Parametern mit den coliformen Bakterien festgestellt werden, signifikant war diese insbesondere für die Koloniezahl.

Bei einigen Parametern war die Korrelation dagegen in verschiedenen Talsperren unterschiedlich. In diesem Zuge sind besonders die Unterschiede zwischen der Talsperre Kleine Kinzig und den anderen Talsperren hervorzuheben, da diese sich von den anderen durch die proliferierende Art an coliformen Bakterien unterscheidet. Für den Parameter Nitrat war die Korrelation in der Talsperre Kleine Kinzig positiv, in den anderen Talsperren dagegen negativ. Allerdings muss festgehalten werden, dass der Nitratgehalt in dieser Talsperre deutlich niedriger war als in den anderen Talsperren.

**Tabelle 3.13 Korrelationskoeffizient nach Spearman zwischen der Konzentration coliformer Bakterien und mikrobiologischen, sowie physikalisch-chemischen Parametern im Rohwasser der jeweiligen Talsperre.**

Parameter°		R1	R2	R3	R4	R5
Mikrobiologische Parameter	EC	0,29*	-0,07	0,25	0,17	0,26
	EN	0,20*	0,05	0,19	0,50*	0,17
	HPC22	0,33*	0,49*	0,49*	0,47*	0,39
	HPC36	0,51*	0,53*	0,57*	0,40*	0,45*
Physikalisch-chemische Parameter	Chl	-0,36*	-	-0,29*	-0,50*	-0,12
	CON	-0,54*	0,02	0,14	-	0,01
	Fe	-0,20*	0,39*	-0,07	0,30*	-0,09
	Mn	0,31*	0,33*	0,42*	0,49*	0,17
	NH4	0,07	-	0,28*	-0,08	-
	NO2	0,39*	-	-0,05	-0,46*	-0,13
	NO3	-0,41*	0,48*	-0,48*	-0,26*	-0,13
	oPO4	-0,22*	-	-	0,15	0,07
	OXY_K	-0,50*	-0,14*	-0,42*	-	-0,32*
	OXY_S	-0,41*	-0,14*	-0,42*	-0,49*	-0,23
	pH	-0,35*	-0,58*	-0,31*	-0,47*	-0,17
	SAK	-0,19*	-0,14*	0,40*	0,26*	-0,19
	SI	-0,19*	0,10	0,37*	-0,13	0,04
	SO4	-0,40*	-	-	-0,34*	-
	TOC	-0,20*	-0,20*	0,33*	0,21*	-0,17
	TP	0,38*	0,37*	0,19*	-0,14	-0,07
TUR	-0,06	-0,55*	0,43*	0,41*	0,13	
WT	0,53*	0,31	0,13*	0,36*	0,16	

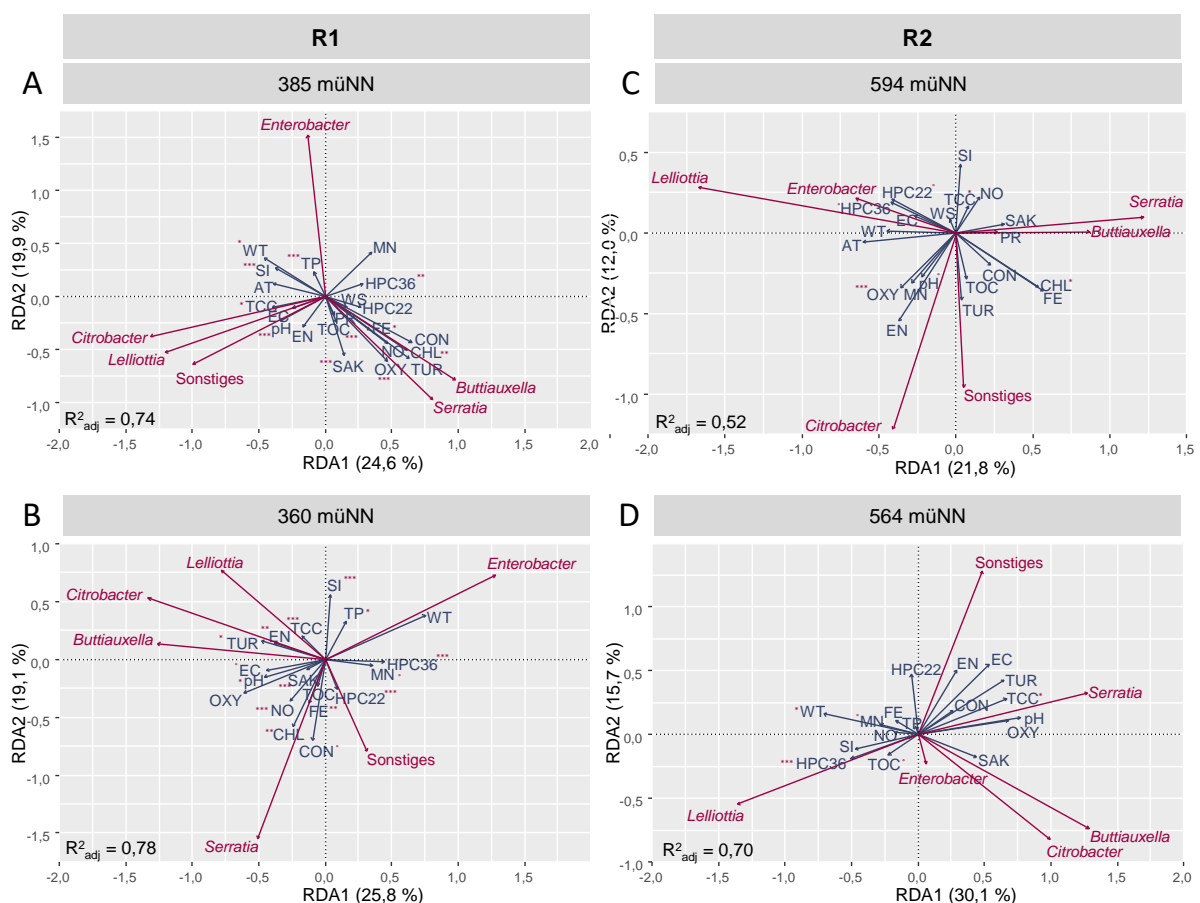
°Abkürzungen, sowie Einheit der Parameter finden sich in Tabelle A 4 \*  $p \leq 0,05$



### 3.6.5 Redundanzanalyse (RDA)

Zusätzlich zu den Korrelationsanalysen wurde auch eine Redundanzanalyse (RDA, engl. *redundancy analysis*) durchgeführt. Die Redundanzanalyse ist eine Analyse zur Bewertung, wie viel der Variation in einem Satz von Variablen durch die Variation in einem anderen Satz von Variablen erklärt werden kann (Paliy & Shankar, 2016). Sie diente dazu, nicht nur Parameter zu bestimmen, die allgemein mit der Konzentration coliformer Bakterien im Rohwasser korrelieren, sondern darüber hinaus, die beiden Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* im Speziellen beeinflussen. Hierfür wurden Daten von Oberflächen- (Abbildung 3.35A) und Rohwasser (Abbildung 3.35B) der Talsperre Klingenberg sowie von Oberflächen- (Abbildung 3.35C) und Rohwasser (Abbildung 3.35D) der Talsperre Kleine Kinzig der Zeiträume 2018 bis 2019 verwendet. Die Identifizierungsergebnisse wurden aus Kapitel 3.2.2 verwendet. Die Ergebnisse der RDA wurden bereits publiziert (Reitter *et al.*, 2021b).

Der Permutationstest für die RDA ergab verschiedene Faktoren, die die Varianz der coliformen Spezies in beiden Talsperren erklären, z. B. Wassertemperatur, Sauerstoff, pH-Wert, Chlorophyll, Mangan, TOC und mikrobiologische Parameter (HPC22, HPC36, TCC). Dies war vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Korrelationsanalyse. Außerdem waren einige Faktoren nur für die Variation in der Talsperre Klingenberg signifikant: Gesamtphosphat, Silikat, Nitrat, Eisen, Leitfähigkeit, Trübung, SAK, Enterokokken und *E. coli*.



**Abbildung 3.35 Redundanzanalyse der Daten der Talsperren Klingenberg (R1) und Kleine Kinzig (R2).**

Die Redundanzanalyse diente der Ermittlung des Zusammenhangs zwischen physikalisch-chemischen Parametern und coliformen Bakterien in den Talsperren Klingenberg (A, B) und Kleine Kinzig (C, D) in verschiedenen Wassertiefen. Die Einheit, sowie Abkürzung der jeweiligen Parameter kann Tabelle A 4 entnommen werden. Die statistische Signifikanz wird durch  $^{\circ}$  ( $p < 0,1$ ),  $*$  ( $p < 0,05$ ),  $**$  ( $p < 0,01$ ) und  $***$  ( $p < 0,001$ ) dargestellt.

Von diesen signifikanten Faktoren korrelierten positiv mit den sich vermehrenden coliformen Arten (d. h. *Enterobacter* für Klingenberg und *Lelliottia* für Kleine Kinzig) die Wassertemperatur, Koloniezahl (bei 36 °C) und die Mangankonzentration. Negative Korrelationen wurden für Chlorophyll beobachtet. Des Weiteren war *Enterobacter* spp. in der Talsperre Klingenberg positiv mit Silikat und Gesamtphosphat korreliert und zeigte eine negative Korrelation mit den Parametern Nitrat, pH, TOC, SAK, Sauerstoff, *E. coli* und Enterokokken. Die negative Korrelation der sich vermehrenden coliformen Art mit den mikrobiologischen Parametern *E. coli* und Enterokokken steht im Kontrast zu der allgemein positiven Korrelation bei Betrachtung aller Daten im Rahmen der Korrelationsanalyse. Das Vorkommen von *Lelliottia* spp. in der Talsperre Kleine Kinzig war negativ mit *Serratia* spp. sowie mit TCC korreliert.

Je nach untersuchter Bakteriengattung, Talsperre oder Wassertiefe spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle bei der Vermehrung. Zusammenfassend lässt sich allerdings aus den Untersuchungen festhalten, dass verschiedene Faktoren mit der hohen Konzentration coliformer Bakterien zusammenhängen, das sind z. B. Umweltfaktoren (Wassertemperatur, Sauerstoff, pH-Wert, Chlorophyll), Metalle und Nährstoffe (Nitrat, Phosphat, Mangan), sowie mikrobiologische Parameter (HPC22, HPC36). Zudem konnte festgestellt werden, dass erhöhte Konzentrationen coliformer Bakterien insbesondere in warmen und trockenen Jahren gemessen werden konnten.

## 3.7 Laborversuche zur Vermehrung coliformer Bakterien

### 3.7.1 Einfluss der Wasserqualität auf die Vermehrung

Um die Wachstumsbedingungen der coliformen Bakterien im Wasserkörper zu testen, wurden verschiedene Wässer (Roh-, Rein- und Oberflächenwasser) der Talsperren R1 und R2 mit unterschiedlichen Stämmen coliformer Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Lelliottia* und *Serratia* angeimpft und die Vermehrung untersucht. Verwendet wurde jeweils das Wasser ohne Mischbiozönose. Einige der Versuche wurden in mehreren Ansätzen angesetzt, die Ergebnisse der Wachstumsrate sind daher getrennt in Tabelle 3.14 dargestellt, für die folgenden Abbildungen wurde dann jeweils der Mittelwert verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 dargestellt.

**Tabelle 3.14 Wachstumsraten der Laborversuche die im Mehrfachansatz getestet wurden.**

Stamm	Einheitlicher Parameter	Veränderter Parameter	Ansatz	Wachstumsrate (d <sup>-1</sup> )	Wachstumsrate (d <sup>-1</sup> ) (Mittelwert)
<i>E. asburiae</i> TZW02	Rohwasser R2 Steril 22 °C	09.09.2019	A	0,8	1,0 ± 0,3
		29.06.2020	B	1,0	
		10.08.2020	C	1,5	
		10.02.2021	D	0,8	
<i>L. amnigena</i> TZW12		09.09.2019	A	0,7	0,6 ± 0,3
		10.08.2020	B	0,3	
		10.02.2021	C	0,8	

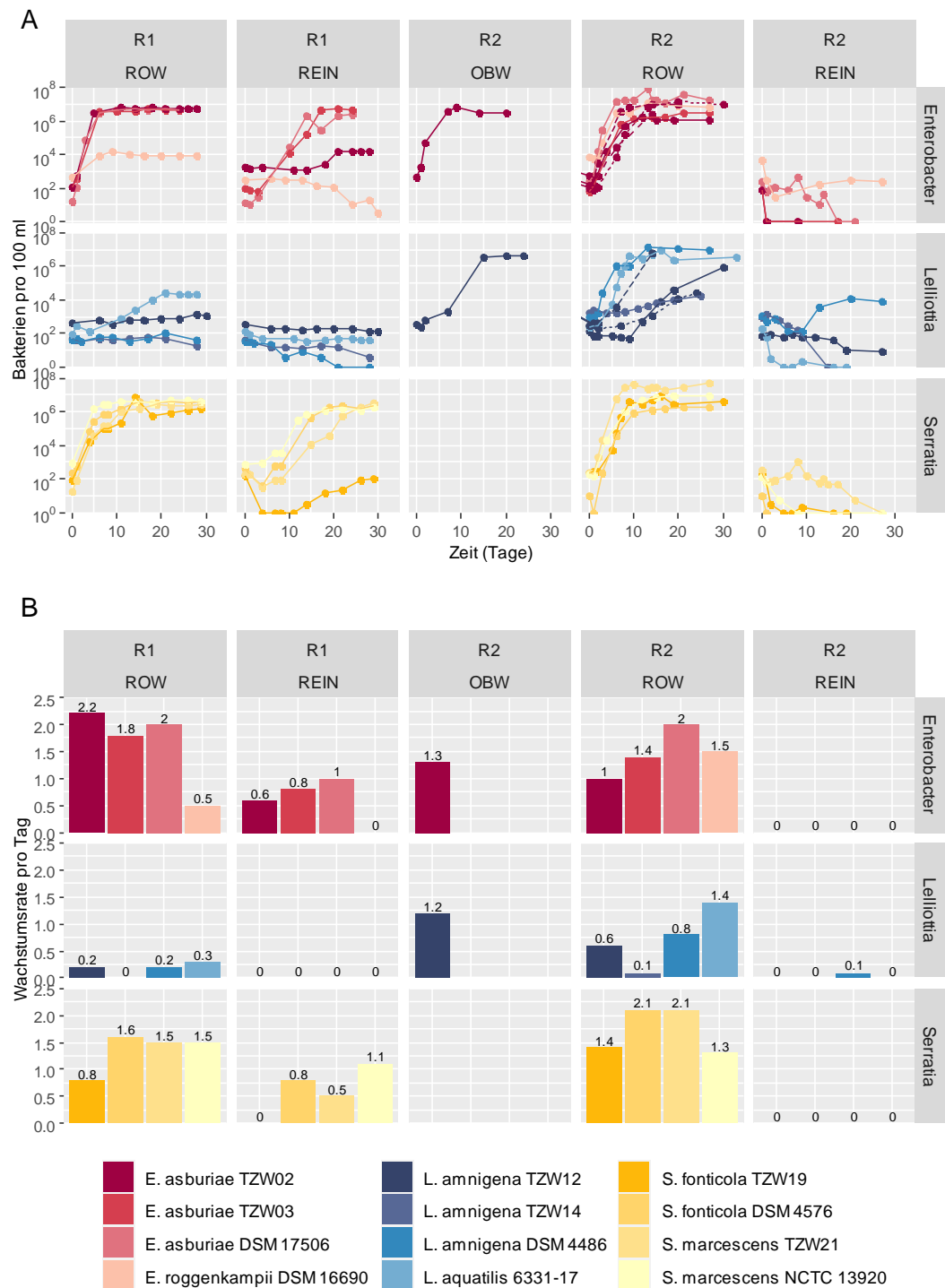
Insgesamt zeigten *Enterobacter* spp., sowie *Serratia* spp. im Rohwasser beider Talsperren eine gute Vermehrung. Die *Enterobacter asburiae*-Isolate aus Talsperren hatten in der Talsperre R1 eine höhere Wachstumsrate als in der Talsperre R2. So zeigte der aus eben jener Talsperre isolierte Stamm TZW02 in der Talsperre R1 mit 2,2 d<sup>-1</sup> eine höhere Wachstumsrate im Vergleich zur Talsperre R2 (1,0 d<sup>-1</sup>). Das Gegenteil zeigte sich bei dem fäkalen Stamm *Enterobacter roggkampii* DSM 16690.

*Lelliottia* spp. vermehrte sich allgemein schlechter als die beiden anderen Gattungen, zudem konnten diese im Rohwasser der Talsperre R1 kaum wachsen. Die höchste Wachstumsrate zeigte *Lelliottia aquatilis* 6331-17. Der Stamm, welcher in der Talsperre R2 zu erhöhten Konzentrationen führt (TZW12), zeigte eine niedrigere Wachstumsrate im aus dieser Talsperre entnommenen Rohwasser verglichen mit *Enterobacter* oder *Serratia*.

Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Rohwasser wurden auch Oberflächenwasser, sowie Reinwasser (vor der Abschlussdesinfektion) untersucht. Im Vergleich zum Rohwasser in R2 zeigten die beiden untersuchten Stämme *Enterobacter asburiae* TZW02 und *Lelliottia amnigena* TZW12 im Oberflächenwasser ein deutlich erhöhtes Wachstum. *Enterobacter* zeigte sein Maximum nach 9 Tagen mit 6,2 x 10<sup>6</sup> KBE/100 ml. Insbesondere für *Lelliottia* wurde in diesem Wasser die höchste Wachstumsrate mit 1,2 d<sup>-1</sup> gemessen, das Maximum wurde nach 24 Tagen mit 2,5 x 10<sup>4</sup> KBE/100 ml gemessen.

In aufbereitetem Wasser vor der Abschlussdesinfektion war das Wachstum der coliformen Bakterien sehr unterschiedlich, je nach Wasserwerk und Gattung. Im Reinwasser R2 konnte lediglich bei einem *Lelliottia amnigena* Stamm (DSM 4486) ein geringer Anstieg festgestellt werden, dieser war jedoch gefolgt von einem Abfall der Konzentration. Alle anderen untersuchten Stämme konnten sich in diesem aufbereiteten Reinwasser nicht vermehren.

Dagegen zeigten im Reinwasser R1 alle drei *Enterobacter asburiae* Stämme, sowie drei der *Serratia* Stämme ein Wachstum. Im Reinwasser R1 konnte kein *Lelliottia* Stamm wachsen, allerdings war deren Vermehrung bereits im Rohwasser verringert. Die Versuche zeigen somit deutlich den Einfluss der Nährstoffsituation auf das Vermehrungspotential coliformer Bakterien. Eine gute Nährstoffelimination im Rahmen der Trinkwasseraufbereitung kann das Vermehrungspotenzial coliformer Bakterien im Reinwasser erheblich verringern.



**Abbildung 3.36 Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose zur Untersuchung des Einflusses der Wasserqualität.**

(A) Wachstumskurve der Bakterien in Roh- (ROW), Rein- (REIN) und Oberflächenwasser (OBW), sowie (B) Wachstumsrate pro Tag. Die gestrichelten Linien beschreiben wiederholte Ansätze eines Versuches.

### 3.7.2 Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung

Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor der Vermehrung von Bakterien. In der Talsperre schwankt diese zwischen 3 und 24 °C und hat somit einen hohen Varianzbereich. Bei einem Vorversuch wurde daher der Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung der Bakterien auf Nährmedium untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Alle untersuchten Isolate zeigten bei 10 bis 38 °C eine Vermehrung auf dem Nähragar. Am schnellsten vermehrten sie sich bei 22 bis 38 °C, mit einer Vermehrung nach ein bis zwei Tagen. Nach ein bis fünf Tagen konnte auch bei 15 °C eine Vermehrung bei allen Isolaten festgestellt werden. Mit vier bis acht Tagen war die Vermehrung bei 10 °C deutlich langsamer.

Bei Temperaturen unter 10 °C zeigten nicht alle Isolate eine Vermehrung. Bei 5 °C wuchsen *Lelliottia* spp., sowie *Serratia fonticola*, mit einer Dauer nach 12 bis 19 Tagen. Lediglich ein Stamm von *Enterobacter asburiae* konnte sich bei dieser Temperatur vermehren. Stattdessen hatte diese Art bei Temperaturen über 38 °C einen Wachstumsvorteil. Sie wuchs bei 41 °C nach einem Tag, sowie einige Isolate bei 44 °C nach ein bis vier Tagen.

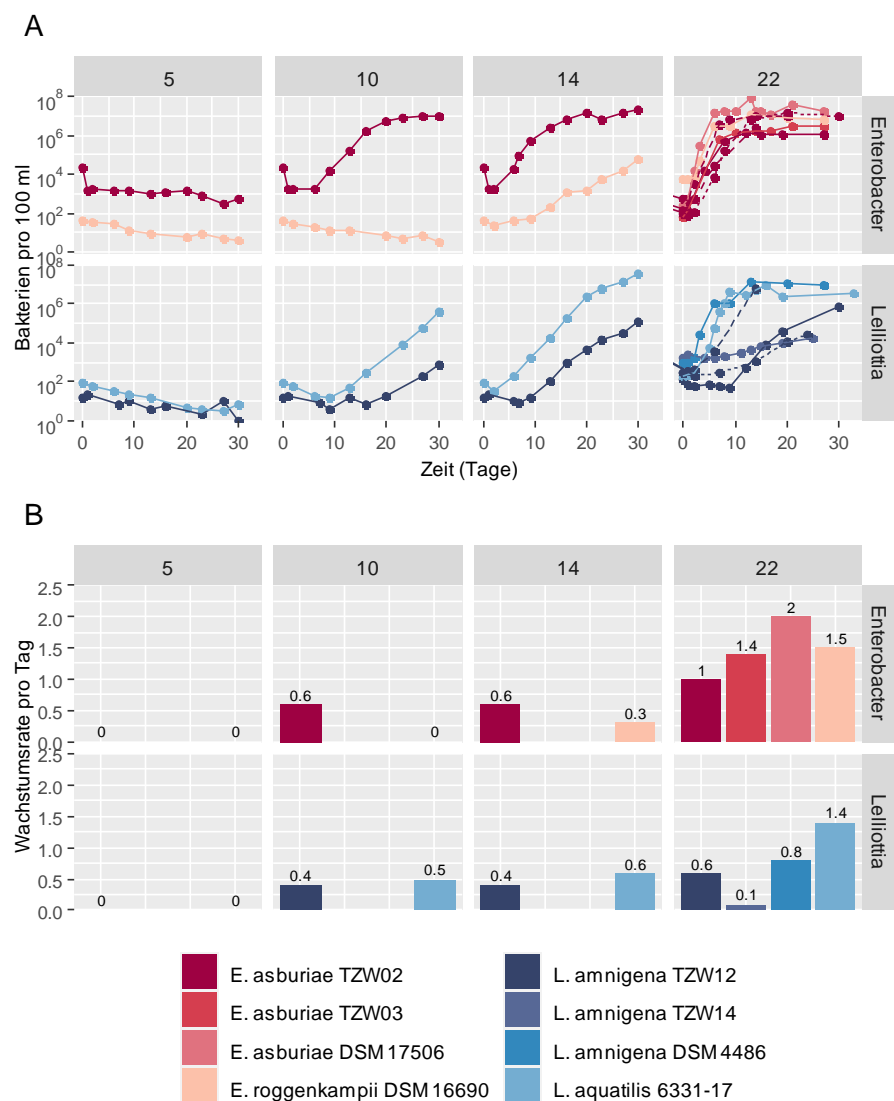
Insgesamt zeigt sich, dass alle drei Gattungen bei einem sehr breiten Spektrum an Temperaturen wachsen können. *Enterobacter* hat bei höheren Temperaturen einen Vorteil gegenüber *Lelliottia* und *Serratia*. Diese können dagegen auch bei 5 °C noch wachsen.

**Tabelle 3.15 Einfluss der Temperatur auf die Vermehrung coliformer Bakterien auf Nährmedium.**

Art	Stamm	Tage bis zum Wachstum bei ...							
		5 °C	10 °C	15 °C	22 °C	36 °C	38 °C	41 °C	44 °C
<i>E. asburiae</i>	TZW01	-	4	2	1	1	1	1	2
<i>E. asburiae</i>	TZW02	-	5	4	1	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	TZW03	12	4	4	1	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	TZW04	-	4	2	1	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	TZW06	-	4	2	1	1	1	1	2
<i>E. asburiae</i>	TZW07	-	4	2	1	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	TZW08	-	4	2	1	1	1	1	4
<i>E. asburiae</i>	TZW10	-	4	2	1	1	1	1	-
<i>E. asburiae</i>	DSM 17506	-	4	1	1	1	1	1	-
<i>E. cloacae</i>	DSM 30054	-	8	4	1	1	1	1	4
<i>E. roggenkampii</i>	DSM 16690	-	6	1	1	1	1	1	1
<i>L. amnigena</i>	TZW12	15	5	5	1	1	1	2	-
<i>L. amnigena</i>	TZW13	14	4	2	2	1	1	-	-
<i>L. amnigena</i>	TZW14	18	5	5	1	1	1	-	-
<i>L. amnigena</i>	TZW15	13	4	2	2	1	1	-	-
<i>L. amnigena</i>	DSM 4486	19	6	2	1	1	1	-	-
<i>L. aquatilis</i>	TZW17	-	4	4	2	1	1	-	-
<i>L. aquatilis</i>	6331-17	18	5	1	1	1	1	-	-
<i>S. fonticola</i>	DSM 4576	12	6	2	1	1	1	-	-
<i>S. fonticola</i>	TZW18	13	4	4	2	1	1	-	-
<i>S. fonticola</i>	TZW19	12	6	2	1	1	1	-	-
<i>S. marcescens</i>	TZW21	-	6	2	1	1	1	-	-
<i>S. marcescens</i>	NCTC 13920	-	6	2	1	1	1	2	-

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Temperatur auf die Vermehrung der Bakterien im Wasserkörper hat, wurden anschließend an den Vorversuch Standversuche bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Hierfür wurde das Rohwasser aus der Talsperre Kleine Kinzig (R2) autoklaviert und anschließend wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben mit Bakterien der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* angeimpft. Die Flaschen wurden daraufhin bei verschiedenen Temperaturen gelagert und die coliformen Bakterien regelmäßig quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.37 dargestellt.

Alle untersuchten Stämme zeigten bei 14 und 22 °C eine gute Vermehrung. Bei 10 °C konnte bei dem fäkalen Stamm *Enterobacter roggenkampii* DSM 16690 dagegen keine Vermehrung mehr nachgewiesen werden, anders als in den vorangegangenen Untersuchungen auf Nähragar. Alle anderen Stämme konnten sich ebenfalls bei 10 °C vermehren, wenn auch bei der niedrigen Temperatur etwas verzögert. Bei 5 °C konnte, anders als bei den Versuchen auf Nähragar, bei keinem der Stämme mehr eine Vermehrung festgestellt werden.



**Abbildung 3.37 Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose bei unterschiedlichen Wassertemperaturen.**

Gezeigt sind die Ergebnisse bei den Temperaturen 5, 10, 14 und 22 °C der Gattungen *Lelliottia* und *Enterobacter*. **(A)** Wachstumskurve der Bakterien in, sowie **(B)** die Wachstumsrate pro Tag. Die gestrichelten Linien beschreiben wiederholte Ansätze eines Versuches.

Im Vergleich mit *Enterobacter asburiae* zeigte die Gattung *Lelliottia* zudem meist eine verzögerte Vermehrung. Dies ist insofern interessant, da Wasser der Talsperre Kleinfeld verwendet wurde, in welcher *Lelliottia amnigena* und *Lelliottia aquatilis* zu erhöhten Konzentrationen führen, nicht aber *Enterobacter asburiae*. Dennoch scheint das Rohwasser auch für *Enterobacter* ein Vermehrungspotential zu bieten. Zudem ist auffallend, dass *Lelliottia* bei 5 °C im Rohwasser kein Wachstum mehr zeigt, auch wenn das Rohwasser der Talsperre zur Zeit der erhöhten Konzentration coliformer Bakterien genau diese Temperatur aufweist, und *Lelliottia* hier in hoher Konzentration nachgewiesen werden kann. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass je nach Ansatz die Vermehrung von *Lelliottia* sehr unterschiedlich war.

Die Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Wassertemperatur für die Vermehrung der coliformen Bakterien. Diese können bei 5 °C im Wasserkörper nicht wachsen, erst eine Temperatur von 10 °C war dafür ausreichend. Die Wassertemperatur in der Talsperre muss daher mindestens 10 °C betragen, damit eine Vermehrung stattfinden kann.

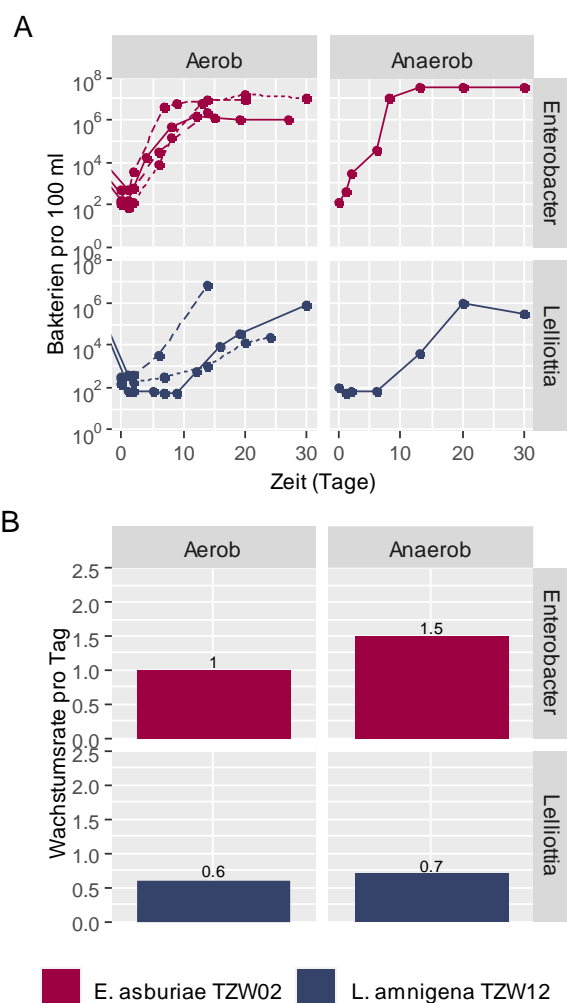
### 3.7.3 Einfluss von Sauerstoff auf die Vermehrung

Um den Einfluss des Sauerstoffs auf die Vermehrung der coliformen Bakterien zu testen, wurden Versuche unter aeroben, sowie anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur betrug bei allen Versuchen 22 °C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Der Sauerstoffgehalt wurde bei allen anaeroben Versuchen am Ende des Versuchs überprüft und betrug jeweils <0,5 mg/l.

Es zeigte sich, dass sich die Bakterien auch unter anaeroben Bedingungen nur in Abwesenheit der Mischbiozönose vermehren. Sofern die Proben vorher nicht sterilisiert wurden, war keine Vermehrung der angeimpften Stämme möglich (Daten nicht gezeigt).

Bei *Lelliottia amnigena* konnte außerdem kein signifikanter Unterschied zwischen der aeroben, sowie der anaeroben Probe festgestellt werden. Die Wachstumsrate war bei beiden Ansätzen ähnlich. Bei der anaeroben Probe wurde das Maximum nach 20 Tagen mit  $9,2 \times 10^5$  KBE/100 ml erreicht. *Enterobacter asburiae* zeigte dagegen eine erhöhte Wachstumsrate bei anaeroben Bedingungen im Vergleich zu aeroben Bedingungen. Das Maximum wurde zwar erst nach 30 Tagen erreicht, allerdings lagen die Werte bereits nach 8 Tagen bei  $>1,0 \times 10^7$  KBE/100 ml.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass sich *Enterobacter* unter anaeroben Bedingungen minimal besser vermehrt als unter aeroben, anders als *Lelliottia*, wo kein Unterschied festzustellen war. Allerdings konnte die Vermehrung nur unter sterilen Bedingungen erreicht werden, weswegen es sich bei dem Wachstum unter anaeroben Bedingungen vermutlich nicht um den Wachstumsvorteil gegenüber der natürlichen Biozönose handelt.



**Abbildung 3.38 Vermehrung coliformer Bakterien ohne Mischbiozönose unter aeroben und anaeroben Bedingungen.**

Gezeigt sind drei bis vier Ansätze unter aeroben Bedingungen, sowie je ein Ansatz unter anaeroben Bedingungen der beiden Stämme *E. asburiae* TZW02 und *L. amnigena* TZW12. Die gestrichelten Linien beschreiben zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholte Ansätze eines Versuches. **(A)** Wachstumskurve, sowie **(B)** Wachstumsrate pro Tag.

### 3.7.4 Einfluss von Nährstoffen auf die Vermehrung

Auffallend war, dass in keinem der vorangegangenen Versuche eine Vermehrung der coliformen Bakterien mit dem Vorhandensein der Mischbiozönose erreicht wurde (Daten hier nicht gezeigt). Dies war insofern ungewöhnlich, da es diesen in der natürlichen Umgebung der Talsperre durchaus möglich ist, auch in Anwesenheit der Begleitflora zu wachsen. Es stellte sich daher die Frage, wodurch die coliformen Bakterien einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu ihrer Begleitflora erhalten. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Experiment gezielt Nährstoffe in Form von Pepton zugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.39 dargestellt.

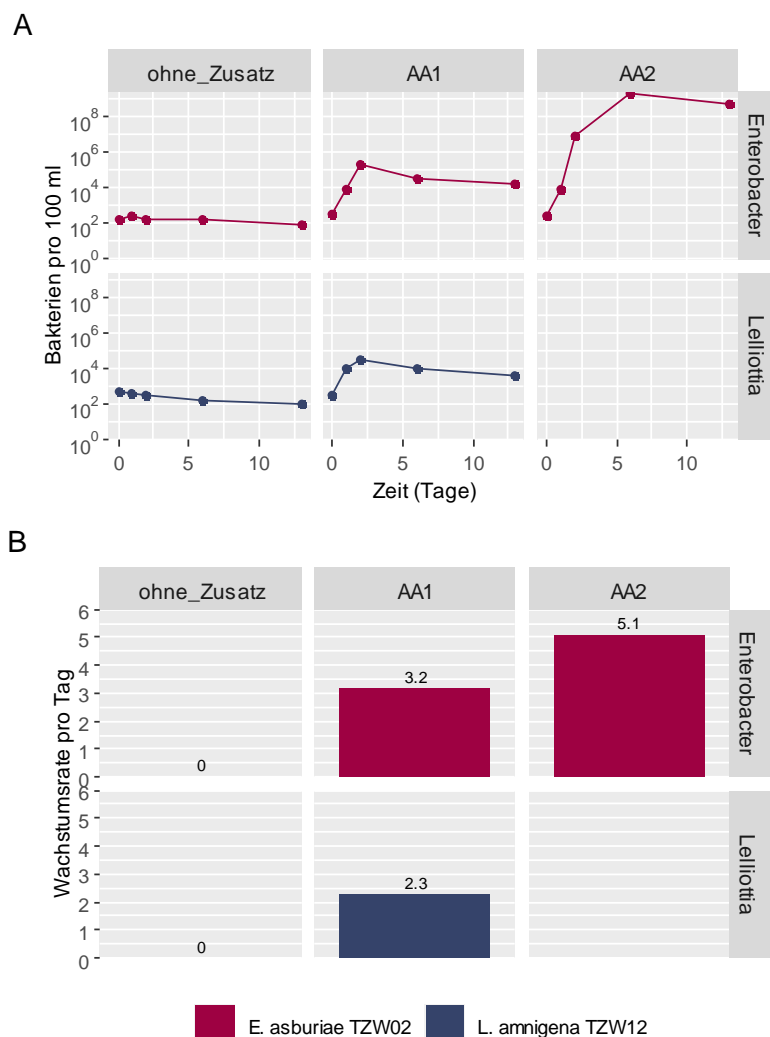
Tatsächlich konnten sich die coliformen Bakterien beim Zusatz von Pepton sogar in Anwesenheit der Mischbiozönose vermehren. Die Wachstumsrate war darüber hinaus sogar deutlich höher, als im sterilen Rohwasser ohne Zusatz von Nährstoffen (Kapitel 3.7.1).

Bei *Enterobacter asburiae* TZW02 konnte beim Zusatz von 5 mg/l Pepton das Maximum nach zwei Tagen mit  $2,0 \times 10^5$  KBE/100 ml erreicht werden. Die Wachstumsrate war mit  $3,2 \text{ d}^{-1}$  etwa



dreimal so hoch wie im sterilen Rohwasser ohne Nährstoffzugabe. Beim Zusatz von 500 mg/l Pepton wurde das Maximum von  $2,2 \times 10^9$  KBE/100 ml bereits nach sechs Tagen erreicht werden, was einer Zunahme um 7  $\log_{10}$ -Stufen entspricht. Die Wachstumsrate betrug  $5,1 \text{ d}^{-1}$ , was dem fünffachen dessen entspricht, was im sterilen Rohwasser ohne Nährstoffzugabe möglich war.

Bei *Lelliottia amnigena* TZW12 wurde nur der Zusatz von 5 mg/l Pepton untersucht. Das Maximum wurde hier ebenfalls nach zwei Tagen mit  $3,0 \times 10^4$  KBE/100 ml erreicht. Die Wachstumsrate betrug  $2,3 \text{ d}^{-1}$ , was dem vierfachen dessen entspricht, was im Rohwasser ohne Nährstoffzugabe möglich war.



**Abbildung 3.39 Vermehrung coliformer Bakterien mit Mischbiozönose mit dem Zusatz von Pepton.**

**(A)** Wachstumskurve der Bakterien mit oder ohne Zugabe von Pepton, sowie **(B)** die Wachstumsrate pro Tag. Pepton wurde an Tag 0, 1 und Tag 7 zudosiert.

AA1: 5 mg/l Pepton, AA2: 500 mg/l Pepton.

## 3.8 Gesamtgenomanalyse

### 3.8.1 Genomsequenzierung von coliformen Bakterien aus Talsperren und Seen

Ziel der Arbeit war es, anhand des Genoms mögliche Anpassungen der Bakterien an den oligotrophen Lebensraum zu finden, sowie die hygienische Relevanz zu untersuchen. Daher wurde während dieser Arbeit das Genom von 21 Isolaten coliformer Bakterien der Gattungen *Enterobacter*, *Lelliottia* und *Serratia* sequenziert, welche aus neun unterschiedlichen Talsperren oder Seen isoliert wurden (Kapitel 3.3). Die Genome wurden bereits publiziert (Reitter *et al.*, 2021a). Die Genomgröße und weitere Informationen können Tabelle 3.16 entnommen werden. Die Sequenzen wurden bei der NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) hochgeladen und finden sich zusammengefasst unter dem BioProjekt [PRJNA680915](#).

Im Durchschnitt waren die Genome von *Enterobacter asburiae* und *Lelliottia* spp. etwa 4771 kbp bzw. 4731 kbp groß, während die Genome von *Serratia* spp. mit durchschnittlich 5819 kbp deutlich größer waren. Der GC-Gehalt betrug für *Enterobacter asburiae* etwa 55,6 %, für *Lelliottia* spp. 52,8 %, für *Serratia* spp. etwa 55,1 %. Bei den kodierenden Sequenzen (CDS, engl. *coding DNA sequence*) waren es für *Enterobacter asburiae* 4524 CDSs, für *Lelliottia* spp. 4429 CDSs, für *Serratia* spp. erneut die meisten mit 5287 CDSs.

Insgesamt wurden in den 21 Genomen 8746 verschiedene Proteinfamilien gefunden, welche mit PATRIC zugeordnet werden konnten (Pangenom). Das Kerngenom, also der Teil des Genoms, welcher in allen Genomen der drei Gattungen gefunden werden konnte, beträgt 2355 Proteinfamilien. In allen *Enterobacter* spp. und *Lelliottia* spp., nicht aber in *Serratia* spp. konnten 383 Proteinfamilien gefunden werden. *Serratia* spp. teilt sich dagegen mit allen *Lelliottia* spp. lediglich 15, mit *Enterobacter* 50 Proteinfamilien. Die Gemeinsamkeiten zwischen *Enterobacter* spp. und *Lelliottia* spp. sind also wesentlich größer.

Da im Rahmen der vorangegangenen Ergebnisse festgestellt wurde, dass lediglich die Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* zu hohen Konzentrationen in Talsperren führen, wurde die Gesamtgenomanalyse der nächsten Kapitel lediglich von den 17 Stämmen dieser beiden Gattungen durchgeführt.

**Tabelle 3.16 Im Rahmen dieser Arbeit sequenzierte Genome.**

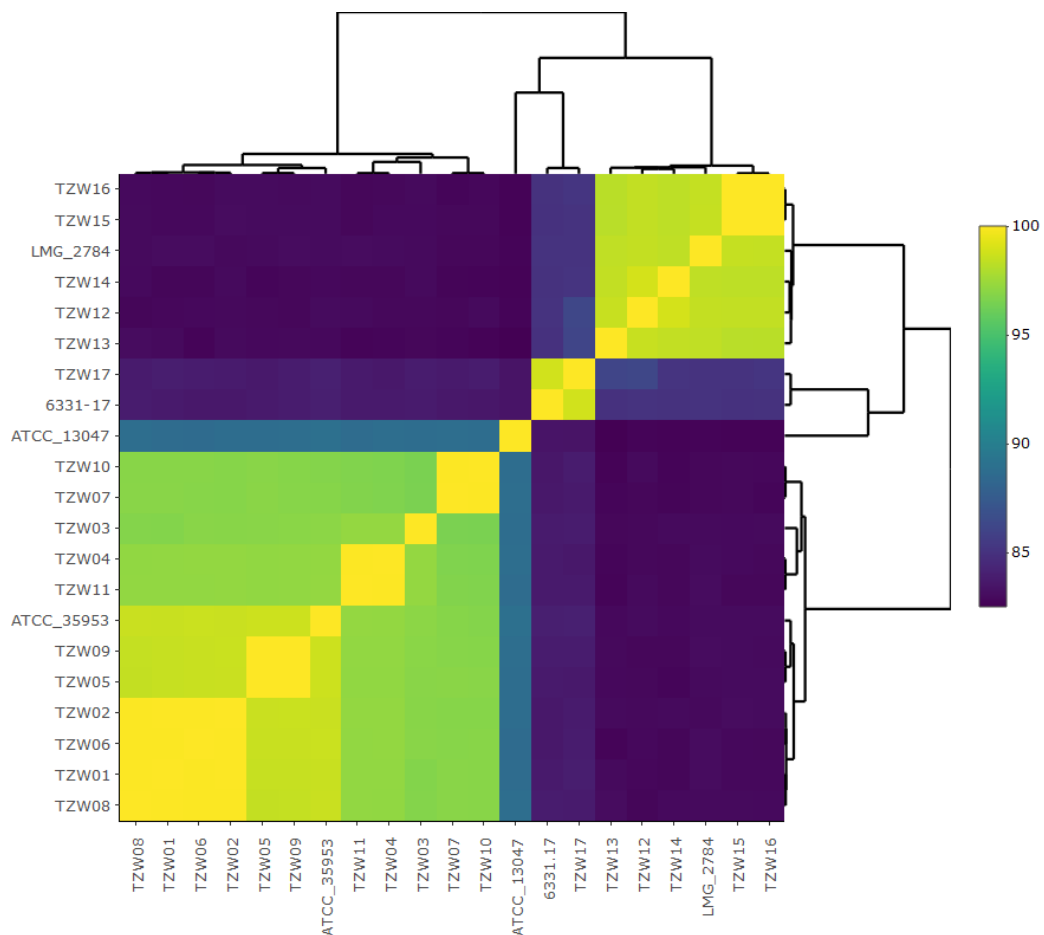
Spezies <sup>a</sup>	Stamm	Talsperre/See	Datum	Reads (bp)	Genomgröße (bp)	Contigs (n)	N <sub>50</sub> (bp)	G+C Gehalt (%)	CDSs (n)	WGS Accession No.	Raw read Accession No.
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW01	Klingenberg	09.10.2018	5.949.546	4.940.293	45	355.075	55,3	4782	<a href="#">JAEEAT000000000</a>	<a href="#">SRR14430924</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW02	Klingenberg	11.09.2018	5.088.393	4.661.786	26	454.690	55,7	4386	<a href="#">JAENNF000000000</a>	<a href="#">SRR14430923</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW03	Bodensee	02.11.2015	4.858.338	4.631.365	40	336.147	55,9	4284	<a href="#">JAENNE000000000</a>	<a href="#">SRR14430912</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW04	Wahnbach	19.07.2018	5.719.871	4.800.941	19	396.606	55,6	4589	<a href="#">JAENND000000000</a>	<a href="#">SRR14430910</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW05	Klingenberg	14.08.2014	5.527.150	4.747.844	40	231.680	55,6	4478	<a href="#">JAENNC000000000</a>	<a href="#">SRR14430909</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW06	Bodensee	02.11.2015	5.064.247	4.684.044	45	311.897	55,6	4417	<a href="#">JAENNB000000000</a>	<a href="#">SRR14430908</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW07	Bodensee	02.11.2015	5.322.862	4.795.094	25	502.428	55,7	4555	<a href="#">JAENNA000000000</a>	<a href="#">SRR14430907</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW08	Rappbode	28.08.2018	5.225.148	4.792.810	33	470.802	55,6	4547	<a href="#">JAENMZ000000000</a>	<a href="#">SRR14430906</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW09	Obersee (Rur)	06.08.2018	5.305.554	4.746.220	36	323.238	55,6	4468	<a href="#">JAENMY000000000</a>	<a href="#">SRR14430905</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW10	Breitenbach	21.10.2019	5.797.166	4.879.403	23	502.282	55,6	4669	<a href="#">JAENMX000000000</a>	<a href="#">SRR14430904</a>
<i>Enterobacter asburiae</i>	TZW11	Wahnbach	19.07.2018	5.071.083	4.803.492	19	396.606	55,6	4592	<a href="#">JAENMW000000000</a>	<a href="#">SRR14430922</a>
<i>Lelliottia amnigena</i>	TZW12	Kleine Kinzig	25.06.2018	6.333.162	4.694.183	26	415.957	52,5	4382	<a href="#">JAENMV000000000</a>	<a href="#">SRR14430921</a>
<i>Lelliottia amnigena</i>	TZW13	Kleine Kinzig	15.07.2019	5.906.285	4.830.285	26	337.333	52,5	4577	<a href="#">JAENMU000000000</a>	<a href="#">SRR14430920</a>
<i>Lelliottia amnigena</i>	TZW14	Klingenberg	23.05.2018	5.488.494	4.516.381	17	731.232	52,8	4198	<a href="#">JAENMT000000000</a>	<a href="#">SRR14430919</a>
<i>Lelliottia amnigena</i>	TZW15	Söse	30.10.2019	5.085.780	4.756.711	36	346.396	52,6	4473	<a href="#">JAENMS000000000</a>	<a href="#">SRR14430918</a>
<i>Lelliottia amnigena</i>	TZW16	Söse	28.10.2019	5.417.881	4.756.331	35	346.396	52,6	4472	<a href="#">JAENMR000000000</a>	<a href="#">SRR14430917</a>
<i>Lelliottia aquatilis</i>	TZW17	Kleine Kinzig	25.06.2018	5.684.773	4.835.026	27	233.298	53,8	4472	<a href="#">JAENMQ000000000</a>	<a href="#">SRR14430916</a>
<i>Serratia fonticola</i>	TZW18	Kleine Kinzig	18.03.2019	5.104.384	5.752.035	55	190.940	53,7	5178	<a href="#">JAENMP000000000</a>	<a href="#">SRR14430915</a>
<i>Serratia fonticola</i>	TZW19	Kleine Kinzig	18.03.2019	6.409.833	6.050.704	65	181.482	53,6	5437	<a href="#">JAENMO000000000</a>	<a href="#">SRR14430914</a>
<i>Serratia fonticola</i>	TZW20	Schönbrunn	06.05.2019	5.601.327	6.223.117	58	218.606	53,7	5590	<a href="#">JAENMN000000000</a>	<a href="#">SRR14430913</a>
<i>Serratia marcescens</i>	TZW21	Kleine Kinzig	18.03.2019	5.039.584	5.248.648	27	2.884.332	59,4	4942	<a href="#">JAENMM000000000</a>	<a href="#">SRR14430911</a>

<sup>a</sup> Die Stammidentifizierung basiert auf 1000 Einzelkopie-Genen, wobei das Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAXML) tool in der „codon tree pipeline“ in PATRIC verwendet wurde.

### 3.8.2 Taxonomische Analyse

Anschließend wurden die Genome der für die hohen Konzentrationen in Talsperren relevanten Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* weiter ausgewertet. Die taxonomische Einordnung von coliformen Bakterien auf Basis ihrer 16S rRNA ist schwierig (Brady *et al.*, 2013), und auch andere Methoden wie die MLSA, sowie MALDI-TOF sind nicht immer eindeutig (Kapitel 3). Aus diesem Grund wurde die durchschnittliche Nukleotidentität (ANI, engl. *average nucleotide identity*) berechnet, sowie eine phylogenetische Untersuchung mit PATRIC durchgeführt, um die Taxonomie der verwendeten Isolate eindeutig zu bestimmen.

Die ANI-Berechnung ist in Abbildung 3.40 dargestellt. Beträgt der ANI-Wert zwischen zwei Stämmen >95–96 % werden diese als eine bakterielle Spezies angesehen, für Subspezies liegt dieser bei >98 % (Richter & Rosselló-Móra, 2009; Sutton *et al.*, 2018). Im Fall von *Enterobacter asburiae* lag dieser bei mindestens 96,5 %, wobei sich verschiedene Cluster bildeten. Sechs der Stämme sind als gleiche Subspezies wie der Typ-Stamm ATCC 35953 anzusehen (ANI >98 %), während die anderen fünf sich davon leicht unterscheiden. Bei diesen handelt es sich um die Isolate der Wahnbach Talsperre, zwei Bodensee-Isolate, sowie das

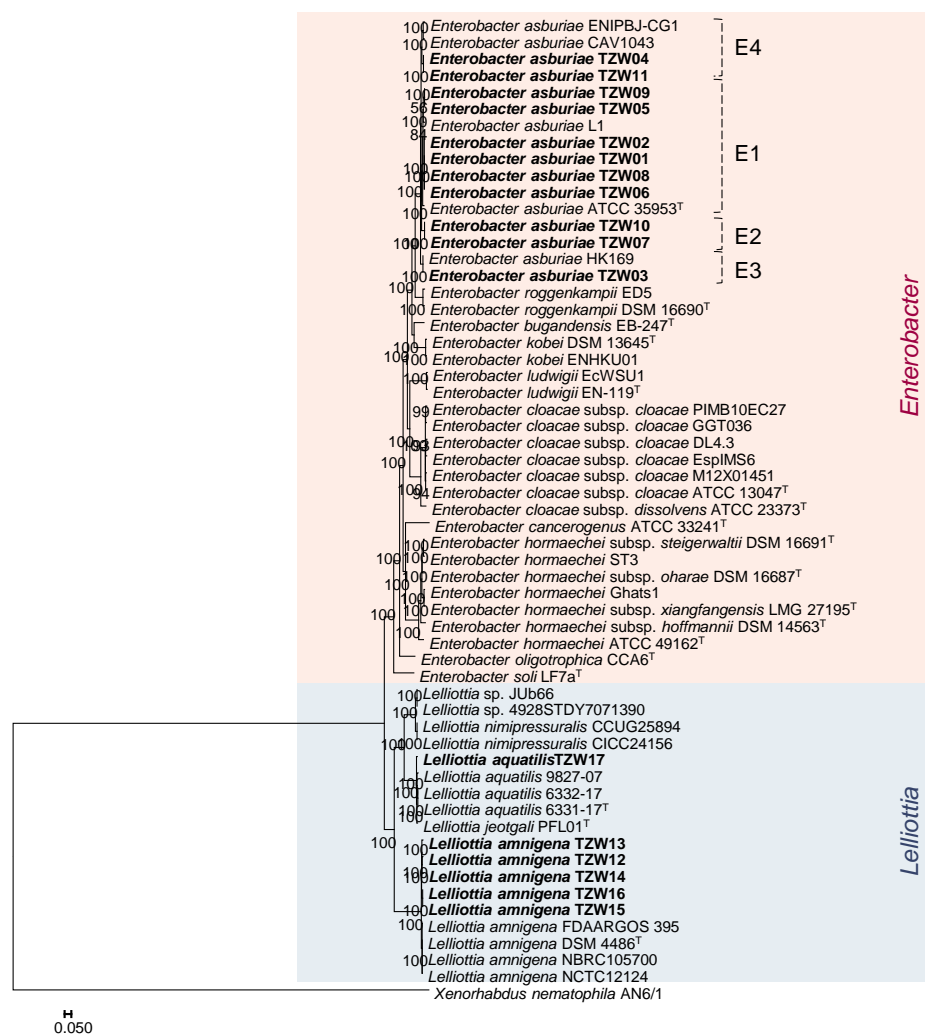


**Abbildung 3.40 Darstellung der durchschnittlichen Nukleotidentität (ANI) zwischen den sequenzierten Talsperren-Stämmen, sowie Referenzstämmen.**

Heatmap mit Dendrogramm der durchschnittlichen Nukleotidentität (%) zwischen den sequenzierten Stämmen und folgenden Referenzstämmen: *Enterobacter asburiae* ATCC 3595<sup>T</sup> (GCA\_001521715), *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047<sup>T</sup> (GCA\_000025565), *Lelliottia amnigena* LMG 2784<sup>T</sup> (GCA\_002553545) und *Lelliottia aquatilis* 6331-17<sup>T</sup> (GCA\_002923025). Ab einem ANI-Wert von >95 % kann von einer Art gesprochen werden, es wird also erkennbar, dass drei Arten sequenziert wurden. Zudem bilden sich innerhalb dieser Arten einzelne Cluster, besonders zwischen *Enterobacter asburiae* sind Unterschiede erkennbar.

Isolat aus der Breitenbach Talsperre. Bei *Lelliottia* spp. kann gut zwischen den beiden Arten *Lelliottia amnigena* und *Lelliottia aquatilis* unterschieden werden. Innerhalb von *Lelliottia amnigena* ist der ANI >98,1 % und somit höher als zwischen den Genomen von *Enterobacter asburiae*.

Die phylogenetische Untersuchung mit PATRIC nutzt vordefinierte Proteinfamilien (Davis *et al.*, 2016), aus denen für das Alignment 958 Gene in Einzelkopien verwendet wurden. Der Stammbaum ist in Abbildung 3.41 dargestellt. Hier sieht man deutlich, dass alle *Enterobacter*-Stämme als *Enterobacter asburiae* identifiziert werden, da diese nah verwandt zum Typ-Stamm ATCC 35953 sind. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen der MLSA, bei welcher der Stamm TZW04 nicht eindeutig dieser Art zugeordnet werden konnte und dagegen einen extra Zweig gemeinsam mit *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter roggenkampii* bildete (Kapitel 3, Kapitel 3.3). Auffällig ist, dass der Stamm TZW03 zu keinem anderen der Talsperren-Stämme besonders nah verwandt, stattdessen bildet er ein Cluster mit HK169, einem Stamm, der als pflanzenwachstumsfördernd und nematizid, also tödlich gegenüber pflanzenparasitische Nematoden, beschrieben wurde (Oh *et al.*, 2018). Bei den *Lelliottia* Stämmen sieht man zudem, dass TZW17 als *Lelliottia aquatilis* identifiziert wird, während die anderen fünf Stämme als *Lelliottia amnigena* identifiziert werden.

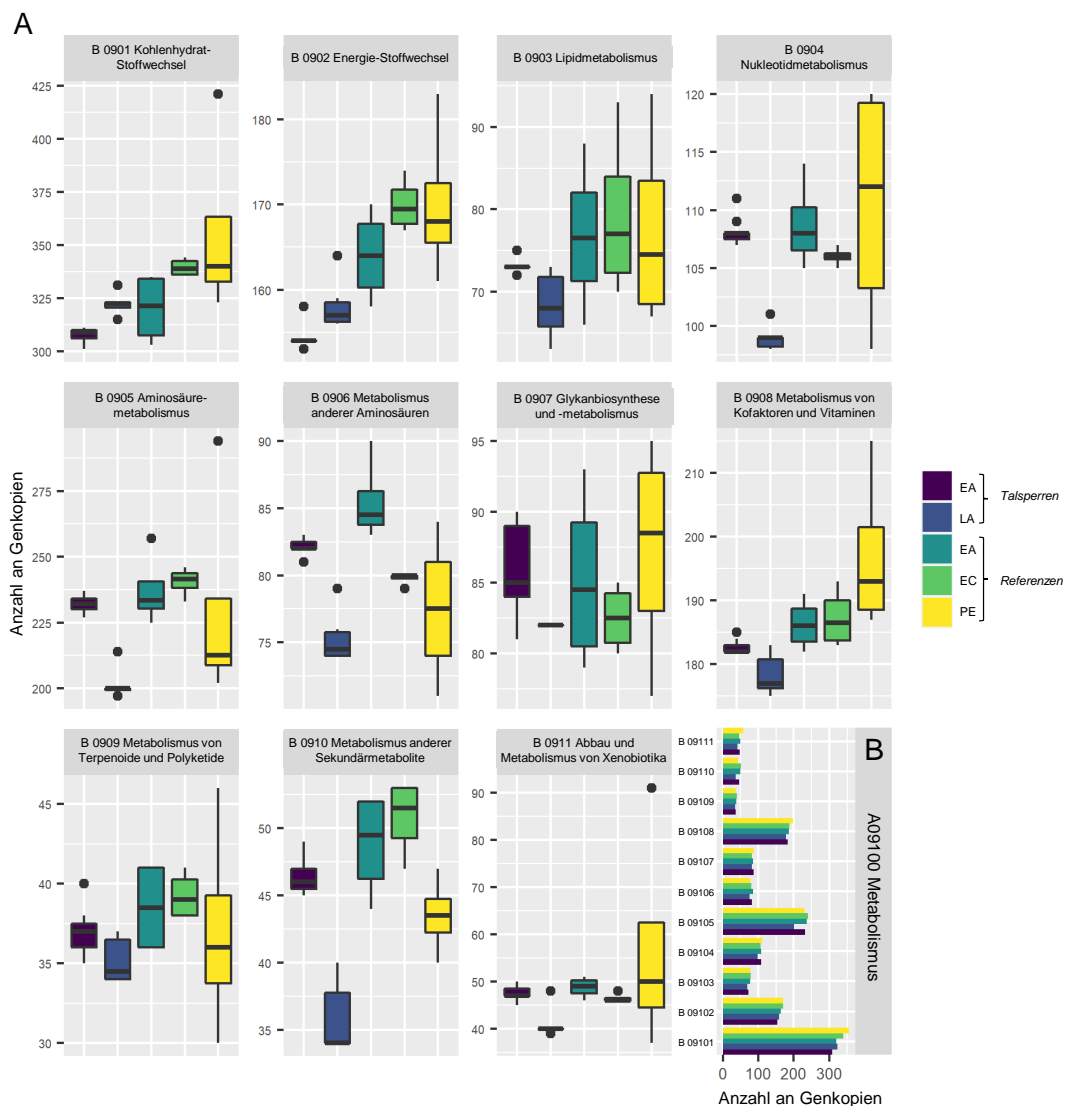


**Abbildung 3.41 Phylogenetische Analyse der Genome der *Enterobacter* und *Lelliottia* Stämme.** Für die phylogenetische Analyse wurde PATRIC verwendet, welches vordefinierte Proteinfamilien verwendet. Dieser Stammbaum wurde basierend auf 958 Genen berechnet. Als Outgroup wurde *Xenorhabdus nematophila* AN6/1 verwendet.

### 3.8.3 Stoffwechselwege von *Enterobacter* spp. und *Lelliottia* spp.

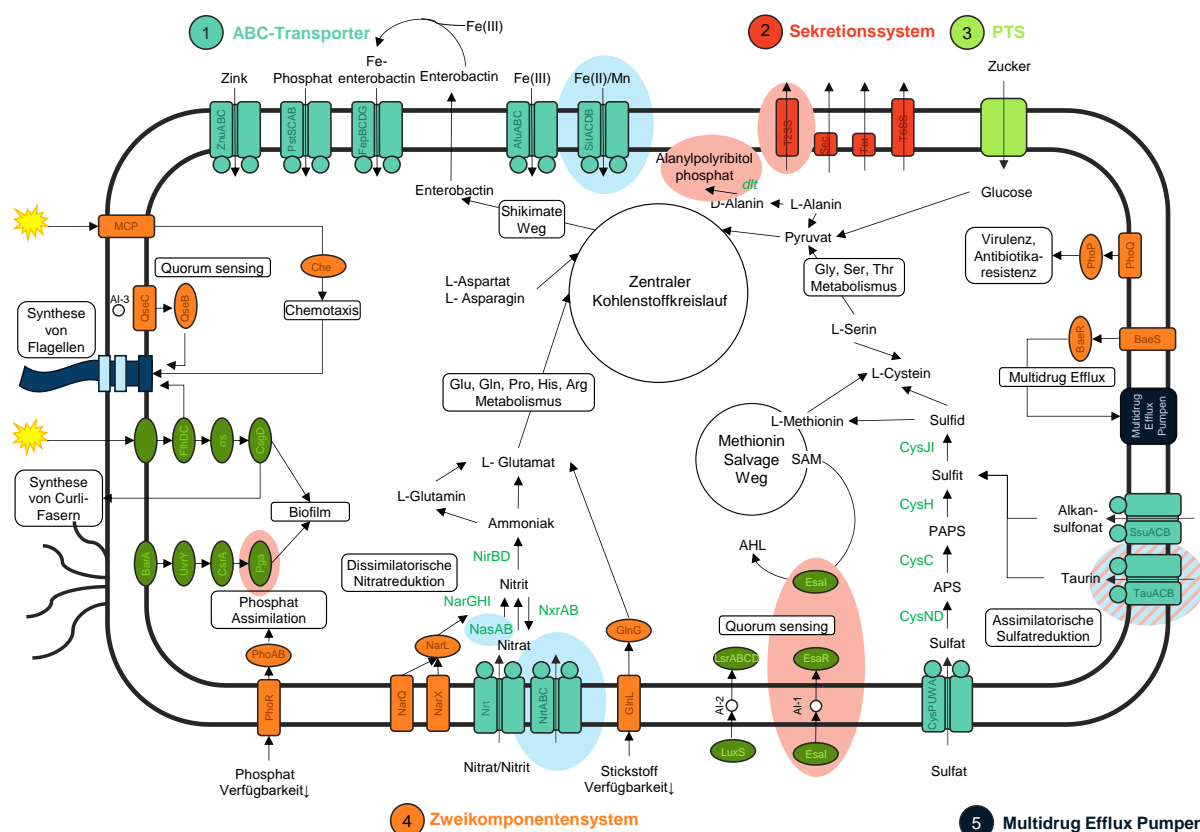
Die Stoffwechselwege der Bakterien wurden mithilfe von KEGG untersucht, um die Frage zu klären, warum die Bakterien in den Talsperren wachsen können und welche Vorteile sie im Vergleich zu anderen Bakterien haben. Hierfür wurden die Genome der aus Trinkwassertalsperren und Seen isolierten coliformen Bakterien der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* verwendet. Diese wurden dann mit teils klinischen und pathogenen Isolaten der Arten *Enterobacter asburiae* und *Enterobacter cloacae*, sowie der *Enterobacteriales*, verglichen. Es wurden keine *Lelliottia*-Stämme verwendet, da die beiden Gattungen eng miteinander verwandt sind und *Lelliottia* vor allem in der Umwelt vorkommt und zum Zeitpunkt der Genomanalyse keine vollständigen Genome klinisch isolierter Stämme verfügbar waren. Ein Überblick über die verwendeten Referenzgenome ist in Tabelle 2.21 zusammengestellt.

Eine Zusammenfassung über Anzahl der Genkopien der Stoffwechselwege ist in Abbildung 3.42 dargestellt. Unterschiede zwischen den talsperren-relevanten Isolaten der beiden



**Abbildung 3.42 Funktionelle Analyse der Stoffwechselwege mit Hilfe von KEGG.**

Anzahl der Genkopien der verschiedenen Stoffwechselwege mit der Benennung aus KEGG (A), sowie Überblick über „A09100 Metabolismus“ (B). EA = *Enterobacter asburiae*, EC = *Enterobacter cloacae*, LA = *Lelliottia amnigena/Lelliottia aquatilis*, PE = Pathogene *Enterobacteriales*.



**Abbildung 3.43 Überblick über die wichtigsten Stoffwechselwege in *Enterobacter* und *Lelliottia*.** Der Membrantransport verläuft über verschiedene Transporter, wie ABC-Transporter, Sekretionssystem, Phosphotransferasesystem (PTS), Zweikomponentensystem, sowie Effluxpumpen. Zudem sind die beiden Gattungen in der Lage zur dissimilatorischen Nitratreduktion, sowie assimilatorischen Sulfatreduktion. Einige Systeme sind zudem nur in einzelnen Gattungen vorhanden, diese sind mit hinterlegten Kreisen dargestellt, in den Farben Rot (*Enterobacter*) und Blau (*Lelliottia*).

Gattungen *Lelliottia* und *Enterobacter* zeigten sich in Bezug auf die Kohlenhydrat-Stoffwechselwege, bei welchem in *Lelliottia* mehr Gene gefunden wurden als in *Enterobacter* (322 bzw. 307 Genkopien). Dagegen wurden in *Enterobacter* mehr Gene in Bezug auf die Aminosäure-Stoffwechselwege gefunden (232 bzw. 201 Genkopien), sowie bei den Sekundärmetaboliten (46 bzw. 35 Genkopien). Im Vergleich mit Referenzgenomen der Gattung *Enterobacter* zeigten sich Unterschiede besonders im Hinblick auf den Energiemetabolismus. Im Vergleich mit den pathogenen *Enterobacteriales* zeigen sich Unterschiede im Besonderen in Bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel, Energiemetabolismus, sowie die Kofaktoren und Vitamine. Eine grafische Übersicht über die Stoffwechselwege ist in Abbildung 3.43 dargestellt, diese werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

### 3.8.3.1 Zentraler Kohlenstoff-Kreislauf

Eine Mehrzahl der Gene sind am zentralen Kohlenstoffstoffwechsel beteiligt, einschließlich Glykolyse, Pyruvat-Oxidation, Citratzyklus, Entner-Doudoroff-Weg,  $\alpha$ -5'-Phosphoribosyl-1'-pyrophosphat (PRPP)-Weg, Pentosephosphat-Weg und Glyoxylatzyklus (Abbildung 3.43).

Die Stämme sind zudem in der Lage, die folgenden Substanzen als Kohlenstoffquelle zu nutzen: Glucose, Fructose, Lactose, D-Mannose, D-Mannitol, D-Ribose, D-Galactose, D-Xylose, Saccharose, Cellobiose, Maltose und Trehalose. Einige Unterschiede zeigten sich zwischen den Gattungen. So war lediglich *Lelliottia* in der Lage, L-Rhamnose und Raffinose



zu verwerten, während nur *Enterobacter* in der Lage war, D-Sorbit zu verwerten. Einige Stämme, hauptsächlich *Enterobacter asburiae*, waren zudem in der Lage, Chitin zu verwerten.

Interessanterweise unterschied sich ein *Enterobacter asburiae* Stamm deutlich von allen anderen, nämlich TZW03. Dieser Stamm konnte Raffinose und L-Rhamnose verwerten, hat aber keine Chitinase, was im Kontrast zu der Beschreibung von Brenner *et al.* (1986) steht, wonach bei *Enterobacter asburiae* keine Verwertung von L-Rhamnose vorkommt.

Zudem besitzt *Lelliottia amnigena* eine Poly-D-Mannuronat-Lyase (*algL*), die für die Lysierung und Nutzung von Alginat als Kohlenstoffquelle erforderlich ist (Wong *et al.*, 2000). Außerdem verfügt *Lelliottia* über eine L-Lactat-Dehydrogenase (*ldh*), anders als *Enterobacter*.

### 3.8.3.2 Aminosäuren

Die KEGG-Analyse ergab, dass *Enterobacter* spp. mehr Gene besitzt, die mit dem Aminosäurestoffwechsel in Verbindung stehen (Abbildung 3.42). Es wurden Gene gefunden, die mit dem Abbau der Aminosäuren Alanin, Arginin, Aspartat, Asparagin, Cystein, Methionin, Serin, Glycin, Threonin, Glutamat, Glutamin, Prolin und Histidin assoziiert sind, was darauf hinweist, dass die Isolate diese Aminosäuren verwerten können (Abbildung 3.43). Zudem ist *Enterobacter asburiae*, anders als *Lelliottia* spp., in der Lage, Phenylalanin zu verwerten.

Glutamin stellt eine zentrale Eintrittsstelle für Ammoniak in den Stoffwechselweg von Bakterien darstellt (Michal, 1999). Hierfür bindet die Glutamin-Synthetase (*glnA*), die auch Glutamat-Ammoniak-Ligase genannt wird, Ammoniak an Glutamat, wodurch Glutamin entsteht. Auch mithilfe der Glutamat-Dehydrogenase (*gdhA*) kann Ammoniak auf Aminosäuren übertragen werden. Diese beiden Reaktionen kommen in allen Lebewesen vor. Die Glutamat-Synthase (*gltBD*) dient der Bildung von Glutamat aus Glutamin und Oxoglutarat. Die dafür zuständigen Gene wurden, zusammen mit den entsprechenden Transportern (*glnHPQ*, *gltIKJL*), in allen untersuchten Genomen gefunden. Glutamat wird zur Synthese weiterer Aminosäuren genutzt, wie Glycine, Alanin, Histidin, Tryptophan, indem die Aminogruppe auf andere Moleküle übertragen wird.

Zudem enthalten die Genome viele Genkopien, die am Transport von verzweigtkettigen Aminosäuren (*livKHMGF*) beteiligt sind, was laut Props *et al.* (2019) mit dem oligotrophen Lebensraum in Zusammenhang stehen könnte. Bei *Enterobacter asburiae* wurden im Durchschnitt 16 Genkopien gefunden, bei *Lelliottia* spp. waren es 11 Genkopien. Letzteres war vergleichbar mit *Enterobacter cloacae* (11 Genkopien). Im Gegensatz dazu enthalten die pathogenen *Enterobacterales* im Durchschnitt nur 6 Genkopien.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass sowohl *Enterobacter* spp. als auch *Lelliottia amnigena* pflanzenwachstumsfördernde Bakterien sind (El-Akhdar *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020; Oh *et al.*, 2018; Taghavi *et al.*, 2010). Die Produktion des Pflanzenhormons Indolelessigsäure (Auxin), ist ein Schlüsselweg für pflanzenwachstumsfördernde Bakterien (Spaepen *et al.*, 2007), der bereits bei *Enterobacter* spp. beschrieben wurde (Guo *et al.*, 2020). Tryptophan wird hierfür durch eine Aminotransferase in Indol-3-pyruvat umgewandelt, das dann durch die Indolpyruvat-Decarboxylase (*ipdC*) zu Indol-3-acetaldehyd decarboxyliert wird. Im letzten Schritt wird es durch Aldehyd-Dehydrogenase (*aldh*) zu Indolelessigsäure oxidiert. In der Tat enthalten die meisten talsperren-relevanten Genome die Schlüsselenzyme dieses Weges Indolpyruvat-Decarboxylase (*ipdC*) und Aldehyd-Dehydrogenase (*aldh*). Allen untersuchten Stämmen fehlten jedoch Gene für die Tryptophanase (*tnaA*), die den Abbau von Tryptophan



zu Indol katalysiert, der den ersten Schritt dieses Weges darstellt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Indolelessigsäure nicht produziert wird.

In *Enterobacter* wurden in Zusammenhang mit den Aminosäure-Stoffwechselwegen deutlich mehr Genkopien pro Isolat gefunden, verglichen mit *Lelliottia*. Diese stehen mit folgenden Stoffwechselwegen in Verbindung: D-Alanin-Metabolismus (*dltABCD*), Arginin-Metabolismus (*puuABCD*), Tyrosin-Metabolismus (*hpaBCDEFGHI*) und Phenylalanin-Metabolismus (*paaABCDEFGHIJK*, *paaZ*).

So ist *Enterobacter* in der Lage, Phenylacetat abzubauen (*paaABCDEFGHIJK*, *paaZ*), welches aus Phenylalanin entsteht. Phenylacetat, auch Phenylelessigsäure (PAA) genannt, ist ein weiteres Mitglied der Auxin-Klasse der Phytohormone, welches ebenfalls als Pflanzen- und Algenwachstumsförderer dient (Cook, 2019; Teufel *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass *Enterobacter* dieses produzieren kann (Slininger *et al.*, 2004).

Zudem wurden in allen *Enterobacter asburiae*-Stämmen, nicht aber in *Lelliottia* oder *Enterobacter cloacae*, Homologe der vor allem aus grampositiven Bakterien bekannten antimikrobiellen Peptidresistenzgene (*dltABCD*) nachgewiesen.

### 3.8.3.3 Stickstoffkreislauf

Stickstoff ist ein wesentlicher Nährstoff für das Überleben von Bakterien (Korajkic *et al.*, 2019) und kommt in der Umwelt in Form von Ammoniak, Nitrit, Nitrat und gelöstem organischem Stickstoff, wie Aminosäuren, vor (Wetzel, 2001). In oligotrophen Seen sind vor allem Nitrat und gelöster organischer Stickstoff die Hauptquellen.

Die Reduktion von Nitrat zu Ammoniak geschieht im Rahmen der dissimilatorischen Nitratreduktion, zu der alle talsperren-relevanten Stämme fähig waren (Abbildung 3.43). Sie enthielten Gene für den Nitrat-/Nitrit-Transporter (*narK*), der für den Transport von Nitrat in die Zelle zuständig ist, die Nitratreduktase/Nitritoxidoreduktase (*narGHI*), die Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) reduziert und die Nitritreduktase (*nirBD*), zur weiteren Reduktion zu Ammoniak ( $\text{NH}_4^+$ ). Letzteres kann dann für den Glutamin- und Glutamat-Stoffwechselweg verwendet werden, der im vorherigen Kapitel bereits genauer beschrieben wurde.

Darüber hinaus enthielten einige Stämme, besonders *L. amnigena*, auch *nasA*, ein Gen, das für eine Untereinheit der assimilatorischen Nitratreduktase NasAB kodiert. Dieselben Stämme enthielten Gene für das Nitrat/Nitrit-Transportsystem (*nrtABC*). Dieses stickstoffregulierende System (Ntr) wird unter stickstoffarmen Bedingungen aktiviert, um alternative Stickstoffquellen zu nutzen (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Dies stellt also einen Vorteil in stickstoffarmen Umgebungen dar, den diese Stämme im Vergleich zu den anderen besitzen.

### 3.8.3.4 Phosphatstoffwechsel

Phosphat ist ein weiterer essenzieller Nährstoff, der für das Wachstum von Bakterien notwendig und in aquatischen Umgebungen begrenzt ist (Korajkic *et al.*, 2019). Um Phosphat aus der Umwelt in die Zelle zu transportieren, enthalten die talsperren-relevanten Isolate Gene für mehrere Phosphattransporter (*pit*, *pstSCAB*) (Abbildung 3.43). Darüber hinaus wurden in *Enterobacter asburiae* und *Lelliottia* spp. Gene für das Zweikomponentensystem gefunden, das an der Reaktion auf Phosphatmangel beteiligt ist (*phoRB*).

Zudem wurde *phoA* nachgewiesen, ein Gen, das für die alkalische Phosphatase zur Phosphatassimilation kodiert. Dieses Gen fand sich dagegen nicht in *Enterobacter cloacae*.

Alkalische Phosphatase ist besonders in Umgebungen mit niedrigem Phosphorgehalt wichtig, da diese Enzyme ortho-Phosphat – die bevorzugte Phosphatform für Mikroorganismen – aus gelöstem organischem Phosphat freisetzen kann (Zhang *et al.*, 2020).

Polyphosphat hat unter Nährstoffbeschränkungen verschiedene Funktionen, z. B. dient es als Phosphatspeicher (Temperton *et al.*, 2011). An diesem Stoffwechsel sind die *ppk*-Gene beteiligt, die in allen untersuchten Genomen zu finden waren. Die talsperren-relevanten Stämme sind daher gut an phosphatarme Umgebungen angepasst.

### 3.8.3.5 Schwefelkreislauf

Schwefel ist essentiell für den Aminosäurestoffwechselweg, da er ein Hauptbestandteil von Serin, Cystein und Methionin ist (Korajkic *et al.*, 2019), außerdem wird er in Cofaktoren benötigt. Schwefel kann in Form von Sulfat, Sulfit oder schwefelhaltigen organischen Verbindungen wie Aminosäuren vorkommen. Im Süßwasser werden durchschnittlich 3,7 ppm Schwefel gefunden, und somit etwa 30 mal weniger als im Meerwasser oder Boden (Sekowska *et al.*, 2000). In natürlichen Gewässern liegen die Sulfatkonzentrationen zwischen 5–30 mg/l (Wetzel, 2001).

Alle Stämme waren zur assimilatorischen Sulfatreduktion fähig (Abbildung 3.43). Die Aufnahme von Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) in die Zelle wird durch das ABC-Sulfat/Thiosulfat-Transportsystem CysPUWA vermittelt. Intrazelluläres Sulfat wird dann durch den assimilatorischen Sulfatreduktionsweg zu Adenosin-5'-P-Phosphosulfat (APS), 3'-P-Phosphoadenosin-5'-P-Phosphosulfat (PAPS), Sulfit ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) und Sulfid ( $\text{S}_2$ ) reduziert über die Sulfat-Adenylyltransferase CysND, die Adenylylsulfat-Kinase CysC, die Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reduktase CysH und die Sulfit-Reduktase CysJI (gesteuert durch das *cys*-Operon) (Sekowska *et al.*, 2000). Von hier aus wird die Übertragung von Sulfid auf Cystein vermittelt, da die Aminosäuren Cystein, Serin und Methionin auf diesem Stoffwechselweg beruhen. Dieser Stoffwechselweg wurde bei allen untersuchten Stämmen vollständig nachgewiesen.

Unter Sulfatmangel-Bedingungen synthetisieren die Bakterien spezielle Gene, die es ihnen ermöglichen, alternative Schwefelquellen für ihr Wachstum zu nutzen (Kertesz, 1999), wie Taurin (*tauABCD*) und Alkansulfonat (*ssuEADCB*). Beide Substanzen können intrazellulär zu Sulfit synthetisiert werden. Die Gene für den Transport von Alkansulfonat wurden in allen talsperren-relevanten Isolaten gefunden. Die Gene für den Transport von Taurin nur in einigen Stämmen, davon allen *Enterobacter asburiae*. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Bakterien gut an Sulfatlimitierung angepasst sind.

### 3.8.3.6 Eisen- und Manganstoffwechsel

Für Bakterien ist Eisen ein essenzielles Element, das Bakterienwachstum begrenzt (Andrés-Barrao *et al.*, 2017) und in oligotrophen Seen selten ist (Wetzel, 2001). Aus diesem Grund haben Bakterien Mechanismen entwickelt, um damit umzugehen, wie Eisentransporter und Siderophore (Taghavi *et al.*, 2015).

In den Genomen fanden sich Eisen- (*afuABC*, *feoABC*, *thuDBC*, *efeUO*, *fieF*) sowie Enterobactin-Transporter (*entS*, *fepABCDG*). Außerdem waren Gene für die Enterobactin-Synthetase (*entD*, *entF*) und die Eisen-Enterobactin-Esterase (*fes*) vorhanden (Abbildung 3.43). Der Mangan-/Eisen-Transporter (*sitABCD*) wurde nur in *Lelliottia*-Genomen gefunden. Gene für die Aerobactin-Synthese (*iucABCD*) waren dagegen nur in *Enterobacter*-Genomen vorhanden.

### 3.8.3.7 Transporter und Signaltransduktion

In nährstoffarmen Umgebungen ist es von entscheidender Bedeutung, die vorhandenen Nährstoffe effizient zu nutzen, sowie schneller als die Konkurrenz zu sein, weshalb Transporter mit hoher Affinität wichtig sind, zum Beispiel für stickstoffhaltige Verbindungen wie Aminosäuren (Pernthaler, 2017; Sowell *et al.*, 2009).

Die Stämme enthalten eine große Variation an Transportern zum Austausch von Nährstoffen, was typisch ist für Bakterien, in sich schnell verändernden oder vielfältigen Umgebungen (Andrés-Barrao *et al.*, 2017). Insgesamt wurden 542 Gene als Transporter identifiziert (Daten nicht gezeigt). Sie sind unter anderem an der Aufnahme von Metallen (Cadmium, Kobalt, Eisen, Magnesium, Mangan, Molybdat, Nickel, Kalium, Silber, Zink), Nährstoffen (Sulfat, Nitrat, Phosphat), Polyaminen (Spermidin/Putrescin), Zuckern (Arabinose, Glucose, Maltose, Saccharose, Mannose, Fructose, Ribose), Lipiden, Aminosäuren, Peptiden und dem Quorum sensing Autoinducer 2 beteiligt (Abbildung 3.43). Unterschiede zwischen den beiden Gattungen wurden bei den Genen für die Transporter von Oligogalacturoniden (*togABMN*), Rhamnose (*rhaSPQT*), Nickel (*nikABCDE*), Galactosamin (*agaBCD*) und Mangan/Eisen (*sitABCD*) festgestellt, die nur in *Lelliottia* spp. vorkamen, während Gene für den Transport von Inositol (*iatAP/ibpA*) und Glucitol/Sorbitol (*srIABE*) nur in den aus talsperren-relevanten *Enterobacter* spp. vorkamen, zusätzlich zu den in den vorherigen Abschnitten genannten Transportern.

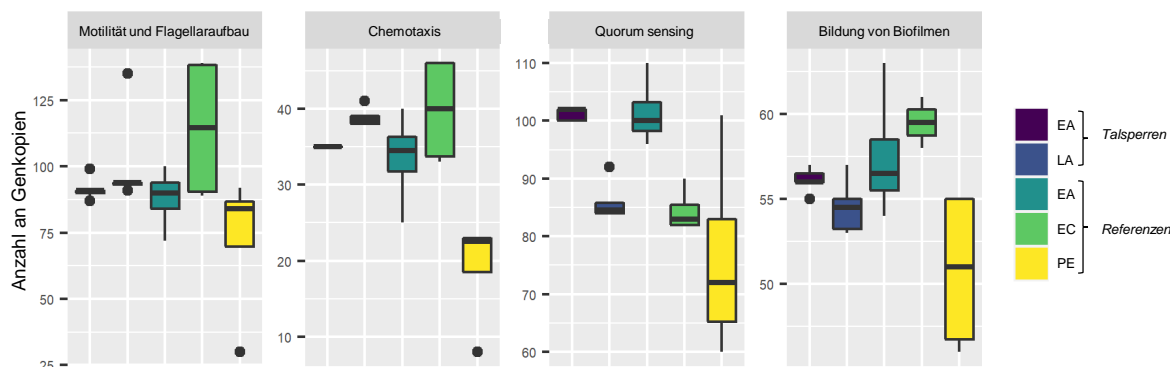
Zweikomponentensysteme (TSC, engl. *two component systems*) sind Signaltransduktionswege, die es Bakterien ermöglichen, Veränderungen in ihrer Umgebung wahrzunehmen und darauf zu reagieren (Andrés-Barrao *et al.*, 2017). Sie bestehen aus einer Sensor-Histidin-Kinase und einem Reaktionsregulator. In den talsperren-relevanten Stämmen wurden 151 Gene gefunden, die mit TSC assoziiert sind (Daten nicht gezeigt). Sie erkennen Metalle (Kupfer, Eisen, Magnesium, Silber, Kalium), Nährstoffe (Phosphat, Nitrat/Nitrit) oder Zucker (Glucose). Zudem helfen sie, auf Umweltveränderungen zu reagieren, wie auf die Limitierung von Phosphat (PhoRB) und Stickstoff (GlnLG). Auffallend war, dass das Zweikomponentensystem FusKR nur in *Lelliottia* spp. gefunden werden konnte, welches an der Erkennung und Aufnahme von Fucose beteiligt ist.

### 3.8.4 Temperaturadaption

Bakterien müssen auf Temperaturänderungen reagieren können, indem sie zentrale zelluläre Prozesse verändern, z. B. die Membranfluidität und die Stabilität von Nukleinsäuren (Barria *et al.*, 2013). Es fanden sich bei allen Isolaten das Gen, das für das Kälteschockprotein (*cspA*) kodiert, mit durchschnittlich 6 Genkopien, und somit mehr als in *Enterobacter cloacae* mit nur 4 Genkopien. Darüber hinaus enthalten sie Gene, die für Kälteanpassungsproteine (*lpxP*, *rpoS*, *mrn*, *pnp*, *dnaA*, *hns*, *infB*) kodieren. So fanden sich bei allen Isolaten Gene, die bei der Temperaturanpassung eine Rolle spielen, indem sie bei niedrigen Temperaturen hochreguliert werden, die Membranfluidität erhöhen (*lpxP*), die Zuckersynthese wie Trehalose zum Schutz vor dem Einfrieren induzieren, als Kälteschockproteine (*cspA*) dienen oder an der Replikation (*dnaA*, *hns*), Transkription (*rpoS*), Translation (*infB*) sowie am RNA-Stoffwechsel (*mrn*, *pnp*) beteiligt sind (Barria *et al.*, 2013; Briani *et al.*, 2016; Kandror *et al.*, 2002; Shivaji & Prakash, 2010; White-Ziegler & Davis, 2009; Zhang *et al.*, 2018). Zudem wurde das Gen, das für den temperaturabhängigen positiven Regulator der Motilität (*hosA*) kodiert, in allen außer den *Lelliottia*-Genomen gefunden.

### 3.8.5 Kollektives Verhalten und Motilität

Leben in oligotrophen Umgebungen führt laut Props *et al.* (2019) zur Genexpansion in den Bereichen Motilität und Umweltsensorik. In den Talsperren-Stämmen wurden verschiedene Gene gefunden, die mit kollektivem Verhalten und Motilität assoziiert sind, wie Chemotaxis, Flagellaraufbau, Quorum sensing und Biofilmbildung. Die Anzahl der Genkopien bei *Enterobacter* spp. und *Lelliottia* spp. war dabei deutlich höher als bei den pathogenen *Enterobacteriales* (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44 Anzahl der Genkopien im Bereich kollektives Verhalten und Motilität.**

Anzahl der Genkopien, die mit Motilität und Flagellen, Chemotaxis, Quorum sensing oder Biofilmen in Verbindung stehen. EA = *Enterobacter asburiae*, EC = *Enterobacter cloacae*, LA = *Lelliottia amnigena/Lelliottia aquatilis*, PE = Pathogene *Enterobacteriales*.

#### 3.8.5.1 Motilität und Flagellen

In den Talsperren-Stämmen wurden 68 verschiedene Gene, die mit dem Flagellum und somit der Motilität in Verbindung stehen, wie das *fli*-, *flg*-, *flh*- und *mot*-Operon. Die Gene für den Basalkörper und den Haken waren in allen Genomen vorhanden (*fliEFGHIJKLMNOPQR*, *flhEAB*, *flgABCDEFGHJIJ*, *flgKL*), ebenso wie für das Filament (*fliC*, *fliDST*), den Stator (*motAB*), den Regulator (*flgMN*, *flgYZ*, *flhCD*) und den RNA-Polymerase-Sigmafaktor (*fliA*, *rpoD*, *rpoN*). Darüber hinaus wurde in *Lelliottia aquatilis* TZW17 ein Gen für den Reaktionsregulator des Zweikomponentensystems (*fliC*) gefunden. Neben dem Flagellum wurden auch Gene gefunden, die mit Fimbrien assoziiert sind (*fimACDFGHI*).

#### 3.8.5.2 Chemotaxis

Die Chemotaxis dient als Reaktion auf eine sich schnell verändernde Umgebung und dient der gezielten Navigation zu einem Ziel (Wadhams & Armitage, 2004). Bei den talsperrenrelevanten Stämmen konnten 22 Gene, die mit Chemotaxis in Verbindung stehen identifiziert werden. An der Chemotaxis beteiligt sind die Che-Proteine, von denen sechs aus *E. coli* bekannt sind (CheA, CheB, CheR, CheW, CheY und CheZ). Darüber hinaus ist ein weiteres Protein bekannt (CheV), welches in *Enterobacter*, vorkommt und vermutlich als Phosphatspeicher dient (Ortega *et al.*, 2016). Die Gene für dieses Chemotaxis-Operon (*cheABRVWYZ*) wurden in allen Genomen gefunden (Abbildung 3.43).

Veränderungen in der Umwelt können durch Transmembran-Chemorezeptoren wie die Methyl-akzeptierenden Chemorezeptorproteine (MCPs, engl. *methyl-accepting chemotaxis proteins*) wahrgenommen werden (Wadhams & Armitage, 2004). In *E. coli* sind vier MCPs (Tsr, Tar, Trg und Tap) und ein MCP-ähnliches (Aer) Protein bekannt, die Chemotaxis in Richtung verschiedener Verbindungen wie Aminosäuren, Zuckern, Lipiden, Metallen, Sauerstoff und Quorum sensing-Autoinducern vermitteln (Ortega *et al.*, 2016; Wadhams &

Armitage, 2004). Gene für alle diese Rezeptoren wurden in allen talsperren-relevanten Genomen gefunden (*mcp*, *tsr*, *tar*, *trg*, *tap*, *aer*).

### 3.8.5.3 Quorum sensing

Quorum sensing beschreibt das Verhalten von Bakterien, abhängig von der Zelldichte miteinander zu kommunizieren und schnell auf Veränderungen in der Umwelt zu reagieren (Mukherjee & Bassler, 2019; Papenfort & Bassler, 2016). Dieses System umfasst Signalmoleküle, die als Autoinduktoren bezeichnet werden und auf deren Konzentrationsänderung Bakterien reagieren können (Papenfort & Bassler, 2016). Die häufigste Klasse von Autoinduktoren (AI-1) im Quorum sensing-System gramnegativer Bakterien sind die Acyl-Homoserin-Laktone (AHLs, engl. *acyl-homoserine lactones*).

In den Talsperren-Genomen fanden sich 68 verschiedene Gene, die für Quorum sensing-Systeme kodieren, darunter *sdiA*, *luxD*, *lsr* und *qseBC*, die in allen Genomen vorhanden waren. Der Quorum sensing *E. coli*-Regulator (*qseBC*) kontrolliert Gene, die an der Motilität beteiligt sind, wie die Bildung von Flagellen (Sperandio *et al.*, 2002) und erkennt den Autoinduktor 3 (AI-3). LuxS ist am Stoffwechsel von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) beteiligt und produziert ein ein Derivat des Autoinduktors 2 (AI-2) (Papenfort & Bassler, 2016; Walters & Sperandio, 2006). Lsr ist ebenfalls ein AI-2-Detektorsystem. Ein Rezeptor für AHL ist SdiA aus *E. coli*, der die Möglichkeit hat, die Multidrug-Efflux-Pumpe AcrAB zu regulieren (Weston *et al.*, 2018). Zusätzlich war ein auf AHL basierendes System (*expRI/esaRI*) in allen *Enterobacter asburiae*-Stämmen vorhanden, aber in keinem anderen der untersuchten Genome. Diese AHLs können durch Rezeptoren vom LuxR-Typ erkannt werden.

### 3.8.5.4 Bildung von Biofilmen

Insgesamt fanden sich zudem in den Talsperren-Genomen 49 verschiedene Gene, die mit der Bildung von Biofilmen assoziiert sind. Alle dieser Gene wurden in allen talsperren-relevanten Genomen gefunden, eine Ausnahme bildeten die Gene *pgaABCD*.

Beweglichkeit ist ein erster wichtiger Schritt für die Biofilmbildung ist, um sich anschließend anheften zu können. Bei *E. coli* wie auch bei anderen Enterobakterien ist die Vermittlung der Biofilmbildung mit Zuckern und second-messenger-Proteinen wie cAMP-CRP (Liu *et al.*, 2020) verbunden, das durch Kohlenhydratlimitierung reguliert wird. Es vermittelt die Synthese der Geißel, indem es die Transkription von *flhDC* reguliert, was zu Motilität und Chemotaxis führt. Außerdem reguliert es die Synthese von Curli-Fasern (*csgBA*, *csgCDEFG*), die für die Adhäsion und Anheftung von Bakterien wichtig sind (Davin-Regli *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2012). Darüber hinaus spielt der Kohlenstoffspeicherregulator CsrA eine Rolle bei der Biofilmbildung, indem er die Flagellargene *flhDC*-Gene sowie *glgCAP*-Gene reguliert, die an der Glykogenbiosynthese beteiligt sind (Baker *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2002).

Nach der Adhäsion produzieren die Bakterien eine hydratisierte extrazelluläre Matrix, die als Architektur und Stabilität dient. Sie besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Amyloiden, Zellulose, Fimbrien, Pili sowie Geißeln (Flemming *et al.*, 2016). Bei *E. coli* basiert die Matrix auf Curli-Protein und Cellulose, die zusammen als Schutz vor Austrocknung dienen. Die Produktion von Cellulose als Bestandteil ihrer extrazellulären Matrix wird durch das *bcs*-Operon reguliert (Zogaj *et al.*, 2001). Eine weitere Komponente, die an der Biofilmbildung beteiligt ist und die Architektur beeinflusst, ist die Kolansäure, ein kapsuläres Polysaccharid, das durch das Gen *wza* reguliert wird (Dong *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006).

Ein weiterer Locus, der die Oberflächenbindung, interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung fördert, ist *pgaABCD* (Wang *et al.*, 2004). Es ist an der Produktion des Biofilm-Adhäsin Poly-beta-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin beteiligt ist. Diese Gene wurde in allen *Enterobacter asburiae*-Stämmen gefunden, aber lediglich in einem *Lelliottia*-Stamm (TZW13).

### 3.8.6 Hygienische Relevanz

#### 3.8.6.1 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenität von Bakterien hängt von mehreren Faktoren ab, wie der Toxinproduktion, Adhäsion, Invasion oder Biofilmbildung. Dennoch sind für die Pathogenität von *Enterobacter* bislang nur wenige Virulenzgene beschrieben (Davin-Regli *et al.*, 2019). Um die Virulenz der Isolate aus Talsperren zu untersuchen, wurde eine funktionelle Analyse mit KEGG durchgeführt, und Gene die zur Virulenz führen können überprüft und diese mit anderen, größtenteils klinischen oder pathogenen Isolaten verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 zusammengestellt.

**Tabelle 3.17 Überblick über ausgewählte Pathogenitätsfaktoren im Vergleich zwischen talsperren-relevanten Stämmen und Referenzstämmen.**

Bezeichnung	Gen	Talsperre		Referenz		
		EA (n=11)	LA (n=6)	EA (n=4)	EC (n=4)	PE (n=4)
<b>Adhäsion/Invasion</b>						
Curli Fimbriae	<i>csg</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	75 %
Mat/Ecp Fimbriae	<i>ecp</i>	55 %	-	25 %	100 %	50 %
Typ 1 Pili	<i>fim</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Pilus	<i>hof</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
prepilin peptidase dependent protein	<i>ppd</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
conjugal transfer pilus	<i>tra</i>	27 %	83 %	-	50 %	25 %
conjugal transfer pilus	<i>trbC</i>	27 %	33 %	-	50 %	-
<b>Sekretionssystem</b>						
T1SS	<i>hlyBD</i>	-	-	-	-	25 %
T2SS	<i>gsp</i>	91 %	-	50 %	100 %	50 %
T3SS	<i>spa/inv</i>	-	-	-	-	75 %
T3SS	<i>ssa/inv</i>	-	-	-	-	50 %
T3SS secreted effector	<i>esp</i>	-	-	-	-	25 %
T4SS	<i>vir/lvh</i>	-	-	25 %	-	50 %
T6SS secreted protein	<i>hcp</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	75 %
T6SS	<i>imp/vas</i>	100 %	~80 %	100 %	100 %	~50 %
preprotein translocase	<i>sec</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
sec-independent protein translocase	<i>tat</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<b>Toxine</b>						
Hemolysin A	<i>hlyA</i>	-	-	-	-	25 %
Hemolysin E	<i>hlyE</i>	-	-	-	-	50 %
Shigatoxin 1/2	<i>stx</i>	-	-	-	25 %	25 %

EA = *Enterobacter asburiae*, EC = *Enterobacter cloacae*, LA = *Lelliottia amnigena/Lelliottia aquatilis*, PE = Pathogene *Enterobacterales*

Pili oder Fimbrien sind nichtflagellare Oberflächenfilamente, die mit Sekretionssystemen verbunden sind und eine Rolle bei Adhäsion und Invasion spielen (Bardiaux *et al.*, 2019; Luna Rico *et al.*, 2019; Volkan *et al.*, 2015). Außerdem können sie für die Biofilmbildung und die Drehbewegung wichtig sein (Kearns, 2010). In allen Stämmen dieser Studie wurden Gene gefunden, die mit Adhärenz und Invasion assoziiert sind, nämlich Typ 4 Pili (*ppdABCD*, *hofBC*, *hofMNOQ*), Typ 1 Pili (*fimACDFGH*) und Curli-Fimbrien (*csgABCEFG*). Außerdem wurde das Gen für das konjugale Transferpilus-Protein (*trbC*) in 27 % der *Enterobacter*- und 33 % der *Lelliottia*-Stämme gefunden. Dies steht im Einklang mit den Referenzstämmen. Darüber

hinaus wurden in 55 % der *Enterobacter*-Genome auch Gene für Mat/Ecp-Fimbrien gefunden (*ecp*). Diese Gene waren auch im Umweltstamm von *Enterobacter asburiae* L1 vorhanden, nicht aber in den klinischen Isolaten.

Bakterien sind in der Lage, Substanzen aus dem Zytoplasma mittels Sekretionssystemen in die Umgebung zu transportieren (Green & Meccas, 2016). Dies hat verschiedene Funktionen, wie die Stimulation von benachbarten Bakterien, sie können allerdings auch – wie das Typ III (T3SS) Sekretionssystem – bei der Virulenz eine Rolle spielen, da hierbei auch Virulenzfaktoren wie Toxine in Wirtszellen abgegeben werden können (Davin-Regli *et al.*, 2019; Dobrindt *et al.*, 2004; Green & Meccas, 2016; Mezzatesta *et al.*, 2012).

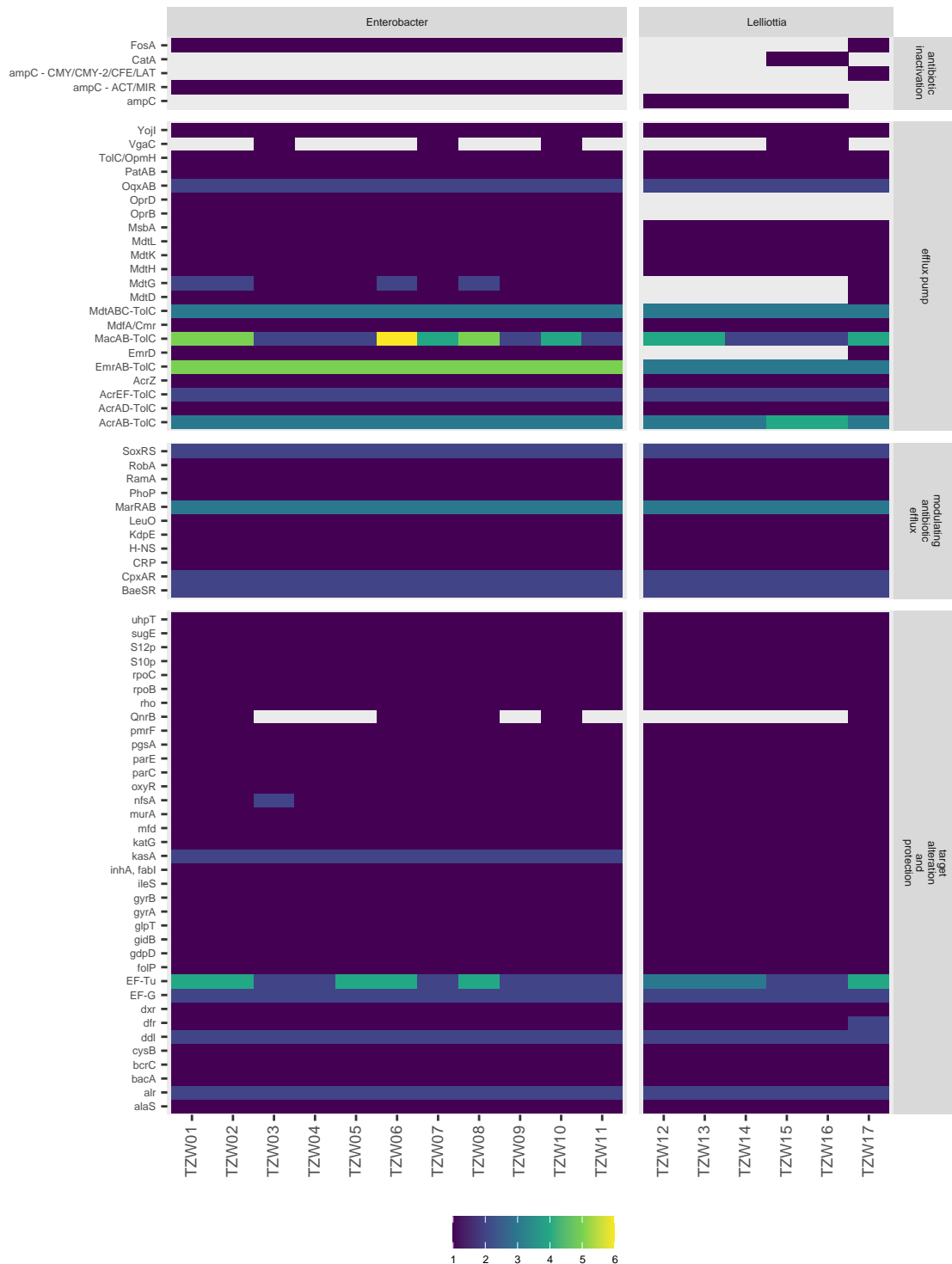
Bei der Analyse mit KEGG konnten 122 verschiedene Gene in den Talsperren-Genomen mit Sekretionssystemen assoziiert werden. Diese gehören zu vier Arten von Sekretionssystemen, wie dem Typ II (T2SS), Typ VI (T6SS), Sec-SRP (Secretion signal recognition particle) und Tat (twin-arginine translocase). Diese waren in allen *Enterobacter*-Isolaten vorhanden, mit Ausnahme von Stamm TZW03, in welchem das T2SS fehlte. Bei *Lelliottia* spp. fehlte dieses ebenfalls, zudem waren Gene von T6SS nur in einigen Stämmen vorhanden. Anders als in den pathogenen *Enterobacteriales*-Genomen zeigte sich, dass das Typ I (T1SS), Typ IV (T4SS), sowie Typ III (T3SS) Sekretionssystem nicht vorhanden war.

*Enterobacter* spp. sowie andere gramnegative Bakterien sind dafür bekannt, dass sie Virulenzfaktoren wie Enterotoxine, Hämolyisin und Cytotoxine (Shigatoxin) produzieren (Barnes *et al.*, 1997; Krzysińska *et al.*, 2009; Mezzatesta *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2008). Allerdings wurden in den Talsperren-Genomen keine Gene für Cytotoxine oder Hämolyisine gefunden, was im Gegensatz zu einigen *Enterobacter cloacae*-Stämmen (Paton & Paton, 1996), sowie *Escherichia* und *Salmonella* steht. Ein Stamm (TZW03) unterschied sich von den anderen und enthielt ein Gen, welches für die Untereinheit des Pertussis-Toxin (*ptxA*) kodiert, welches aus *Bordetella* bekannt ist (Locht, 1999). Es ist festzuhalten, dass dieser Stamm (TZW03) auch bei der phylogenetischen Analyse Unterschiede aufwies.

Insgesamt wurden in den Referenzgenomen von *Enterobacter cloacae* und den pathogenen *Enterobacteriales* wesentlich mehr Gene gefunden, die mit Virulenz assoziiert sind. Bei *Lelliottia* und *Enterobacter asburiae* war die Anzahl der Genkopien dagegen geringer. Zudem wurden keine Gene für T3SS gefunden, welches als allgemeiner Indikator für die Virulenz von Bakterien verwendet wird (Stuber *et al.*, 2003), sowie keine Gene für Toxine (z. B. Shigatoxin, Hämolyisin), von denen angenommen wird, dass sie zur Pathogenese von *Enterobacter* beitragen (Mezzatesta *et al.*, 2012).

### 3.8.6.2 Antibiotikaresistenzgene

Die Antibiotikaresistenz wird durch verschiedene Mechanismen wie beispielsweise eine Veränderung des Targets, die Antibiotika-Inaktivierung und einer Veränderung des Efflux verursacht. Insgesamt wurden mit Hilfe von CARD in den *Lelliottia*-Isolaten 78 verschiedene Antibiotikaresistenzgene gefunden, in den *Enterobacter*-Isolaten waren es mit 85 Genen nur wenige mehr. Ein Überblick über diese Gene ist in Abbildung 3.45 dargestellt.



**Abbildung 3.45 Antibiotikaresistenzgene der talsperren-relevanten Stämme nach CARD.**

Dargestellt ist die Anzahl der einzelnen Antibiotikaresistenzgene innerhalb der verschiedenen Stämme der beiden Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia*.



Ein großer Teil dieser ARGs sind Multidrug-Efflux-Pumpen (z. B. AcrAB-TolC, AcrAD-TolC, EmrAB-TolC, MdtABC-TolC) sowie regulatorische Gene, die diesen Efflux kontrollieren (z. B. *baeSR*, *cpxAR*, *ramA*, *robA*, *soxRS*). Darüber hinaus wurden in zumindest einigen der Isolate Gene für die Resistenz gegen Fosfomycin (*fosA*), Chloramphenicol (*catA*), Trimethoprim (*dfr*), Chinolon (*qnrB*) gefunden. Außerdem enthielten alle Stämme Gene, die für  $\beta$ -Laktamasen der Klasse C (*ampC*) kodieren.

Unterschiede wurden hinsichtlich der  $\beta$ -Laktamasen beobachtet, da die Referenzstämme auch Gene enthielten, die für  $\beta$ -Laktamasen der Klasse A und B (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*) kodieren. Außerdem enthielten die Referenzstämme Gene für die Resistenz gegen Aminoglykoside (*aac*, *aph*), Tetracycline (*tetD*) und Sulfonamide (*sul2*). Des Weiteren konnten die *Enterobacter*-Spezies anhand ihrer Klasse C  $\beta$ -Laktamasen unterschieden werden, da *Enterobacter cloacae* die CMH-Familie enthielt, während *Enterobacter asburiae* die ACT/MIR-Familie aufwies. Tabelle 3.18 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels CARD einige Gene als Antibiotikaresistenzgene zugeordnet wurden. Von diesen bilden allerdings die Efflux-Pumpen einen großen Teil. Im Vergleich mit *Enterobacter cloacae* wurden deutlich weniger ARG gefunden, besonders was die Antibiotika Aminoglykosid,  $\beta$ -Laktam, Sulfonamid und Tetracyclin angeht. Die tatsächliche phänotypische Resistenz sollte im Anschluss getestet werden.

**Tabelle 3.18 Überblick über ausgewählte Antibiotikaresistenzgene im Vergleich zwischen talsperren-relevanten Stämmen und Referenzstämmen.**

Bezeichnung	Gen	Talsperre		Referenz		
		EA (n=11)	LA (n=6)	EA (n=4)	EC (n=4)	PE (n=4)
<b>Aminoglykoside</b>						
Aminoglycoside acetyltransferase	<i>aac</i>	-	-	-	25 %	25 %
Aminoglycoside phosphotransferase	<i>aph</i>	-	-	-	25 %	-
<b>beta-Lactam</b>						
Klasse A (KPC, SHV, SRT, TEM)	<i>bla</i>	-	-	25 %	25 %	25 %
Klasse B (NDM)	<i>bla</i>	-	-	-	25 %	25 %
Klasse C (ACT, CMH, CMY)	<i>bla</i> , <i>ampC</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	50 %
<b>Choramphenicol</b>						
Chloramphenicol O-cetyltransferase	<i>catA</i>	-	33 %	25 %	25 %	-
<b>Fluoroquinolon</b>						
Pentapeptide repeat protein	<i>qnrB</i>	55 %	17 %	75 %	25 %	-
<b>Fosfomycin</b>						
Fosfomycin resistance protein	<i>fosA</i>	100 %	17 %	50 %	100 %	25 %
<b>Sulfonamid</b>						
Dihydropteroate synthase	<i>sul2</i>	-	-	-	50 %	-
<b>Tetracyclin</b>						
Tetracycline resistance, efflux pump	<i>tet(D)</i>	-	-	-	25 %	-
<b>Trimethoprim</b>						
Dihydrofolate reductase	<i>dfr</i>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

EA = *Enterobacter asburiae*, EC = *Enterobacter cloacae*, LA = *Lelliottia amnigena*/*Lelliottia aquatilis*, PE = Pathogene *Enterobacterales*

### 3.8.6.3 Antibiotikaresistenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sequenzierten Stämme auf die Resistenz gegenüber verschiedener Antibiotika überprüft. Hierfür wurde ein Antibiogramm durchgeführt. Bei einem Antibiogramm werden die Antibiotika auf sogenannten Disks auf die Bakteriensuspension aufgebracht. Der Hemmhof konnte anschließend gemessen werden. Getestet wurden  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie Penicilline (Piperacillin), Carbapeneme (Imipenem, Meropenem), sowie Cephalosporine (Cefotaxim, Ceftazidim). Außerdem wurden Fluorchinolon (Ciprofloxacin), Fosfomycin, Chloramphenicol, Trimethoprim und Polymyxin B getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.19 dargestellt.

Bei den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden nur bei dem Stamm (*Enterobacter asburiae* TZW11) eine Resistenz gegen Ceftazidim gefunden, alle anderen Stämme und Antibiotika zeigten keine Resistenz. Keine Resistenzen wurden außerdem gegen Ciprofloxacin, Polymyxin B, Trimethoprim und Chloramphenicol gefunden. Gegen Fosfomycin wurden die meisten Resistenzen gefunden. Insgesamt waren fünf der *Enterobacter asburiae* Stämme dagegen resistent (TZW03, TZW06, TZW07, TZW08, TZW09). Bei den *Lelliottia*-Isolaten wurde keine Antibiotikaresistenz gefunden.

**Tabelle 3.19 Ergebnisse des Antibiogramms zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz.**

Antibiotikum	Resistenz Hemmhof (mm)	<i>Enterobacter</i> (n = 11)		<i>Lelliottia</i> (n = 6)	
		Hemmhof (mm)	Resistente Isolate	Hemmhof (mm)	Resistente Isolate
Piperacillin (PIP)	<20	26,2 ± 3,2	-	23,3 ± 1,0	-
Imipenem (IMI)	<19	27,8 ± 3,2	-	30,3 ± 0,8	-
Meropenem (MEM)	<16	33,6 ± 3,2	-	35,3 ± 1,6	-
Cefotaxim (CTX)	<17	28,7 ± 2,6	-	27,0 ± 2,1	-
Ceftazidim (CAZ)	<19	25,5 ± 4,2	1	26,3 ± 2,0	-
Ciprofloxacin (CIP)	<22	34,5 ± 4,4	-	38,7 ± 2,4	-
Fosfomycin (FOT)	<21	22,4 ± 2,7	5	35,3 ± 9,9	-
Trimethoprim (TM)	<15	30,2 ± 2,6	-	32,7 ± 3,0	-
Chloramphenicol (C)	<17	27,1 ± 3,4	-	30,7 ± 1,6	-
Polymyxin B (PB)	<11	14,5 ± 0,9	-	15,3 ± 1,0	-

IMI = Imipenem, MEM = Meropenem, PIP = Piperacillin, CTX = Cefotaxim, CAZ = Ceftazidim, FOT = Fosfomycin, TM = Trimethoprim, PB = Polymyxin B, C = Chloramphenicol

## 4 Diskussion

Vermeehrt zeigte sich in den vergangenen Jahren die aktuelle Unsicherheit im Umgang mit coliformen Bakterien, die besonders deutlich hervortrat, nachdem regelmäßig hohe Konzentrationen coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren nachgewiesen wurden. Da sowohl die Ursache, als auch die gesundheitliche Relevanz bislang nicht geklärt war, war die Beurteilung der Situation kompliziert. Ziel der Arbeit war es daher, das Phänomen der erhöhten Konzentrationen coliformer Bakterien in Trinkwassertalsperren zu verstehen, Ursachen aufzuklären, sowie festzustellen, inwieweit daraus eine mögliche Gesundheitsgefährdung abzuleiten ist.

Vor diesem Hintergrund wurde die saisonale Entwicklung coliformer Bakterien in zwei Trinkwassertalsperren untersucht (Reitter *et al.*, 2021b). Hierbei wurde festgestellt, dass es *Enterobacter asburiae*, sowie *Lelliottia* spp. möglich ist, sich innerhalb eines autochthonen Prozesses in den Talsperren zu vermehren. Ein Fäkaleintrag konnte dagegen ausgeschlossen werden. Stattdessen korreliert die Vermehrung der Bakterien mit der Sommerschichtung der Talsperre und beginnt vermutlich im Epi-/Metalimnion ab einer Wassertemperatur von 10 °C. Als Ursache hinter der Vermehrung wird das spätsommerliche Algensterben, sowie die damit verbundene Abgabe von Aminosäuren an das Gewässer angenommen, die den Bakterien als Nährstoffe dienen können. Von einigen Isolaten coliformer Bakterien wurden die Genome sequenziert und analysiert (Reitter *et al.*, 2021a). Die Analysen bestätigen, dass die Bakterien an oligotrophe Bedingungen angepasst sind und zudem als nicht hygienisch-relevant einzustufen sind. Dies sollte bei der zukünftigen Bewertung eines Befundes coliformer Bakterien beachtet werden, wobei eine Massenvermehrung von einem Eintrag von außen unterschieden werden sollte. Die Untersuchung dieses Phänomens war von großer Bedeutung, besonders da klimabedingt erwartet wird, dass Massenvermehrungen coliformer Bakterien in Oberflächengewässern in Zukunft zum Regelfall werden könnten.

### 4.1 Methodenvergleich zur Typisierung und Identifizierung von coliformen Bakterien

Die exakte taxonomische Einordnung von coliformen Bakterien ist schwierig (Brady *et al.*, 2013). Zudem ist die Taxonomie beispielsweise für den *Enterobacter cloacae*-Komplex, in der Fachwelt nicht einwandfrei geklärt (Annajhala *et al.*, 2019; Brady *et al.*, 2013; Davin-Regli *et al.*, 2019; Hoffmann & Roggenkamp, 2003). Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Identifizierungs- und Typisierungsmethoden verglichen werden, um eine genaue Zuordnung der talsperren-relevanten Arten im späteren Teil der Arbeit zu garantieren.

Für die Identifizierung ist eine vorangestellte Typisierung von Vorteil. Klassischerweise wird hierfür die RAPD verwendet (Hadrys *et al.*, 1992), die auch für die Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* gut geeignet ist. Aber auch mit neueren Methoden wie MALDI-TOF (Egli *et al.*, 2015; Sachse *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2013; Sauget *et al.*, 2017) können Stämme typisiert werden. Diese lässt allerdings nicht unbedingt eine direkte Korrelation mit der MLSA zu, sondern weist stattdessen auf verschiedene Phänotypen und Herkunftsquellen hin (Berrazeg *et al.*, 2013; Giebel *et al.*, 2008; Popović *et al.*, 2017; Siegrist *et al.*, 2007). Tatsächlich zeigte sich, dass die *Enterobacter*-Isolate, die aus den Talsperren isoliert wurden, nah verwandt waren, während die *Lelliottia*-Isolate Unterschiede aufwiesen, die sich später dadurch begründeten, dass es sich um zwei verschiedene Arten handelte. Dies bestätigt die

Ergebnissen von de Florio *et al.* (2018), wonach sich *Enterobacter*-Arten mithilfe der Typisierungsfunktion deutlich von anderen Arten unterscheiden lassen.

Die Identifizierung mit dem MALDI-TOF ist allerdings nur so gut, wie die Datenbank dahinter, und ist für *Enterobacter* (Carbonnelle *et al.*, 2012; Pavlovic *et al.*, 2012), sowie *Lelliottia* nicht immer eindeutig. Problematisch sind veraltete Bezeichnungen in der Datenbank, so handelt es sich bei „*Lelliottia amnigena* 406028 2015 IMHM“ vermutlich stattdessen um *Lelliottia aquatilis*. Zudem war aus der Gattung *Lelliottia* lediglich eine Art – nämlich *Lelliottia amnigena* – in der Datenbank vorhanden. Carbonnelle *et al.* (2012) betonen, dass Fehlidentifikationen mit dieser Methode auf fehlende Datenbankeinträge zurückzuführen sein können, was hier der Fall war. Dieses Fehlen einzelner Arten begründet sich damit, dass die Methode aktuell besonders im klinischen Bereich angewendet wird (Benagli *et al.*, 2011; Carbonnelle *et al.*, 2011), wodurch sich die Identifizierung von Umweltisolaten schwierig gestaltet. Bei inkonsistenten MALDI-TOF-Ergebnissen sollte daher immer ein Blick auf die zugrundeliegende Datenbank geworfen werden. Allerdings kann die Datenbank durch neue Isolate erweitert werden, wobei hier stets auf die Richtigkeit von Identifizierungsergebnissen geachtet werden muss, was selbst bei Typstämmen nicht immer der Fall ist (Salvà-Serra *et al.*, 2019). Als am besten geeignet stellte sich hierfür die Genomsequenzierung heraus.

Nach der Datenbankeinerweiterung konnten die Arten *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter ludwigii*, *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis* und *Lelliottia nimipressuralis* sicher identifiziert werden, was das spätere Monitoring essentiell war. Allerdings ist die Spezifität für andere Arten noch immer nicht einwandfrei, weswegen es empfehlenswert ist, weitere Stämme in die Datenbank aufzunehmen, beispielsweise *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter hormaechei*, um auf die Problematik der Identifizierung des *Enterobacter cloacae*-Komplexes zu reagieren (Pavlovic *et al.*, 2012). Hierfür ist es hilfreich, wenn mehr als ein Isolat einer Art eingespeichert wird, wie am Beispiel von *Enterobacter ludwigii* sichtbar wurde (Abbildung 3.4).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Identifizierung coliformer Bakterien – besonders *Enterobacter* – noch immer sehr komplex ist. Dennoch war es mithilfe des MALDI-TOF möglich, nahverwandte Isolate zuzuordnen und mögliche Unterschiede zwischen den Stämmen zu detektieren. Mit Hilfe der Datenbankeinerweiterung wurde eine sichere Identifizierung der Arten *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter ludwigii*, *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis* und *Lelliottia nimipressuralis* erreicht. Mit einer ausreichend großen Datenbank war die Identifizierung und Typisierung von coliformen Bakterien mithilfe des MALDI-TOF daher möglich und konnte so für das spätere Monitoring angewendet werden.

## 4.2 Mikrobiologisches Monitoring

### 4.2.1 *Enterobacter asburiae* und *Lelliottia* spp. dominieren während der Massenvermehrung

Im Rahmen der Arbeit wurde die saisonale Entwicklung von coliformen Bakterien in zwei Trinkwassertalsperren in Deutschland untersucht (Reitter *et al.*, 2021b). Die beiden Talsperren wurden ausgewählt, da in beiden in den vergangenen Jahren hohe Zahlen an coliformen Bakterien beobachtet wurden (Freier *et al.*, 2005). Beide Talsperren sind zudem von der Größe her vergleichbar, aber ansonsten unterschiedlich und können als repräsentativ für typische schwach mesotrophe (Klingenberg) und oligotrophe (Kleine Kinzig) Trinkwassertalsperren angesehen werden.

In den Sommermonaten stiegen die Zahlen der coliformen Bakterien in beiden Talsperren sprunghaft an und erreichten Konzentrationen von  $10^3$  MPN/100 ml und mehr. Dieser sprunghafte Anstieg ist bereits in anderen Trinkwasserspeichern (Atherholt *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2010) oder natürlichen Gewässern (Ksoll *et al.*, 2007) beschrieben. Doch nicht nur die Anzahl, sondern auch die Artenzusammensetzung änderte sich zu dieser Zeit völlig. Die Diversität verringerte sich auf nur noch eine oder zwei Arten von coliformen Bakterien, die die Talsperre dominieren. Daher wird davon ausgegangen, dass diese plötzliche Zunahme von einer oder wenigen Arten als Massenvermehrung coliformer Bakterien oder "Coliformenblüte" in der Talsperre angesehen werden kann (siehe auch weitere Diskussion unten).

Je nach Talsperre dominierten *Enterobacter asburiae*, oder *Lelliottia amnigena* und *Lelliottia aquatilis*. Es wurden eng verwandte Stämme in verschiedenen Talsperren in ganz Deutschland gefunden (Abbildung 3.12). Von diesen Stämmen ist bekannt, dass sie in Wasser auftreten, so wurden *Lelliottia amnigena* (früher *Enterobacter amnigenus*) und *Lelliottia aquatilis* erstmals aus Wasserproben isoliert (Izard *et al.*, 1981; Kämpfer *et al.*, 2008; Kämpfer *et al.*, 2018). *Enterobacter asburiae* gehört zum *Enterobacter cloacae*-Komplex, einem Komplex, der sowohl klinische als auch umweltassoziierte Isolate umfasst, deren Taxonomie kompliziert und deren Differenzierung schwierig ist (Brady *et al.*, 2013; Hoffmann & Roggenkamp, 2003; Mezzatesta *et al.*, 2012). Die Spezies wurde ursprünglich aus klinischem Material isoliert, ihre hygienische Relevanz ist jedoch noch unklar, da sie auch in Umweltproben wie Wasser vorkommt (Brenner *et al.*, 1986; Davin-Regli *et al.*, 2019; Kämpfer *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2018). Außerdem wurde die Vermehrung von *Enterobacter* spp. in Trinkwasserverteilungssystemen beschrieben (Edberg *et al.*, 1994). Die Gattung *Serratia* war ebenfalls häufig in Talsperren, eine Vermehrung konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Interessanterweise dominierten die beiden Gattungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Jahr. Die Gattung *Lelliottia* dominierte im Frühsommer (Juni/Juli), wo sie in der Talsperre Kleine Kinzig zu einer Massenvermehrung führte und den ganzen Sommer anhielt. Allerdings konnte auch in der Talsperre Klingenberg im Frühsommer ein *Lelliottia*-Peak beobachtet werden, allerdings nicht gefolgt von einer massenhaften Vermehrung. Stattdessen kam es in Klingenberg im Spätsommer (August/September) zu einer Massenvermehrung von *Enterobacter*. Eine solche Vermehrung wurde auch in den Talsperren Wahnbach, Breitenbach und Rappbode festgestellt (Kapitel 3.6). Auch im Bodensee wurden im Spätsommer 2015 hohe Konzentrationen an coliformen Bakterien durch die Art *Enterobacter asburiae* festgestellt. In der Söse Talsperre dominierte hingegen *Lelliottia*.

#### 4.2.2 *Frankiales* und *Burkholderiales* dominieren die mikrobielle Gemeinschaft

Um die Auswirkungen von Vermehrungsereignissen auf die mikrobielle Gemeinschaft zu untersuchen, wurde eine 16S rRNA-Amplikonanalyse zu Zeiten mit und ohne Proliferation von coliformen Bakterien durchgeführt. Die drei am häufigsten vorkommenden Phyla waren *Actinobacteriota*, *Bacteroidota* und *Proteobacteria*. Von allen drei Phyla ist bekannt, dass sie sowohl in Trinkwasserproben als auch in Süßwasserhabitaten vorkommen (Paruch *et al.*, 2019; Perrin *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2014; Rodriguez-R *et al.*, 2020; Tamames *et al.*, 2010; Vaz-Moreira *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013). *Firmicutes*, die im Gegensatz dazu häufig im gastrointestinalen Mikrobiom gemessen werden und als eine der wichtigsten fäkalen Bakterien des Menschen im Wassereinzugsgebiet berichtet werden (Paruch *et al.*, 2019; Unno *et al.*, 2010), waren nur in geringer Konzentration vorhanden.

*Actinobacteriota* sind grampositive Bakterien, die sowohl in aquatischen als auch in terrestrischen Ökosystemen verbreitet sind und eine der größten bakteriellen Phyla darstellen (Barka *et al.*, 2016). Sie haben eine myzelartige Lebensweise und einen umfangreichen Sekundärstoffwechsel. *Frankiales* sind dafür bekannt, dass sie die *Actinobacteriota* in Wasserproben dominieren (Pinel *et al.*, 2020). *Frankia* ist ein Stickstoff-fixierendes Actinobakterium und ist mit Pflanzen assoziiert (Barka *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2014). *Actinobacteriota* wurden als kleine Bakterien mit hohem LNA-Gehalt beschrieben (Proctor *et al.*, 2018). Dies stimmt mit der hohen Anzahl an LNA-haltigen Bakterien überein, die in dieser Studie in Höhe von etwa 75 % nachgewiesen wurden (Tabelle 3.5).

Es wurde berichtet, dass Proteobakterien die am häufigsten vorkommenden Bakterien in epilimnischen Gewässern sind, insbesondere *Burkholderiales* dominieren in weniger produktiven Talsperren wie oligotrophen und mesotrophen Talsperren (Llirós *et al.*, 2014). Sie können mit Cyanobakterien oder Partikeln assoziiert sein und korrelieren mit der DOC- und Nitratkonzentration (Llirós *et al.*, 2014). *Burkholderiales* sind eine vielfältige Ordnung, die zu den  $\beta$ -Proteobakterien gehört und streng aerobe und fakultativ anaerobe Chemoorganotrophe, obligate und fakultative Chemolithotrophe, stickstofffixierende Organismen sowie pflanzliche, tierische und menschliche Krankheitserreger umfasst (Garrity *et al.*, 2005). Die in dieser Studie am häufigsten vorkommende Familie waren die chemoorganotrophen oder fakultativ chemolithotrophen *Comamonadaceae*, die in der Vergangenheit aus verschiedenen Quellen wie Boden, Wasser und Umwelt gewonnen wurden (Garrity *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2014; Tamames *et al.*, 2010).

Innerhalb der Proteobakterien wurde erwartet, die Ordnung *Enterobacterales* häufig zu finden, besonders in Zeiten mit hohen Konzentrationen von coliformen Bakterien, da sie zu dieser Ordnung gehören. Dies war jedoch nicht der Fall. Sie hatten nur eine Häufigkeit von 0,04 %. Dies zeigt, dass die Massenvermehrung coliformer Bakterien keinen herausragenden Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft hat, da diese Bakterien nur einen kleinen Anteil der Gemeinschaft ausmachen. Vergleicht man die maximale Konzentration coliformer Bakterien ( $2,4 \times 10^4$  MPN/100 ml) mit der TCC und den 16S rRNA-Genen, so wird deutlich, dass selbst diese hohen Konzentrationen coliformer Bakterien nur etwa 0,02 % der gesamten Bakterienzellzahl ausmachen. Aus diesem Grund überrascht es nicht, dass keine signifikanten Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft zwischen Proben mit hohen und niedrigen coliformen Bakterienzahlen gefunden werden konnten.

Stattdessen konnten signifikante Unterschiede in der Bakteriengemeinschaft zwischen den beiden Talsperren gefunden werden. *Bacteroidota* waren in der Talsperre Klingenberg signifikant häufiger, während *Planctomycetota* im der Talsperre Kleine Kinzig signifikant häufiger vorkamen ( $p < 0,001$ ). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lirós *et al.* (2014) überein, wo die Herkunft der Proben den größten Einfluss auf die Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft hatte, verglichen mit der Jahreszeit und der Wasserschicht.

### 4.2.3 Massenvermehrung als autochthoner Prozess in der Talsperre

Da die fäkale Verunreinigung des Rohwassers eine große Herausforderung für die Trinkwasserversorger darstellt (Gunnarsdottir *et al.*, 2020), ist eine der essentiellen Frage für Trinkwasserversorger wie auch für Gesundheitsbehörden, ob die beobachteten hohen Zahlen an coliformen Bakterien mit einer fäkalen Verunreinigung zusammenhängen, was möglicherweise ein Gesundheitsrisiko bedeuten würde. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die FIB *E. coli* und Enterokokken während des gesamten Probenahmezeitraums überwacht, da die coliformen Bakterien keine direkte Korrelation zu fäkalen Einflüssen zulassen. Außerdem wurde der Zufluss in die Talsperre mit dem Talsperrenwasser verglichen. Zusätzlich wurde das Talsperrenwasser auf fäkale MST-Markergene untersucht.

In Deutschland sind Trinkwassertalsperren von einer Trinkwasserschutzzone umgeben, um Gefährdungen im Einzugsgebiet zu minimieren (WHO, 2016). Darüber hinaus dienen Vorsperren als Barriere, um z. B. den direkten Eintrag von Regenwasser in die Hauptsperre zu reduzieren, der durch erhöhte Zahlen mikrobieller Indikatorparameter nachgewiesen werden kann (Balzer *et al.*, 2010; Kistemann *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu coliformen Bakterien und HPC erreichten die FIB während der Zeit der Massenvermehrung keine hohen Zahlen, mehr noch, sie waren in der Mehrzahl der Proben nicht nachweisbar. Die meisten Enterokokken wurden als *Enterococcus rotai* identifiziert, eine Art, von der bekannt ist, dass sie hauptsächlich in wirbellosen Tieren wie Mücken vorkommt (Hügler *et al.*, 2014; Sedláček *et al.*, 2013). Generell kommen Enterokokken nicht nur in Fäkalien, sondern auch in der Umwelt vor (Byappanahalli *et al.*, 2012). Die Konzentration von *E. coli* – dem Bakterium, welches als bester Indikator für fäkale Verunreinigungen sowohl aus menschlichen als auch aus tierischen oder wildlebenden Quellen gehandelt wird (Edberg *et al.*, 2000; Farnleitner *et al.*, 2010) – war sogar niedriger als die Konzentration der Enterokokken. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu fäkalbelasteten Wässern vor, in welchen *E. coli* in einer ähnlichen Konzentration ( $>10^7$  MPN/100 ml) zu finden war, wie die coliformen Bakterien (Abbildung 3.13), und zudem von der Gattung *Klebsiella* dominiert wurden. Die war vergleichbar zu den Ergebnissen von Suzuki *et al.* (2018). Die RDA zeigte ebenfalls eine negative Korrelation zwischen den sich vermehrenden coliformen Spezies und der Messung von FIB in Talsperren (Abbildung 3.35). Die hohen Zahlen coliformer Bakterien in den Talsperren gingen also nicht mit erhöhten Zahlen von FIB einher. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das coliforme Wachstum nicht auf eine fäkale Verunreinigung zurückzuführen ist.

Die Analyse des Zuflusses der Talsperre Klingenberg bestätigt diese Annahme. Die Talsperre Klingenberg (Rohwasser und Oberflächenwasser) wurde mit ihrem Hauptzufluss (Wilde Weißeritz) verglichen (Abbildung 3.8). Dabei zeigte sich, dass sich die Talsperre und ihr Zufluss signifikant voneinander unterschieden. Dies und die Tatsache, dass *Enterobacter asburiae* im Hauptzufluss während der Probenahme nicht nachgewiesen werden

konnte, unterstützt die Schlussfolgerung, dass die Massenvermehrung von coliformen Bakterien ein autochthoner Prozess innerhalb der Talsperre ist.

Für die MST wurden in dieser Studie spezifische *Bacteroidales*-Gene getestet. Diese Bakterien sind eine der am häufigsten vorkommenden Bakteriengruppen im Darm warmblütiger Tiere (García-Aljaro *et al.*, 2019; Hagedorn *et al.*, 2011). Daher ist die Quantifizierung von *Bacteroides* 16S rRNA eine zuverlässige Methode zur Abschätzung der fäkalen Kontamination in Wasserproben sowie der fäkalen Herkunft, aufgrund ihrer Co-Evolution mit spezifischen Wirten (Ahmed *et al.*, 2016). In dieser Studie machten unspezifische *Bacteroides* 16S rRNA etwa 0,2 % der gesamten 16S rRNA aus ( $2 \times 10^3$  Genkopien/ml). Diese Zahlen sind relativ niedrig, da 1 g Kot in 1 Liter Wasser etwa  $10^{10}$  Genkopien unspezifischer *Bacteroides*-Marker enthält, die normalerweise etwa ein Drittel der fäkalen Bakterien ausmachen (Layton *et al.*, 2006). Human- und wiederkäuerspezifische Marker konnten nicht nachgewiesen werden. Außerdem wies nur eine Probe, nämlich der Hauptzufluss in die Talsperre Klingenberg, im September eine geringe fäkale Belastung durch Schweine auf ( $4 \times 10^2$  Genkopien/ml). Da diese Probenahmestelle von Wald umgeben ist, ist es möglich, dass der Einfluss durch Wildschweine verursacht wird, da diese auch mit diesem Primer-Set nachgewiesen werden (Lamendella *et al.*, 2013). Da dies die einzige Probe mit einem Einfluss von Schweinekot war, kann gefolgert werden, dass fäkale Verunreinigungen im Zufluss nicht die Talsperre erreicht haben. Fäkale Verunreinigungen führen zu einem Anstieg der *Bacteroides*-Marker, zusammen mit FIB (Stange & Tiehm, 2020). Außerdem sind *Bacteroidales* in der Regel zwei bis drei Größenordnungen häufiger im menschlichen und tierischen Darm vorhanden als coliforme Bakterien (Hagedorn *et al.*, 2011). Dies war in den Talsperrenwässern nicht der Fall. Die Quantifizierung der MST-Markergene bestätigen daher die These, dass die Zunahme coliformer Bakterien in den Talsperren nicht mit fäkalen Kontaminationen korrespondierte.

Zusammen mit der Tatsache, dass in der 16S rRNA-Amplikonanalyse der Talsperrenwässer keine *Firmicutes* nachgewiesen werden konnten, deuten die oben genannten Ergebnisse darauf hin, dass das Wachstum coliformer Bakterien innerhalb der Talsperre ein autochthoner Effekt ist und nicht auf fäkale Kontaminationen zurückzuführen ist.



### 4.3 Ursachen und Lebensraumanpassungen

Da fäkale Verunreinigungen nicht die Ursache für die Vermehrung coliformer Bakterien in Trinkwasserreservoirs sind, stellt sich die Frage, welche anderen Faktoren diesen Prozess möglicherweise beeinflussen? Aus diesem Grund wurde eine statistische Datenanalyse durchgeführt, um Parameter zu definieren, die die Vermehrung von coliformen Bakterien beeinflussen. Daran anschließende Vermehrungsversuche sollten die Ergebnisse verifizieren. Die Genomanalyse einzelner, aus Talsperren isolierte Stämme, sollte zudem klären, wie die Stämme an die oligotrophen Lebensräume der Trinkwassertalsperren angepasst sind.

#### 4.3.1 Massenvermehrung beginnt im Epi-/Metalimnion zum Zeitpunkt der Sommerstagnation

Für beide proliferierenden Gattungen (*Enterobacter*, *Lelliottia*), war die Wassertemperatur einer der Hauptfaktoren, die mit ihrem Auftreten im Sommer korrelierten. Dies bestätigten Laborversuche, wonach die Wassertemperatur mindestens 10 °C betragen muss, damit die Bakterien wachsen. Der Zusammenhang zwischen der jahreszeitlichen Variabilität von coliformen Bakterien und der Temperatur wurde bereits in mehreren Fällen in Oberflächen-gewässern, Flüssen und Böden berichtet (Cho *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2019; LeChevallier *et al.*, 1996). Da die Wassertemperatur in den oberen Wasserschichten höher ist, während sie bedingt durch die Stagnation im Hypolimnion in der Regel lediglich 5 °C aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass die Vermehrung im Epi- oder Metalimnion der Talsperre beginnt und sich dann schnell über den gesamten Wasserkörper ausbreitet. Im Metalimnion liegt zudem das photosynthetische Maximum eines Gewässers (Wetzel, 2001). In dieser Region ist die Inaktivierung durch UV-Licht geringer als in den oberen Wasserschichten (Davies-Colley *et al.*, 1994; Schultz-Fademrecht *et al.*, 2008). Zudem ist diese Schicht mit Partikeln abgestorbener Algen angereichert, die als Nährstoffe für heterotrophe Bakterien wie die coliformen Bakterien dienen können (Cole, 1982; Kouzuma & Watanabe, 2015; McFeters *et al.*, 1978), was zu erhöhten Konzentrationen von Bakterien in der Nähe der Sprungschicht führt (Davis *et al.*, 2005; McDonough *et al.*, 1986). Diese Theorie wird dadurch bestätigt, dass beide Gattungen in den Laborversuchen im Oberflächenwasser eine höhere Wachstumsrate aufwiesen als im Rohwasser.

Als Folge der Schichtung in Talsperren kann der Sauerstoffverbrauch im Hypolimnion zur Lösung von Metallen und Nährstoffen aus dem Sediment führen. Als fakultativ anaerobe Bakterien haben coliforme Bakterien möglicherweise einen Vorteil gegenüber anderen Bakterien, was die negative Korrelation erklären würde. Die Vermehrungsversuche bestätigten zwar einen minimalen Vorteil für *Enterobacter asburiae*. Für *Lelliottia amnigena* konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigt werden. Eine Vermehrung im Labor trat zudem lediglich auf, wenn die Mischbiozönose zuvor abgetötet wurde und das Wasser steril war. Da außerdem davon ausgegangen wird, dass die Vermehrung der coliformen Bakterien in den oberen Wasserschichten beginnt, in denen es – anders als im Hypolimnion – nicht zu einem Sauerstoffverbrauch kommt, liegt die negative Korrelation daher vor allem am Zustand der Talsperre zum Zeitpunkt der Vermehrung, die stabil geschichtet ist.

Der pH-Wert ist von erheblicher Bedeutung für in Gewässern ablaufende Prozesse. Dieser hängt besonders mit der Phase der Stagnation und der Primärproduktion zusammen, weswegen zwischen Algen und dem pH-Wert ein positiver Zusammenhang besteht (Zhang *et al.*, 2019). Zudem beeinflusst er das mikrobielle Wachstum und die Synthese von Metaboliten (Toledo *et al.*, 2008). Bei der Korrelationsanalyse wurde eine negative Korrelation zwischen

den coliformen Bakterien und dem pH-Wert festgestellt, besonders stark in der Talsperre Kleine Kinzig. Der pH-Wert lag in der Kleinen Kinzig Talsperre im Schnitt bei 6,7–6,8, während er bei den anderen vier Talsperren höher war mit 7,1–7,4. Dies liegt im allgemeinen Bereich von Seen (Wetzel, 2001), sowie der optimalen Wachstumsrate für coliforme Bakterien (Torres *et al.*, 2012). Auch die Söse Talsperre, in der sich *Lelliottia* ebenfalls vermehrte, hat im Durchschnitt einen niedrigen pH-Wert von 6,9. Vermutlich ist daher *Lelliottia* spp. besser an einen niedrigen pH-Wert angepasst. Allgemein deutet die negative Korrelation allerdings besonders auf den Zustand der Talsperre zum Zeitpunkt der Vermehrung während der Stagnation, sowie das Ende der Primärproduktion hin.

Es wurde diskutiert, dass hohe Zahlen coliformer Bakterien hauptsächlich in warmen und trockenen Jahren mit niedrigen Wasserständen in Talsperren auftreten (Exner *et al.*, 2005; Freier *et al.*, 2005). So gehören die Jahre 2018–2020 zu den wärmsten und trockensten Jahren in Deutschland seit Beginn der Wetteraufzeichnungen (DWD, 2018; DWD, 2019; DWD, 2020). Höhere Wassertemperaturen sowie Wasserknappheit werden aufgrund des Klimawandels voraussichtlich in vielen Regionen der Welt zunehmen (Bates *et al.*, 2008; Dokulil *et al.*, 2006; Mosley, 2015). Außerdem hat sich die Schichtungsdauer verlängert (Bates *et al.*, 2008), was sich auf viele physikochemische sowie biologische Parameter auswirkt (Delpla *et al.*, 2009). Da ein Zusammenhang zwischen Schichtung und Vermehrung der coliformen Bakterien besteht, kann davon ausgegangen werden, dass die Massenvermehrung coliformer Bakterien in Zukunft noch häufiger, sowie in weiteren Talsperren, auftreten wird.

### 4.3.2 Anpassungen an den oligotrophen Lebensraum Talsperre

Doch wie können die Bakterien dennoch im Hypolimnion bei 5 °C vorkommen, wenn sie höhere Wassertemperaturen bevorzugen? Alle Isolate verfügten über Gene, die bei der Temperaturanpassung eine Rolle spielen und es den Bakterien erlauben in einem breiten Temperaturbereich zu überleben, indem sie zentrale zelluläre Prozesse verändern (Barria *et al.*, 2013). Dies scheint besonders für *Lelliottia* relevant zu sein, deren Vermehrung in der Talsperre begann, als die Wassertemperatur noch nicht ihr Maximum erreicht hatte. Zudem ist *Lelliottia* das ganze Jahr über nachweisbar, während *Enterobacter* lediglich im Spätsommer vorkommt. Dieser Vorteil von *Lelliottia*-Stämme bei niedrigeren Temperaturen im Vergleich zu *Enterobacter* ist bekannt (Izard *et al.*, 1981; Leclerc *et al.*, 2001) und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Möglich ist ein Zusammenhang mit dem temperaturabhängigen positiven Regulator der Motilität, welcher zu einer verringerten Motilität bei niedrigeren Temperaturen führt (Ferrándiz *et al.*, 2005). Das Gen, welches dafür kodiert (*hosA*) wurde in allen außer den *Lelliottia*-Genomen gefunden. Vermutlich ist die Motilität von *Lelliottia* daher bei niedrigen Temperaturen nicht reduziert und sie sind besser an diese Verhältnisse angepasst.

Stickstoff ist ein wesentlicher Nährstoff für das Überleben von Bakterien (Korajkic *et al.*, 2019). In oligotrophen Seen sind vor allem Nitrat und gelöster organischer Stickstoff die Hauptquellen. Bei der Korrelationsanalyse wurde für den Nitratgehalt eine negative Korrelation in den vier Talsperren, in denen *Enterobacter* dominierte, sowie eine positive Korrelation in der Talsperre Kleine Kinzig, in der *Lelliottia* dominierte, festgestellt. Dieser Zusammenhang lässt sich durch den unterschiedlichen Vermehrungszeitpunkt erklären, da Nitrat zum Zeitpunkt der Vermehrung von *Lelliottia* sein Maximum und zum Zeitpunkt der Vermehrung von *Enterobacter* sein Minimum erreicht (Diao *et al.*, 2018). Benötigt *Lelliottia* daher mehr Nitrat zur Vermehrung im Vergleich zu *Enterobacter*? Das Gegenteil scheint der Fall zu sein. Denn tatsächlich war die Nitratkonzentration in der Talsperre Kleine Kinzig am niedrigsten. Zudem besitzt *Lelliottia amnigena* im Vergleich zu den talsperren-relevanten *Enterobacter*-Stämmen das

allgemeine Stickstoffregulierungssystem (Ntr), welches unter stickstoffarmen Bedingungen aktiviert wird, um alternative Stickstoffquellen zu nutzen (Moreno-Vivián *et al.*, 1999). Von  $\gamma$ -Proteobakterien, zu denen die coliformen Bakterien gehören, ist zudem bekannt, dass sie häufiger in Gewässern mit einem niedrigen Nitratgehalt vorkommen (Gasol *et al.*, 2002). In den untersuchten Talsperren lagen die Nitratwerte im Durchschnitt zwischen 1,5 und 13,6 mg/l (Tabelle A 4). Dies stimmt mit anderen Studien in oligotrophen Süßwasserseen überein (Sánchez-España *et al.*, 2017; Tipping *et al.*, 2008), während in eutrophen Seen mindestens viermal so hohe Werte erreicht werden (Gasol *et al.*, 2002). Organismen, die hier leben, müssen daher an die Nährstoffsituation angepasst sein. Unter stickstofflimitierenden Bedingungen wird die Expression des *glnALG*-Operons, das für die Glutaminsynthetase kodiert, induziert, was zur Stickstoffassimilation führt (Löffler *et al.*, 2017). Dieses Operon wurde in allen talsperren-relevanten Isolaten gefunden. Es wird daher vermutet, dass beide Gattungen gut an den niedrigen Nitratgehalt angepasst sind, wobei *Lelliottia* weniger Nitrat zur Vermehrung benötigt, verglichen mit *Enterobacter*.

Phosphat ist ein weiterer essenzieller Nährstoff, der für das Wachstum von Bakterien notwendig ist und in oligotrophen Umgebungen begrenzend sein kann (Chudoba *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2010; Korajkic *et al.*, 2019; Procopio *et al.*, 2017; Šimek *et al.*, 2006; Wetzel, 2001). Dennoch ist der Phosphatgehalt in oligotrophen Gewässern sehr gering und liegt im Epilimnion zwischen 10–50  $\mu\text{g/l}$  (Wetzel, 2001), was den Werten dieser Arbeit vergleichbar ist (Tabelle A 4). Lediglich die Wahnbach Talsperre lag deutlich darüber, was aus früheren Studien bekannt ist (Bernhardt & Clasen, 1982; EEA & WHO, 2002; Kistemann *et al.*, 2002). Organismen, die hier leben, müssen daher an die geringe Nährstoffsituation angepasst sein. So verfügen *Enterobacter asburiae* und *Lelliottia* spp. über mehrere Phosphattransporter (*pit*, *pstSCAB*). Laut Temperton *et al.* (2011) ist zudem der Polyphosphat-Stoffwechsel in oligotrophen Umgebungen wichtig. Die daran beteiligten Gene (*ppk*) wurden in allen untersuchten Isolaten nachgewiesen und stellen daher vermutlich eine Anpassung an phosphatarme Umgebungen dar. Zudem scheint die Produktion alkalischer Phosphatase (PhoA) unter Phosphatmangel einen Wachstumsvorteil von Bakterien gegenüber Algen darzustellen, mit denen sie in einer Konkurrenzsituation um Phosphor stehen (Šimek *et al.*, 2006). Prinzipiell können alkalische Phosphatasen das Wachstum von Cyanobakterien fördern (Lin *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020), bei niedrigem Phosphatgehalt führen sie allerdings zum Gegenteil und begünstigen das Bakterienwachstum, sowie das Algensterben (Song *et al.*, 2018).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die talsperren-relevanten Arten sehr gut an oligotrophe Bedingungen mit einem niedrigen Nitrat- und Phosphatgehalt angepasst sind, zudem haben sie besonders in phosphatarmen Gewässern einen Wachstumsvorteil gegenüber Algen. Darüber hinaus sind sie auch an einen niedrigen Schwefel-, sowie Eisengehalt angepasst, indem sie beispielsweise Siderophore oder Eisentransporter besitzen, sowie unter Sulfatmangel alternative Schwefelquellen wie Alkansulfonat und Taurin nutzen können.

### 4.3.3 Zusammenhang mit dem Absterben des Phytoplanktons

Chlorophyll a ist der beste Indikator für die Biomasse des Phytoplanktons (Hintz *et al.*, 2020; Huot *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine negative Korrelation mit den coliformen Bakterien festgestellt. Zum Zeitpunkt der Massenvermehrung nimmt das Phytoplankton ab (Abbildung A 6). Dieser Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Aktivität in Gewässern und der Algenblüte (Berg *et al.*, 2009; Lehman *et al.*, 2021), beziehungsweise der anschließenden Sterbephase von Algen ist bereits beschrieben (Cole, 1982; Yankova *et al.*, 2017). Beim Absterben von Algen werden sehr viel gelöste organische Stoffe (DOM, engl. *dissolved*

*organic matter*) an die aquatische Umwelt abgegeben, darunter Zucker, Peptide und Aminosäuren (Bouteleux *et al.*, 2005). Sie dienen den Bakterien als Nahrungsquelle und können somit deren Vermehrung begünstigen (Amin *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2005). Aus diesem Grund ist die Region um Algen, die sogenannte Phycosphäre, häufig von Bakterien besiedelt (Cooper & Smith, 2015; Ramanan *et al.*, 2016; Seymour *et al.*, 2017), beispielsweise von *Enterobacter asburiae* (Hoke *et al.*, 2021). Der Überstand aus Algen kann coliformen Bakterien zum Wachstum verhelfen (Bouteleux *et al.*, 2005; Byappanahalli *et al.*, 2003; McFeters *et al.*, 1978). In einem Laborversuch wurde daher Pepton nach Rosenstock & Simon (1993) verwendet, um die gelösten organischen Aminosäuren zu simulieren, die in Oberflächengewässern dominieren. Tatsächlich stellte dies einen Wachstumsvorteil der coliformen Bakterien gegenüber der natürlichen Biozönose dar und bestätigt Ishii *et al.* (2020), wonach stickstoffhaltige Bestandteile, wie Aminosäuren, zum Wachstum benötigt werden.

Die dominanten Aminosäuren von Süßwasseralgen sind Glutamat, Glycin, Alanin, Serin, Aspartat und Isoleucin (Horňák *et al.*, 2017). Davon sind Alanin, Serin und Glycin besonders häufig in aquatischen Systemen (Crawford *et al.*, 1974; Robarts *et al.*, 1990; Sarmiento *et al.*, 2013; Tranvik & Jørgensen, 1995). Genau diese Aminosäuren (Serin, Aspartat, Glycin und Glutamat) werden nach Zampieri *et al.* (2019) in der Anfangsphase des mikrobiellen Wachstums in hohem Maße verbraucht und liefern Kohlenstoff und Stickstoff für ein schnelles Wachstum. Die Chemotaxis-Proteine für die Aminosäuren Serin (Tsr) und Aspartat (Tar), die es den Bakterien ermöglichen, sich gezielt darauf hinzubewegen, waren in den coliformen Bakterien vorhanden. Zudem haben die coliformen Bakterien viele Gene, die in Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechselweg stehen, und sind daher in der Lage, die von Algen abgegebenen Substanzen zu verwerten.

An Zuckern kommt neben Glucose, Mannose und Rhamnose sehr häufig Fucose in Algen und deren Exopolysacchariden (EPS, engl. *extracellular polymeric substance*) vor (Girollo & Vieira, 2005; Hecky *et al.*, 1973; Hepp *et al.*, 2016; Horňák *et al.*, 2017). *Lelliottia* unterscheidet sich unter anderem dadurch von *Enterobacter*, dass es Rhamnose verwerten, sowie Fucose erkennen und aufnehmen kann. Dazu dient das Fuc-Operon, es führt zu einer Chemotaxis in Richtung Fucose und steigert das Wachstum der Bakterien (Dwivedi *et al.*, 2016). Fucose kann von oligotrophen Bakterien genutzt werden (Wilkins *et al.*, 2014) und ist auch in der EPS von *Lelliottia amnigena* reichlich vorhanden (Cescutti *et al.*, 2005). Daher ist es denkbar, dass *Lelliottia* auf die von Algen abgegebene Fucose reagiert und sich anschließend gezielt zu den Algen hinbewegt, was zu einem Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bakterien führt.

Anders als *Enterobacter* besitzt *Lelliottia amnigena* zudem eine Poly-D-Mannuronat-Lyase (*algL*), die für die Lysierung und Nutzung von Alginat als Kohlenstoffquelle erforderlich ist (Wong *et al.*, 2000). Alginat ist ein Polysaccharid, das aus  $\beta$ -D-Mannuronat und  $\alpha$ -L-Guluronat besteht und von Algen und einigen Bakterien als strukturelle Komponente der Zellwand produziert wird (Bringloe *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2011; Usov *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2000). Möglicherweise haben lyase-produzierende Bakterien einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu anderen Bakterien (Wong *et al.*, 2000).

Bei der Genomanalyse zeigte sich, dass *Enterobacter* in der Lage ist, Chitin zu verwerten. Chitin ist das zweithäufigste Polysaccharid auf der Erde, welches in Pilzen, Insekten, Krustentieren und Algen, wie Diatomeen und Grünalgen, vorkommt (Durkin *et al.*, 2009; Kapaun & Reisser, 1995; Pearlmutter & Lembi, 1978). Die Interaktion zwischen Chitinase-produzierenden Bakterien und Kieselalgen wurde bereits untersucht (Li *et al.*, 2016; Meyer *et al.*, 2017), wobei eine Chemotaxis zu den Diatomeen, gefolgt von der Lyse der

Algenzellwände, festgestellt wurde. Von *Enterobacter asburiae* ist zudem eine algizide Aktivität beschrieben (He *et al.*, 2021). Dies könnte eine der Nährstoffquellen für die Bakterien darstellen, die in diesen oligotrophen Lebensräumen eine wichtige Rolle spielt. Zudem kann *Enterobacter asburiae*, sowie einige *Lelliottia*-Isolate Taurin als alternative Schwefelquelle aufnehmen und verwerten. Dieses kann zwischen Diatomeen und Bakterien ausgetauscht werden (Amin *et al.*, 2015).

Es wird daher davon ausgegangen, dass die Massenvermehrung coliformer Bakterien mit dem Absterben von Algen zusammenhängt. Um welche Algengruppen es sich dabei handelt, ist bislang nicht ausreichend geklärt, Untersuchungen deuten allerdings auf Diatomeen und Cyanobakterien hin (Leister *et al.*, 2021) (Abbildung A 6). Die Bakterien sind gut daran angepasst, von Algen abgegebene Substanzen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu nutzen, beispielsweise Aminosäuren, Chitin, Taurin, Alginat, Rhamnose und Fucose.

#### 4.3.4 Kollektives Verhalten und Motilität als Hilfsmittel der raschen Vermehrung

Eine weitere offene Frage ist, wie die coliformen Bakterien es schaffen, innerhalb kürzester Zeit die gesamte Talsperre in allen Tiefenschichten zu besiedeln, auch wenn diese geschichtet ist. Ein Grund ist sicherlich die betriebsbedingten Veränderungen des Wasserkörpers durch hypolimnischen Rohwasserentnahme, die unter anderem die Temperatur des Hypolimnions erhöht, wodurch die thermische Stabilität abnimmt (Çalışkan & Elçi, 2009; Casamitjana *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2019; Weber *et al.*, 2017). Zusätzlich können durch die Entnahme Auftriebskräfte entstehen, die sogar die Sprungschicht überschneiden (Çalışkan & Elçi, 2009; Fischer *et al.*, 1979). Dies könnte erklären, wie die Bakterien die Sprungschicht überwinden können und in allen Tiefenschichten vorkommen. Darüber hinaus haben coliforme Bakterien, auch viele Eigenschaften, die die aktive Besiedlung der Talsperre vereinfachen. So führt das Leben in oligotrophen Umgebungen laut Props *et al.* (2019) zur Genexpansionen in den Bereichen Motilität und Umweltsensorik, was hier der Fall ist, wie die Genomanalyse zeigte.

*Enterobacter* und *Lelliottia* sind bewegliche Bakterien mit peritrichen Flagellen (Brady *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2005a; Hormaeche & Edwards, 1960), diese sind wichtig für die Motilität, Chemotaxis, Kolonisierung, Adhäsion, Schwärmen und Biofilmbildung (Armitage & Berry, 2020; De Maayer & Cowan, 2016; Verstraeten *et al.*, 2008). Von beweglichen Zellen wurde beschrieben, dass diese in Süßgewässern saisonale Muster aufweisen, die mit den Zyklen der Primärproduzenten in Verbindung stehen, da sie von Algen stammendes organisches Material aufnehmen, was zu Chemotaxis der Bakterien führt (Pernthaler, 2017; Smriga *et al.*, 2016; Wentzky *et al.*, 2018). Insbesondere in oligotrophen Umgebungen ist es für Bakterien von Vorteil, ihre Wachstumsrate zu erhöhen (Šimek *et al.*, 2006). Dieser Lebensstyp wird als r-Strategie bezeichnet und ist vor allem von beweglichen Zellen bekannt (Rogge *et al.*, 2017).

Für Bakterien in einer sich schnell verändernden Umgebung ist nicht nur die Beweglichkeit entscheidend, sondern auch die gezielte Navigation zu einem Ziel (Wadhams & Armitage, 2004). Sie ermöglicht es Bakterien, durch chemische Gradienten zu navigieren, indem sie Veränderungen in den Signalen wahrnehmen (Ortega *et al.*, 2016; Wadhams & Armitage, 2004), wie zum Beispiel für *Enterobacter cloacae* eine Phosphattaxis beschrieben wird (Kato *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004). Besonders in oligotrophen Habitaten ist es von Vorteil, wenn auch niedrige Nährstoffkonzentrationen nachgewiesen und schnell erreicht werden können (Pernthaler, 2017). In aquatischen Umgebungen führt die gelöste organische Substanz, die

Phytoplanktonzellen umgibt, zu Chemotaxis bei Bakterien (Smriga *et al.*, 2016), beispielsweise durch Fucose (Dwivedi *et al.*, 2016).

Neben der schnellen und gezielten Fortbewegung ist auch die Kommunikation untereinander relevant. Quorum sensing ist ein, von der Zelldichte abhängiger, Kommunikationsprozess zwischen Bakterien, der kollektives Verhalten wie die Bildung von Biofilmen und die Produktion von Virulenzfaktoren ermöglicht (Mukherjee & Bassler, 2019; Papenfort & Bassler, 2016). Es hilft den Bakterien, auf sich rasch verändernde Umgebungen zu reagieren (Mukherjee & Bassler, 2019). Sowohl *Enterobacter* als auch *Lelliottia* sind als Quorum sensing-Bakterien bekannt (Kim *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2013), und enthielten auch in dieser Arbeit mehrere Quorum sensing-Systeme (*sdiA*, *luxD*, *Isr*, *qseBC*). Zusätzlich wurde in *Enterobacter asburiae* ein auf Acyl-Homoserin-Laktonen (AHL) basierendes System gefunden. Dieses wurde bereits in den Pflanzenpathogenen *Erwinia* und *Pantoea* beschrieben (Nasser *et al.*, 1998; Siddhardha *et al.*, 2020; von Bodman *et al.*, 1998) und in *Enterobacter asburiae* als *easI/R* bezeichnet (Lau *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2014). Es spielt auch eine Rolle bei der Biofilmbildung (Lau *et al.*, 2018). Die AHL-Synthase produziert AHL aus S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), das ein Produkt des Methionin-Salvage-Zyklus ist. Besonders für *Enterobacter asburiae* scheint daher das Quorum sensing zur Kommunikation eine entscheidende Rolle zu spielen.

Ein Biofilm ist definiert als ein Aggregat von Mikroorganismen, die in eine selbstproduzierte Matrix aus extrazellulärer polymerer Substanz eingebettet sind, und aneinander und/oder an einer Oberfläche haften (Vert *et al.*, 2012). Das bedeutet, dass die Bakterien Zellkontakt haben und daher miteinander interagieren (Flemming *et al.*, 2016). Fast alle Bakterien sind in der Lage, Biofilme zu bilden (Battin *et al.*, 2016). In Biofilmen kommunizieren Bakterien durch Quorum sensing (Flemming *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2014), denn gerade hier kann die Konzentration von AHLs im Vergleich zu anderen Umgebungen höher sein (Flemming *et al.*, 2016). Biofilme helfen den Bakterien, in hochgradig oligotrophen Umgebungen wie Seen und Flüssen zu wachsen, die durch niedrige Temperaturen und einen geringen Nährstoffgehalt gekennzeichnet sind (Bartrons *et al.*, 2012; Battin *et al.*, 2001). Wichtige Gene, die für die Bildung von Biofilmen eine Rolle spielen, wurden in den meisten untersuchten Genomen nachgewiesen. Der mit den talsperren-relevanten *Enterobacter asburiae* nahverwandte Stamm *Enterobacter asburiae* L1, der ebenfalls in diesen Genomvergleich einbezogen wurde, wurde als Biofilmbildner beschrieben (Lau *et al.*, 2018). Zudem zeigten die Autoren einen Zusammenhang zwischen den Quorum sensing-Genen *easI/R* und der Biofilmbildung auf.

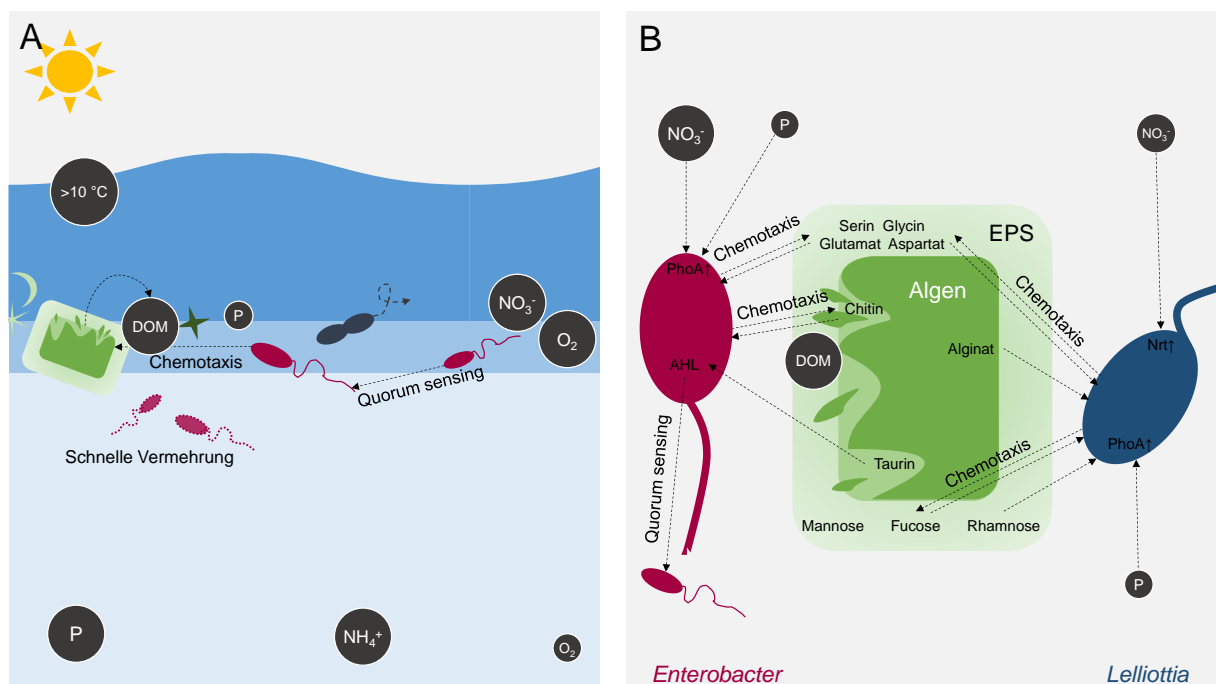
Zusammengenommen verfügen *Enterobacter* und *Lelliottia* spp. über eine große Anzahl von Genen, die mit kollektivem Verhalten und Motilität verbunden sind, verglichen mit der Gruppe der pathogenen *Enterobacterales*. Sie haben die Fähigkeit zu verschiedenen Lebensweisen, die ihnen helfen, mit sich schnell verändernden Umgebungen zurechtzukommen (Verstraeten *et al.*, 2008; Wadhams & Armitage, 2004). Dieser Effekt spiegelt sich in den ubiquitären Lebensräumen wider, in denen die Bakterien nachgewiesen werden.

### 4.3.5 Entwicklung einer Modellvorstellung

Eine Massenvermehrung ist gekennzeichnet durch ein explosionsartiges Wachstum innerhalb weniger Wochen, für *Lelliottia* spp. beginnend im Frühsommer, für *Enterobacter asburiae* im Spätsommer. Der Einbruch erfolgt in beiden Fällen etwa im Oktober mit der Herbstzirkulation. Coliforme Bakterien können gut mit den Temperaturen einer Trinkwassertalsperre umgehen und sind zudem an die Nährstoffsituation ihrer oligotrophen Umgebung angepasst. Es wird

davon ausgegangen, dass *Lelliottia* eine niedrigere Wassertemperatur und einen niedrigeren Nitratgehalt benötigt, was erklärt, warum diese Gattung das ganze Jahr über in Talsperren nachgewiesen werden konnte. Die Korrelationsanalyse deutet auf verschiedene Faktoren als Ursache für die Massenvermehrung coliformer Bakterien hin, diese hängen besonders mit dem stabil geschichteten Zustand der Talsperre zum Zeitpunkt der Vermehrung zusammen. Es wird davon ausgegangen, dass die Vermehrung im Epi- oder Metalimnion beginnt (Abbildung 4.1), da die Wassertemperatur mindestens 10 °C betragen muss.

Es wird davon ausgegangen, dass die coliformen Bakterien zu den „r-Strategen“ zu rechnen sind. Diese kennzeichnen sich dadurch, dass sie beweglich sind, chemische Gradienten wahrnehmen können und zudem eine hohe Vermehrungsrate aufweisen (Rogge *et al.*, 2017). Ihre Vermehrung steht mit dem Zyklus der Primärproduzenten in Verbindung, da sie von Algen stammendes organisches Material aufnehmen, was zu Chemotaxis führt (Pernthaler, 2017; Smriga *et al.*, 2016). Dies erklärt, warum sich die Bakterien bei einer geeigneten Nährstoffsituation innerhalb kürzester Zeit massenhaft vermehren. Dass *Lelliottia* andere Algensubstanzen verwerten kann, erklärt möglicherweise, warum beide Gattungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den Talsperren wachsen. Denn je nach Algenart besteht die DOM aus unterschiedlichen Substanzen. Zudem können saisonale Wachstumsmuster diverser Bakterien auf eine Spezialisierung der DOM zurückzuführen sein (Pernthaler, 2017). Beide Gattungen haben die Fähigkeit zu unterschiedlichen Lebensweisen, die ihnen helfen, mit sich schnell verändernden Umgebungen zurechtzukommen und diese optimal zu nutzen (Verstraeten *et al.*, 2008; Wadhams & Armitage, 2004).



**Abbildung 4.1 Modellvorstellung zur Massenvermehrung coliformer Bakterien in Talsperren.**

(A) Dargestellt ist in Situation in der Talsperre zum Zeitpunkt der Sommerstagnation, an deren Ende sterben die Algen ab und geben gelöste organische Substanz (DOM) an die Umwelt ab. Diese führt bei coliformen Bakterien zur Chemotaxis, die dadurch einen Vorteil gegenüber anderen, nicht motilen Bakterien haben. Quorum sensing hilft zudem der Kommunikation untereinander. Bedingt durch ihre Lebensweise als „r-Strategen“ ist es den coliformen Bakterien möglich, sich schnell zu vermehren. (B) Unterschiede in der Nutzung von Algensubstanz durch die Gattungen *Lelliottia* und *Enterobacter*, während *Lelliottia* Fucose zur Chemotaxis nutzt und Rhamnose und Alginat verwerten kann, nutzt *Enterobacter* Chitin zur Chemotaxis und kann dieses, sowie Taurin verwerten. Beide Gattungen nutzen zudem Aminosäuren und haben bei niedrigem Phosphatgehalt einen Vorteil gegenüber den Algen. *Lelliottia* spp. kann zudem mit einem niedrigeren Nitratgehalt umgehen im Vergleich zu *Enterobacter*.

## 4.4 Bewertung der hygienischen Relevanz

### 4.4.1 Pathogenitätsfaktoren

Die Pathogenität von Bakterien hängt von mehreren Faktoren ab, wie der Toxinproduktion, Adhäsion, Invasion oder Biofilmbildung. Dennoch sind für die Pathogenität von *Enterobacter* bislang nur wenige Virulenzgene beschrieben (Davin-Regli *et al.*, 2019). Es ist bekannt, dass sie Enterotoxine, Hämolyse und Zytotoxine produzieren können (Barnes *et al.*, 1997; Krzymińska *et al.*, 2009; Mezzatesta *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2008). Hämolyse sind nicht nur in pathogenen, sondern auch in Umweltbakterien weit verbreitet (Kim *et al.*, 2015; Mulamattathil *et al.*, 2014; Sidhu *et al.*, 2020). Dennoch wurden in den talsperren-relevanten Bakterien im Vergleich zu *Escherichia* und *Salmonella* keine Gene für Hämolyse sowie das zugehörige Sekretionssystem Typ I (T1SS) gefunden. Auch für Cytotoxine wurden keine Gene gefunden, was im Kontrast zu *Enterobacter cloacae*-Stämmen steht (Paton & Paton, 1996). Eine Pathogenität aufgrund von Toxinen wird daher nicht vermutet.

Das Typ III Sekretionssystem (T3SS) ist ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor in gramnegativen Bakterien, der es ermöglicht, Virulenzfaktoren, in die Wirtszelle abzusondern (Davin-Regli *et al.*, 2019; Dobrindt *et al.*, 2004; Green & Meccas, 2016; Mezzatesta *et al.*, 2012). Es ist aus pathogenen Bakterien wie *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* bekannt (Stuber *et al.*, 2003; Troisfontaines & Cornelis, 2005). Aber nicht nur tierische, auch pflanzliche Krankheitserreger nutzen das T3SS (Büttner & Bonas, 2003; Charkowski *et al.*, 2012; Staskawicz *et al.*, 2001). Von Stuber *et al.* (2003) ist bekannt, dass in Umweltbakterien im Vergleich zu Fäkalbakterien T3SS-Gene fehlen. Daher wird das Vorhandensein von T3SS als allgemeiner Indikator für die Virulenz von Bakterien verwendet (Stuber *et al.*, 2003). Auch das T1SS trägt bei verschiedenen Bakterien zur Virulenz bei, z. B. bei *E. coli* durch die Sekretion des Hämolyse HylA (Green & Meccas, 2016). Das Fehlen dieser beiden Sekretionssysteme in den talsperren-relevanten Isolaten kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Bakterien nicht pathogen sind, weder für Tiere noch für Pflanzen.

Stattdessen wurden andere Sekretionssysteme gefunden, wie Typ II (T2SS), Typ VI (T6SS), Sec-SRP (Secretion signal recognition particle) und Tat (twin-arginine translocase). Sec-SRP und der Tat sind in allen Domänen des Lebens gängige Systeme für den Transport von Proteinen durch die Membran (Natale *et al.*, 2008). Proteine, die über dieses System transportiert werden, verbleiben im Inneren der Zelle oder werden durch das T2SS, das sich in der äußeren Membran befindet, nach außen transportiert (Green & Meccas, 2016). Sowohl T2SS als auch T6SS werden in pathogenen, wie nicht-pathogenen Bakterien gefunden (Andrés-Barrao *et al.*, 2017). Zudem ist T2SS in *Lelliottia* spp. und *Enterobacter asburiae* beschrieben (Mustafa *et al.*, 2020). Von T6SS ist bekannt, dass es bei der bakteriellen Interaktion eine entscheidende Rolle spielt (Liu *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2014). Es ermöglicht die Bekämpfung konkurrierender Bakterien, führt zur erhöhten Fitness, und wurde bisher lediglich bei Bakterien gefunden, die in Konkurrenz leben (Russell *et al.*, 2014). Die Aktivierung von T6SS kann zudem benachbarte Bakterien stimulieren, wird durch Quorum sensing, hohe Zelldichten oder Umweltfaktoren reguliert und ist auch an der Biofilmbildung beteiligt (de Pace *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2014; Silverman *et al.*, 2012). Außerdem ist bekannt, dass einige Bodenbakterien, die nicht über das T6SS verfügen, einen Nachteil gegenüber der Biozönose haben (Varivarn *et al.*, 2013). Da die meisten Bakterien mit T6SS keine Krankheitserreger sind, wird davon ausgegangen, dass sie in der Umwelt, z. B. in Pflanzen und im Boden, eine wichtige Rolle spielen (Russell *et al.*, 2014; Silverman *et al.*, 2012).



Eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von Bakterien spielt die Fähigkeit der Adhäsion und Invasion durch Pili oder Fimbrien (Bardiaux *et al.*, 2019; Luna Rico *et al.*, 2019; Volkan *et al.*, 2015). Diese können zudem für die Biofilmbildung und die Drehbewegung wichtig sein (Kearns, 2010). In den talsperren-relevanten Stämmen wurden diverse Gene, die mit der Adhäsion und Invasion in Verbindung stehen, nachgewiesen, beispielsweise Typ 1 Pili (*fimACDFGH*) und Curli-Fimbrien (*csgABCEFG*). Beide spielen eine Rolle bei der Biofilmbildung und sind von *Enterobacteriaceae* bekannt (Davin-Regli *et al.*, 2019; de Pace *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). Letzteres ist mit T6SS assoziiert (de Pace *et al.*, 2010). Typ 4 Pili werden als die häufigsten und ältesten Oberflächenstrukturen in Prokaryoten beschrieben (Luna Rico *et al.*, 2019; Pelicic, 2008). Daher ist es nicht überraschend, dass die zugehörigen Gene (*ppdABCD*, *hofBC*, *hofMNOQ*) in allen untersuchten Isolaten nachgewiesen wurden. Zusammen mit T2SS bilden sie die Typ 4-Filament-Superfamilie (Luna Rico *et al.*, 2019). Obwohl sie in Enterobakterien weit verbreitet sind, ist ihre biologische Rolle nur unzureichend verstanden. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der bakteriellen Kommunikation und bei Biofilmen spielen und eine große Menge an extrazellulärer DNA enthalten (Palchevskiy & Finkel, 2006), die von Bakterien aktiv für Quorum sensing oder regulatorische Prozesse freigesetzt werden kann (Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine Gene für T3SS in den Genomen gefunden werden konnten, welches als allgemeiner Indikator für die Virulenz von Bakterien gewertet wird (Stuber *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurden keine Gene für Cytotoxine oder Hämolyse gefunden, von denen angenommen wird, dass sie zur Pathogenität von *Enterobacter* beitragen (Mezzatesta *et al.*, 2012). Dies steht im Gegensatz zu einigen *Enterobacter cloacae*-Stämmen (Paton & Paton, 1996), sowie *Escherichia* und *Salmonella*. Aufgrund dieser Tatsache kann eine reduzierte Virulenz der Stämme angenommen werden. Stattdessen wurden Gene gefunden, die den Stämmen einen Vorteil in Konkurrenzsituationen verschaffen, sowie der Kommunikation untereinander dienen. Wie Annavajhala *et al.* (2019) in ihrer Studie feststellten, führt jedoch nicht eine erhöhte Virulenz, sondern der weit verbreitete Einsatz von Antibiotika zum Erfolg von *Enterobacter* spp. in nosokomialen Umgebungen. Aus diesem Grund wurden auch die Antibiotikaresistenzgene genauer betrachtet.

#### 4.4.2 Antibiotikaresistenz

Enterobakterien stehen als Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamase-produzierende Bakterien (ESBL) und Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (CRE) im Blick der Aufmerksamkeit (Annavajhala *et al.*, 2019; Davin-Regli *et al.*, 2019; Ruppé *et al.*, 2015). Die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist nicht überraschend, da sie weit verbreitet und seit langem bekannt sind (Abraham & Chain, 1940; Fleming, 1929).  $\beta$ -Laktamasen werden nach der Ambler-Klassifikation in vier Klassen eingeteilt (Annavajhala *et al.*, 2019; Ruppé *et al.*, 2015). Serin- $\beta$ -Laktamasen (Klasse A und D) und Metall- $\beta$ -Laktamasen (Klasse B) wurden als wichtigste Carbapenemasen in CRE identifiziert, einschließlich KPC, VIM, IMP, NDM und OXA (Chavda *et al.*, 2016). ESBL, einschließlich der  $\beta$ -Laktamasen der Klasse A TEM, SHV und CTX-M, verleihen Resistenz gegen Cephalosporine und Monobactame (Annavajhala *et al.*, 2019).

Beim Vergleich der aus talsperren-relevanten Stämme mit dem carbapenem-resistenten, klinischen Stamm *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* PIMB10EC27 (Le-Ha *et al.*, 2019), konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der  $\beta$ -Laktamasen reduziert ist und keine Carbapenemasen und ESBLs in den talsperren-relevanten Stämmen nachgewiesen wurden. Stattdessen enthielten alle Stämme Gene, die für  $\beta$ -Laktamasen der Klasse C (*ampC*) kodieren. *Enterobacter* spp. bilden eine intrinsische Resistenz gegen Cephalosporine,

ursprünglich durch chromosomal kodierte Serin- $\beta$ -Laktamasen (Klasse C) AmpC (Bradford *et al.*, 1997). Plasmid-vermittelte Enzyme, die von der AmpC- $\beta$ -Laktamase von *Enterobacter cloacae* abstammen (ACT, MIR, LAT, CMY) wurden jedoch auch in anderen Spezies, wie *Enterobacter asburiae*, gefunden (Bradford *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2005a; Iredell *et al.*, 2016; Mezzatesta *et al.*, 2012; Rottman *et al.*, 2002). Die Sequenz dieser Gene variiert stark (Jacoby, 2009), was erklärt, warum bei jeder Art eine andere  $\beta$ -Laktamase der Klasse C gefunden wurde. Diese Gene sind aus der aquatischen Umwelt bekannt (Coertze & Bezuidenhout, 2019). Klasse C  $\beta$ -Laktamasen dieser Familien wurden sowohl bei *Lelliottia* spp. als auch bei *Enterobacter asburiae* gefunden. Nach Stange *et al.* (2016), ist das Vorhandensein dieses Gens allerdings nicht immer mit einer phänotypischen Antibiotikaresistenz gekoppelt. Zur Analyse der phänotypischen Antibiotikaresistenz wurde daher ein Antibiogramm durchgeführt. Von allen getesteten Antibiotika und Stämmen wurde nur bei einem Stamm, nämlich *Enterobacter asburiae* TZW11, eine Resistenz gegen das Cephalosporin Ceftazidim festgestellt, was einem Anteil von 9 % entspricht. Die Resistenz ist daher im Vergleich zu klinischen Isolaten deutlich niedriger (Mishra *et al.*, 2020).

Stattdessen wurde in 45 % der *Enterobacter asburiae*-Isolaten eine Resistenz gegen Fosfomycin, sowie das zuständige Antibiotikaresistenzgen (*fosA*) gefunden. Dabei handelt es sich nicht um eine erworbene, sondern um eine natürliche, chromosomale Resistenz von *Enterobacter asburiae* und *Enterobacter cloacae*, die bereits beschrieben wurde (Ito *et al.*, 2017; Mezzatesta *et al.*, 2012). Diese ist nicht nur in *Enterobacter*, sondern allgemein in gramnegativen Bakterien weit verbreitet (Ito *et al.*, 2017).

Zudem wurden in allen *Enterobacter asburiae*-Stämmen Homologe der vor allem aus grampositiven Bakterien bekannten antimikrobiellen Peptidresistenzgene (*dltABCD*) nachgewiesen. Diese Gene weisen eine Resistenz gegen Polymyxin B auf, im Antibiogramm wurde jedoch keine Resistenz gefunden. Diese Gene wurden nur in wenigen anderen gramnegativen Bakterien wie *Bordetella pertussis* oder phytopathogenen oder entomopathogenen Bakterien wie *Photobacterium luminescens*, *Pectobacterium* spp. sowie *Dickeya* spp. gefunden (Abi Khattar *et al.*, 2009; Pandin *et al.*, 2016; Taneja *et al.*, 2013). Ähnlichkeiten in der Organisation der *dlt*-Operons wurden zwischen *Enterobacter*, *Dickeya* und *Pectobacterium* festgestellt (Taneja *et al.*, 2013). Während die Rolle dieses Operons in grampositiven Bakterien gut verstanden ist (LaRock & Nizet, 2015), muss seine Funktion in gramnegativen Bakterien noch geklärt werden (Pandin *et al.*, 2016). Es wird angenommen, dass es mit dem phyto- und entomopathogenen Lebensstil dieser Bakterien zusammenhängt (Abi Khattar *et al.*, 2009; Pandin *et al.*, 2016), was allerdings dem widerspricht, dass die talsperren-relevanten Bakterien nicht über den Virulenzfaktor T3SS verfügen. Eine genaue Funktion dieser Gene in *Enterobacter asburiae* ist daher noch nicht ausreichend geklärt.

Anders als andere coliforme Bakterien verfügen sie nicht über Gene für die Resistenz gegen Colistin (*mcr*) (Sato *et al.*, 2021), Aminoglykoside (*aac*, *aph*), Tetracycline (*tetD*) und Sulfonamide (*sul2*) oder  $\beta$ -Laktamasen der Klasse A und B (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SVH</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*). Lediglich ein Teil der *Enterobacter*-Isolate verfügt über eine natürliche Resistenz gegenüber Fosfomycin (*fosA*), sowie ein Isolat auch gegenüber Ceftazidim. Bei *Lelliottia* konnte keine Antibiotikaresistenz festgestellt werden. Bei den zur Massenvermehrung befähigten Spezies coliformer Bakterien handelt es sich daher um typische „Umweltcoliforme“, die über keine der für *Enterobacter* relevanten Pathogenitätsfaktoren verfügen (Mezzatesta *et al.*, 2012; Stuber *et al.*, 2003), sowie über eine reduzierte Antibiotikaresistenz im Vergleich zu klinischen Isolaten verfügen (Mishra *et al.*, 2020). Daher sind sie als nicht hygienisch relevant zu bewerten.

## 4.5 Konsequenzen für die Wasserversorgung

Der Klimawandel führt zu höheren Wassertemperaturen und extremen Wetterereignisse, nicht nur in natürlichen Gewässern, sondern auch in Gewässern, die für die Trinkwasseraufbereitung verwendet werden, wie Talsperren (Bates *et al.*, 2008; Mi *et al.*, 2020). So sind Dürren, Starkregenereignisse und Überschwemmungen häufiger zu erwarten. Da Massenvermehrungen von coliformen Bakterien vorzugsweise in heißen und trockenen Jahren auftreten, mit dadurch bedingter längerer Schichtungsperiode und geringen Zuflussmengen (siehe Kapitel 4.3), wird erwartet, dass dieses Phänomen in naher Zukunft häufiger, sowie in weiteren Talsperren, auftreten wird.

Dies stellt eine Herausforderung für die Trinkwasseraufbereitung dar. Derzeit werden in Aufbereitungsanlagen, die mit Talsperrenwasser arbeiten, hauptsächlich konventionelle Aufbereitungstechniken wie die Flockungsfiltration mit anschließender Desinfektion eingesetzt. Untersuchungen im Wasserwerk bestätigten, dass diese in Zeiten der Massenvermehrung coliformer Bakterien mit Konzentrationen von  $10^3$  MPN/100 ml und mehr nicht immer ausreichend ist. Die Eliminationsleistung betrug für die konventionelle Trinkwasseraufbereitung mittels Flockenfiltration 1,5 bis 4,5  $\log_{10}$ -Stufen, was vergleichbar oder höher war als von Ho *et al.* (2012) beschrieben. Eine vorgeschaltete Ozonungsstufe erreicht gemeinsam mit der Flockungsfiltration dagegen eine deutlich höhere Eliminationsrate mit 5 bis 6  $\log_{10}$ -Stufen.

Ziel der darauf folgenden Desinfektion ist eine Abtötung von mindestens 4  $\log_{10}$ -Stufen (UBA, 2010), diese Eliminationsleistung kann bei coliformen Bakterien in der Regel bereits nach kurzer Zeit erreicht werden (Hamsch *et al.*, 2016). Allerdings konnten in einem Wasserwerk mit konventioneller Aufbereitung in angereicherten Proben noch coliforme Bakterien nach der Desinfektion nachgewiesen werden, wenn auch in allen Fällen unter dem Grenzwert der TrinkwV ( $<1$  MPN/100 ml). Theoretisch kann es dadurch zu einem Eintrag niedriger Konzentrationen coliformer Bakterien in die Verteilungssysteme kommen.

Wenn coliforme Bakterien in Trinkwasserverteilungssysteme gelangen, können sie sich im Biofilm oder in Sedimenten innerhalb des Systems vermehren (Camper, 1993; Chen *et al.*, 2019; Edberg *et al.*, 1994; Hamsch *et al.*, 2012; LeChevallier *et al.*, 1996). Es konnte auch im Rahmen von Vermehrungsversuchen bestätigt werden, dass es den coliformen Bakterien unter bestimmten Bedingungen möglich ist, sich im Reinwasser vor Abschlussdesinfektion zu vermehren (Kapitel 3.7.1). Dies könnte zur Überschreitung von Grenzwerten führen (z. B. sollten laut EU-Trinkwasserrichtlinie coliforme Bakterien in 100 ml nicht nachweisbar sein), woraufhin oft Gegenmaßnahmen wie zusätzliche Desinfektionsmaßnahmen oder sogar Abkochempfehlungen ergriffen werden.

Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei der Massenvermehrung coliformer Bakterien in Talsperren um einen internen Prozess handelt, der nicht mit einer fäkalen Kontamination in Verbindung steht. Vielmehr vermehren sich einzelne Stämme coliformer Bakterien, die den sogenannten „Umweltcoliformen“ zugordnet werden können und somit als nicht hygienisch relevant einzustufen sind. Der Nachweis dieser coliformen Bakterien hat somit keine Indikatorfunktion für eine fäkale Verunreinigung, was bei der Bewertung im Einzelfall beachtet werden sollte.

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Massenvermehrung coliformer Bakterien in Oberflächengewässern untersucht. Es wurde festgestellt, dass es sich dabei um einen talsperren-internen Prozess handelt, der nicht auf eine fäkale Verunreinigung zurückzuführen ist und von einigen wenigen Arten der Gattungen *Enterobacter* und *Lelliottia* ausgeht. Zudem sind die Bakterien als nicht hygienisch relevant einzustufen. Verschiedene Faktoren (Temperatur, Sauerstoff, pH-Wert, Chlorophyll, Nährstoffe) korrelieren mit diesem Phänomen. Zudem deuten Vermehrungsversuche darauf hin, dass Aminosäuren eine wichtige Nährstoffquelle sein können. Freie, gelöste Aminosäuren sind ein natürlicher Bestandteil oligotropher Gewässer und werden beispielsweise von Algen abgegeben. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Vermehrung ab einer Wassertemperatur von 10 °C während der Sommerstagnation, nach dem Algensterben im Epi- bzw. Metalimnion beginnt und sich dann rasant über den Wasserkörper ausbreitet. Um diese These zu verifizieren, könnten weitere Talsperren in verschiedenen Wassertiefen beprobt, und die coliformen Bakterien gemeinsam mit den Algengruppen analysiert werden. In weiteren Vermehrungsversuchen könnte der Nährstoffeinfluss der Algen, sowie einzelner Aminosäuren genauer untersucht werden, um zu testen, welche davon eine entscheidende Rolle spielen.

Während dieser Arbeit wurden die Genome von 21 Isolaten coliformer Bakterien sequenziert und mit teils klinischen und pathogenen Isolaten verglichen. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass diese eine nahe Verwandtschaft aufweisen können. In weiteren Untersuchungen könnten fäkale Stämme des *Enterobacter cloacae*-Komplexes isoliert und deren Genom sequenziert werden, um festzustellen, ob sich fäkale und nicht-fäkale Eintragsquellen differenzieren lassen. Gezielte Genomanalysen könnten die Frage mögliche Anpassungen an den Lebensraum Darm beziehungsweise Umwelt klären. Diese Unterscheidung ist von essentieller Bedeutung bei der Interpretation eines Nachweises coliformer Bakterien, denn lediglich bei einem Hinweis auf eine fäkale Belastung ist beispielsweise ein Abkochgebot von Nöten.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Identifizierung für die talsperren-relevanten Arten (*Enterobacter asburiae*, *Lelliottia amnigena*, *Lelliottia aquatilis*) etabliert, dennoch bleibt die Identifizierung, besonders von *Enterobacter*, komplex. Aus diesem Grund sollten weitere Arten des *Enterobacter cloacae*-Komplexes in die Datenbank des MALDI-TOF eingespeichert werden. Theoretisch bietet das MALDI-TOF die Möglichkeit, Stämme unterschiedlicher Quellen zu unterscheiden, dies sollte für die fäkalen *Enterobacter*-Stämme und die talsperren-internen Stämmen geprüft werden. Die exakte taxonomische Einordnung coliformer Bakterien, sowie die Beurteilung der hygienischen Relevanz ist für die Bewertung eines Nachweises unerlässlich. Daher ist es essentiell, das Phänomen der Massenvermehrung exakt von einer fäkalen Belastung differenzieren zu können, insbesondere da erwartet wird, dass das Phänomen klimabedingt zum Regelfall werden wird.

# Literaturverzeichnis

- Abbott, S. L. (2011):** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. In: Versalovic, J., Jorgensen, J. H., Funke, G., Warnock, D. W., Landry, M. L. und Carroll, K. C. (Hg.): *Manual of Clinical Microbiology*. 10. Aufl.: *American Society of Microbiology*.
- Abi Khattar, Z.; Rejasse, A.; Destoumieux-Garzón, D.; Escoubas, J. M.; Sanchis, V.; Lereclus, D.; Givaudan, A.; Kallassy, M.; Nielsen-Leroux, C.; Gaudriault, S. (2009):** The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. In: *J. Bacteriol.* **191 (22)**: 7063–7073. doi: 10.1128/JB.00892-09.
- Abraham, E. P.; Chain, E. (1940):** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. In: *Nature (3713)*: 837.
- Adeolu, M.; Alnajjar, S.; Naushad, S.; Gupta, R. S. (2016):** Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales'. Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **66 (12)**: 5575–5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.
- Ahmed, W.; Hughes, B.; Harwood, V. (2016):** Current status of marker genes of *Bacteroides* and related taxa for identifying sewage pollution in environmental waters. In: *Water* **8 (6)**: 231. doi: 10.3390/w8060231.
- Akima, H.; Gebhardt, A. (2016):** akima: Interpolation of irregularly and regularly spaced data. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=akima>.
- Akita, H.; Matsushika, A.; Kimura, Z.-I. (2019):** *Enterobacter oligotrophica* sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. In: *MicrobiologyOpen*: e843. doi: 10.1002/mbo3.843.
- Aljorayid, A.; Viau, R.; Castellino, L.; Jump, R. L. P. (2016):** *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. In: *IDCases* **5**: 6–8. doi: 10.1016/j.idcr.2016.05.003.
- Alnajjar, S.; Gupta, R. S. (2017):** Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. In: *Infect. Genet. Evol.* **54**: 108–127. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.024.
- Amin, S. A.; Hmelo, L. R.; van Tol, H. M.; Durham, B. P.; Carlson, L. T.; Heal, K. R.; Morales, R. L.; Berthiaume, C. T.; Parker, M. S.; Djunaedi, B.; Ingalls, A. E.; Parsek, M. R.; Moran, M. A.; Armbrust, E. V. (2015):** Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. In: *Nature* **522 (7554)**: 98–101. doi: 10.1038/nature14488.
- Amin, S. A.; Parker, M. S.; Armbrust, E. V. (2012):** Interactions between diatoms and bacteria. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76 (3)**: 667–684. doi: 10.1128/MMBR.00007-12.
- Andrés-Barrao, C.; Lafi, F. F.; Alam, I.; de Zélicourt, A.; Eida, A. A.; Bokhari, A.; Alzubaidy, H.; Bajic, V. B.; Hirt, H.; Saad, M. M. (2017):** Complete genome sequence analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a plant multi-stress tolerance promoting endophytic bacterium. In: *Front. Microbiol.* **8**: 2023. doi: 10.3389/fmicb.2017.02023.
- Annavajhala, M. K.; Gomez-Simmonds, A.; Uhlemann, A.-C. (2019):** Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. In: *Front. Microbiol.* **10**: 154. doi: 10.3389/fmicb.2019.00044.
- Anwar, M. Z.; Zervas, A.; Hansen, L. H.; Barker, G.; Anesio, A. M.; Jacobsen, C. S. (2020):** Complete genome and plasmid sequences of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis PT1, obtained from the *Salmonella* Reference Laboratory at Public Health England, Colindale, United Kingdom. In: *Microbiol. Resour. Announc.* **9 (2)**: e01064-19. doi: 10.1128/MRA.01064-19.

- Armitage, J. P.; Berry, R. M. (2020):** Assembly and dynamics of the bacterial flagellum. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **74**: 181–200. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093411.
- Ashbolt, N. J. (2004):** Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. In: *Toxicology* **198 (1-3)**: 229–238. doi: 10.1016/j.tox.2004.01.030.
- Atherholt, T. B.; Procopio, N. A.; Goodrow, S. M. (2017):** Seasonality of coliform bacteria detection rates in New Jersey domestic wells. In: *Ground Water* **55 (3)**: 346–361. doi: 10.1111/gwat.12482.
- Aziz, R. K.; Bartels, D.; Best, A. A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Osterman, A. L.; Overbeek, R. A.; McNeil, L. K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. (2008):** The RAST Server. Rapid annotations using subsystems technology. In: *BMC Genomics* **9**: 75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Baker, C. S.; Morozov, I.; Suzuki, K.; Romeo, T.; Babitzke, P. (2002):** CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. In: *Mol. Microbiol.* **44 (6)**: 1599–1610. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02982.x.
- Baldauf, G.; Böckle, K.; Kiefer, J.; Lipp, P.; Müller, U.; Sturm, S. (2003):** Neuartige Kriterien zur Beurteilung der Notwendigkeit und Art von Aufbereitungsmaßnahmen bei Vorliegen mikrobiell belasteter Rohwässer. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **19**: 1–92.
- Balzer, M.; Witt, N.; Flemming, H.C.; Wingender, J. (2010):** Faecal indicator bacteria in river biofilms. In: *Water Sci. Technol. Water Supply* **61 (5)**: 1105–1111. doi: 10.2166/wst.2010.022.
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S.; Lesin, V. M.; Nikolenko, S. I.; Pham, S.; Prjibelski, A. D.; Pyshkin, A. V.; Sirotkin, A. V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M. A.; Pevzner, P. A. (2012):** SPAdes. A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. In: *J. Comput. Biol.* **19 (5)**: 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Bardiaux, B.; de Amorim, G. C.; Luna Rico, A.; Zheng, W.; Guilvout, I.; Jollivet, C.; Nilges, M.; Egelman, E. H.; Izadi-Pruneyre, N.; Francetic, O. (2019):** Structure and assembly of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type 4 pilus. In: *Structure* **27 (7)**: 1082–1093.e1–e5. doi: 10.1016/j.str.2019.03.021.
- Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. (2016):** Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80 (1)**: 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15.
- Barnes, A. I.; Ortiz, C.; Paraje, M. G.; Balanzino, L. E.; Albesa, I. (1997):** Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. In: *Can. J. Microbiol.* **43 (8)**: 729–733. doi: 10.1139/m97-105.
- Barria, C.; Malecki, M.; Arraiano, C. M. (2013):** Bacterial adaptation to cold. In: *Microbiology* **159 (12)**: 2437–2443. doi: 10.1099/mic.0.052209-0.
- Bartrons, M.; Catalan, J.; Casamayor, E. O. (2012):** High bacterial diversity in epilithic biofilms of oligotrophic mountain lakes. In: *Microb. Ecol.* **64 (4)**: 860–869. doi: 10.1007/s00248-012-0072-4.
- Bates, B.; Kundzewicz, Z. W.; Wu, S.; Burkett, V.; Doell, P.; Gwary, D.; Hanson, C.; Heij, B.; Jiménez, B.; Kaser, G.; Kitoh, A.; Kovats, S.; Kumar, P.; Magadza, C.H.D.; Martino, D.; Mata, L.; Medany, M.; Miller, K.; Arnell, N. (2008):** Climate change and water. Technical paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (Hg.). Geneva, Switzerland.
- Battin, T. J.; Besemer, K.; Bengtsson, M. M.; Romani, A. M.; Packmann, A. I. (2016):** The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **14 (4)**: 251–263. doi: 10.1038/nrmicro.2016.15.

- Battin, T. J.; Wille, A.; Sattler, B.; Psenner, R. (2001):** Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **67 (2)**: 799–807. doi: 10.1128/AEM.67.2.799–807.2001.
- Behera, B.; Mathur, P.; Das, A.; Kapil, A.; Gupta, B.; Bhoi, S.; Farooque, K.; Sharma, V.; Misra, M. C. (2010):** Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. In: *Int. J. Infect. Dis.* **14 (7)**: e596–601. doi: 10.1016/j.ijid.2009.09.001.
- Benagli, C.; Rossi, V.; Dolina, M.; Tonolla, M.; Petrini, O. (2011):** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. In: *PLoS ONE* **6 (1)**: e16424. doi: 10.1371/journal.pone.0016424.
- Berg, K. A.; Lyra, C.; Sivonen, K.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Tuomi, P.; Rapala, J. (2009):** High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. In: *ISME J.* **3 (3)**: 314–325. doi: 10.1038/ismej.2008.110.
- Bernhardt, H.; Clasen, J. (1982):** Limnological effects of the elimination of phosphorus from the Wahnbach Reservoir. In: *Water Sci. Technol.* **14 (4-5)**: 397–406. doi: 10.2166/wst.1982.0115.
- Berrazeg, M.; Diene, S. M.; Drissi, M.; Kempf, M.; Richet, H.; Landraud, L.; Rolain, J.-M. (2013):** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. In: *PLoS ONE* **8 (4)**: e61428. doi: 10.1371/journal.pone.0061428.
- Bertelli, C.; Greub, G. (2013):** Rapid bacterial genome sequencing. Methods and applications in clinical microbiology. In: *Clin. Microbiol. Infect.* **19 (9)**: 803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217.
- Bizzini, A.; Greub, G. (2010):** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. In: *Clin. Microbiol. Infect.* **16 (11)**: 1614–1619. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x.
- Böhlke, J. K.; Smith, R. L.; Miller, D. N. (2006):** Ammonium transport and reaction in contaminated groundwater. Application of isotope tracers and isotope fractionation studies. In: *Water Resour. Res.* **42 (5)**: 2699. doi: 10.1029/2005WR004349.
- Borcard, D.; Gillet, F.; Legendre, P. (2018):** Numerical ecology with R. Second edition. Use R! Cham: Springer International Publishing; Springer.
- Bouteleux, C.; Saby, S.; Tozza, D.; Cavard, J.; Lahoussine, V.; Hartemann, P.; Mathieu, L. (2005):** *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **71 (2)**: 734–740. doi: 10.1128/AEM.71.2.734–740.2005.
- Bradford, P. A.; Urban, C.; Mariano, N.; Projan, S. J.; Rahal, J. J.; Bush, K. (1997):** Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* **41 (3)**: 563–569. doi: 10.1128/AAC.41.3.563.
- Brady, C.; Cleenwerck, I.; Venter, S.; Coutinho, T.; de Vos, P. (2013):** Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. In: *Syst. Appl. Microbiol.* **36 (5)**: 309–319. doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.005.

- Brady, C.; Cleenwerck, I.; Venter, S.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Coutinho, T. (2008):** Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). In: *Syst. Appl. Microbiol.* **31 (6-8)**: 447–460. doi: 10.1016/j.syapm.2008.09.004.
- Brenner, D. J.; McWhorter, A. C.; Kai, A.; Steigerwalt, A. G.; Farmer, J. J. (1986):** *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. In: *J. Clin. Microbiol.* **23 (6)**: 1114–1120. doi: 10.1128/JCM.23.6.1114-1120.1986.
- Brettin, T.; Davis, J. J.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Gerdes, S.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Shukla, M.; Thomason, J. A.; Stevens, R.; Vonstein, V.; Wattam, A. R.; Xia, F. (2015):** RASTtk. A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. In: *Sci. Rep.* **5**: 8365. doi: 10.1038/srep08365.
- Briani, F.; Carzaniga, T.; Dehò, G. (2016):** Regulation and functions of bacterial PNPase. In: *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **7 (2)**: 241–258. doi: 10.1002/wrna.1328.
- Bringloe, T. T.; Starko, S.; Wade, R. M.; Vieira, C.; Kawai, H.; de Clerck, O.; Cock, J. M.; Coelho, S. M.; Destombe, C.; Valero, M.; Neiva, J.; Pearson, G. A.; Faugeron, S.; Serrão, E. A.; Verbruggen, H. (2020):** Phylogeny and evolution of the brown algae. In: *Crit. Rev. Plant Sci.* **39 (4)**: 281–321. doi: 10.1080/07352689.2020.1787679.
- Broberg, C. A.; Wu, W.; Cavalcoli, J. D.; Miller, V. L.; Bachman, M. A. (2014):** Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* Strain ATCC 43816 KPPR1, a rifampin-resistant mutant commonly used in animal, genetic, and molecular biology studies. In: *Genome Announc.* **2 (5)**. doi: 10.1128/genomeA.00924-14.
- Bundesministerium für Gesundheit (BMG); Umweltbundesamt (UBA) (2013):** Leitlinien zum Vollzug der §§ 9 und 10 der Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001).
- Büttner, D.; Bonas, U. (2003):** Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* **6 (4)**: 312–319. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00064-5.
- Byappanahalli, M. N.; Nevers, M. B.; Korajkic, A.; Staley, Z. R.; Harwood, V. J. (2012):** Enterococci in the environment. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76 (4)**: 685–706. doi: 10.1128/MMBR.00023-12.
- Byappanahalli, M. N.; Shively, D. A.; Nevers, M. B.; Sadowsky, M. J.; Whitman, R. L. (2003):** Growth and survival of *Escherichia coli* and enterococci populations in the macro-alga *Cladophora* (Chlorophyta). In: *FEMS Microbiol. Ecol.* **46 (2)**: 203–211. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00214-9.
- Çalışkan, A.; Elçi, Ş. (2009):** Effects of selective withdrawal on hydrodynamics of a stratified reservoir. In: *Water Resour. Manag.* **23 (7)**: 1257–1273. doi: 10.1007/s11269-008-9325-x.
- Camper, A. K. (1993):** Coliform regrowth and biofilm accumulation in drinking water systems: a review. In: Geesey, G.G., Z. Lewandowski, H.-C. Flemming (Hg.): *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems: Lewis Publishers.*
- Carbonnelle, E.; Grohs, P.; Jacquier, H.; Day, N.; Tenza, S.; Dewailly, A.; Vissouarn, O.; Rottman, M.; Herrmann, J.-L.; Podglajen, I.; Raskine, L. (2012):** Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. In: *J. Microbiol. Methods* **89 (2)**: 133–136. doi: 10.1016/j.mimet.2012.03.003.
- Carbonnelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X. (2011):** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. In: *Clin. Biochem.* **44 (1)**: 104–109. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
- Carter, J. C. (1945):** Wetwood of elms. In: *Illinois Natural History Survey Bulletin* **23**: 407–448.



- Carter, M. Q.; Pham, A.; Huynh, S.; He, X. (2017):** Complete genome sequence of a Shiga toxin-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolate. In: *Genome Announc.* **5 (37)**. doi: 10.1128/genomeA.00883-17.
- Casamitjana, X.; Serra, T.; Colomer, J.; Baserba, C.; Pérez-Losada, J. (2003):** Effects of the water withdrawal in the stratification patterns of a reservoir. In: *Hydrobiologia* **504 (1-3)**: 21–28. doi: 10.1023/B:HYDR.0000008504.61773.77.
- Cescutti, P.; Kallioinen, A.; Impallomeni, G.; Toffanin, R.; Pollesello, P.; Leisola, M.; Eerikäinen, T. (2005):** Structure of the exopolysaccharide produced by *Enterobacter amnigenus*. In: *Carbohydr. Res.* **340 (3)**: 439–447. doi: 10.1016/j.carres.2004.12.008.
- Charkowski, A.; Blanco, C.; Condemine, G.; Expert, D.; Franza, T.; Hayes, C.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; López Solanilla, E.; Low, D.; Moleleki, L.; Pirhonen, M.; Pitman, A.; Perna, N.; Reverchon, S.; Rodríguez Palenzuela, P.; San Francisco, M.; Toth, I.; Tsuyumu, S.; van der Waals, J.; van der Wolf, J.; van Gijsegem, F.; Yang, C.-H.; Yedidia, I. (2012):** The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. In: *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 425–449. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013.
- Chavda, K. D.; Chen, L.; Fouts, D. E.; Sutton, G.; Brinkac, L.; Jenkins, S. G.; Bonomo, R. A.; Adams, M. D.; Kreiswirth, B. N. (2016):** Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: New insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. In: *mBio* **7 (6)**. doi: 10.1128/mBio.02093-16.
- Chen, J. (2018):** GUniFrac: Generalized UniFrac distances. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=GUniFrac>.
- Chen, J.; Shi, Y.; Cheng, D.; Jin, Y.; Hutchins, W.; Liu, J. (2019):** Survey of pathogenic bacteria of biofilms in a metropolitan drinking water distribution system. In: *FEMS Microbiol. Lett.* **366 (20)**. doi: 10.1093/femsle/fnz225.
- Cho, K. H.; Pachepsky, Y. A.; Kim, M.; Pyo, J.; Park, M.-H.; Kim, Y. M.; Kim, J.-W.; Kim, J. H. (2016):** Modeling seasonal variability of fecal coliform in natural surface waters using the modified SWAT. In: *J. Hydrol.* **535**: 377–385. doi: 10.1016/j.jhydrol.2016.01.084.
- Chudoba, E. A.; Mallin, M. A.; Cahoon, L. B.; Skrabal, S. A. (2013):** Stimulation of fecal bacteria in ambient waters by experimental inputs of organic and inorganic phosphorus. In: *Water Res.* **47 (10)**: 3455–3466. doi: 10.1016/j.watres.2013.03.047.
- Cock, P. J. A.; Antao, T.; Chang, J. T.; Chapman, B. A.; Cox, C. J.; Dalke, A.; Friedberg, I.; Hamelryck, T.; Kauff, F.; Wilczynski, B.; de Hoon, M. J. L. (2009):** Biopython. Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. In: *Bioinformatics* **25 (11)**: 1422–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btp163.
- Coertze, R. D.; Bezuidenhout, C. C. (2019):** Global distribution and current research of AmpC beta-lactamase genes in aquatic environments. A systematic review. In: *Environ. Pollut.* **252 (Pt B)**: 1633–1642. doi: 10.1016/j.envpol.2019.06.106.
- Cole, J. J. (1982):** Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. In: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13 (1)**: 291–314. doi: 10.1146/annurev.es.13.110182.001451.
- Cook, S. D. (2019):** An historical review of phenylacetic acid. In: *Plant. Cell Physiol.* **60 (2)**: 243–254. doi: 10.1093/pcp/pcz004.
- Cooper, M. B.; Smith, A. G. (2015):** Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* **26**: 147–153. doi: 10.1016/j.pbi.2015.07.003.
- Crawford, C. C.; Hobbie, J. E.; Webb, K. L. (1974):** The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. In: *Ecology* **55 (3)**: 551–563. doi: 10.2307/1935146.

- Davies-Colley, R. J.; Bell, R. G.; Donnison, A. M. (1994):** Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **60 (6)**: 2049–2058. doi: 10.1128/AEM.60.6.2049-2058.1994.
- Davin-Regli, A.; Lavigne, J.-P.; Pagès, J.-M. (2019):** *Enterobacter* spp. Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. In: *Clin. Microbiol. Rev.* **32 (4)**: e00002-19. doi: 10.1128/CMR.00002-19.
- Davis, J. J.; Gerdes, S.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Pusch, G. D.; Shukla, M.; Vonstein, V.; Wattam, A. R.; Yoo, H. (2016):** PATtyFams. Protein families for the microbial genomes in the PATRIC database. In: *Front. Microbiol.* **7**: 118. doi: 10.3389/fmicb.2016.00118.
- Davis, J. J.; Wattam, A. R.; Aziz, R. K.; Brettin, T.; Butler, R.; Butler, R. M.; Chlenski, P.; Conrad, N.; Dickerman, A.; Dietrich, E. M.; Gabbard, J. L.; Gerdes, S.; Guard, A.; Kenyon, R. W.; Machi, D.; Mao, C.; Murphy-Olson, D.; Nguyen, M.; Nordberg, E. K.; Olsen, G. J.; Olson, R. D.; Overbeek, J. C.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Shukla, M.; Thomas, C.; VanOeffelen, M.; Vonstein, V.; Warren, A. S.; Xia, F.; Xie, D.; Yoo, H.; Stevens, R. (2020):** The PATRIC Bioinformatics Resource Center. Expanding data and analysis capabilities. In: *Nucleic Acids Res.* **48 (D1)**: D606-D612. doi: 10.1093/nar/gkz943.
- Davis, K.; Anderson, M. A.; Yates, M. V. (2005):** Distribution of indicator bacteria in Canyon Lake, California. In: *Water Res.* **39 (7)**: 1277–1288. doi: 10.1016/j.watres.2005.01.011.
- de Florio, L.; Riva, E.; Giona, A.; Dedej, E.; Fogolari, M.; Cella, E.; Spoto, S.; Lai, A.; Zehender, G.; Ciccozzi, M.; Angeletti, S. (2018):** MALDI-TOF MS identification and clustering applied to *Enterobacter* species in nosocomial setting. In: *Front. Microbiol.* **9**: 1885. doi: 10.3389/fmicb.2018.01885.
- De Maayer, P.; Cowan, D. A. (2016):** Flashy flagella. Flagellin modification is relatively common and highly versatile among the *Enterobacteriaceae*. In: *BMC Genomics* **17**: 377. doi: 10.1186/s12864-016-2735-x.
- de Pace, F.; Nakazato, G.; Pacheco, A.; de Paiva, J. B.; Sperandio, V.; da Silveira, W. D. (2010):** The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. In: *Infect. Immun.* **78 (12)**: 4990–4998. doi: 10.1128/IAI.00531-10.
- de Vries, A.; Ripley, B. D. (2016):** gg dendro: Create dendrograms and tree diagrams using 'ggplot2'. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=ggdendro>.
- Delpla, I.; Jung, A.-V.; Baures, E.; Clement, M.; Thomas, O. (2009):** Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. In: *Environ. Int.* **35 (8)**: 1225–1233. doi: 10.1016/j.envint.2009.07.001.
- Deutscher Wetterdienst (DWD) (Hg.) (2018):** Jahrbuch 2018 des Deutschen Wetterdienstes. Offenbach.
- Deutscher Wetterdienst (DWD) (Hg.) (2019):** Jahrbuch 2019 des Deutschen Wetterdienstes. Offenbach.
- Deutscher Wetterdienst (DWD) (Hg.) (2020):** Jahrbuch 2020 des Deutschen Wetterdienstes. Offenbach.
- Diao, M.; Huisman, J.; Muyzer, G. (2018):** Spatio-temporal dynamics of sulfur bacteria during oxic-anoxic regime shifts in a seasonally stratified lake. In: *FEMS Microbiol. Ecol.* **94 (4)**. doi: 10.1093/femsec/fiy040.
- Dobrindt, U.; Hochhut, B.; Hentschel, U.; Hacker, J. (2004):** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **2 (5)**: 414–424. doi: 10.1038/nrmicro884.
- Dokulil, M. T.; Jagsch, A.; George, G. D.; Anneville, O.; Jankowski, T.; Wahl, B.; Lenhart, B.; Blenckner, T.; Teubner, K. (2006):** Twenty years of spatially coherent deepwater warming in lakes

- across Europe related to the North Atlantic Oscillation. In: *Limnol. Oceanogr.* **51 (6)**: 2787–2793. doi: 10.4319/lo.2006.51.6.2787.
- Doll, L.; Moshitch, S.; Frankel, G. (1993)**: Poly(GTG)<sub>5</sub>-associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. In: *Res. Microbiol.* **144 (1)**: 17–24.
- Dong, C.; Beis, K.; Nesper, J.; Brunkan-Lamontagne, A. L.; Clarke, B. R.; Whitfield, C.; Naismith, J. H. (2006)**: Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. In: *Nature* **444 (7116)**: 226–229. doi: 10.1038/nature05267.
- Dray, S.; Dufour, A. (2007)**: The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. In: *J. Stat. Softw.* **22 (4)**: 1–20. doi: 10.18637/jss.v022.i04.
- Durand, P.; Breuer, L.; Johnes, P. J.; Billen, G.; Butturini, A.; Pinay, G.; van Grinsven, H.; Garnier, J.; Rivett, M.; Reay, D. S.; Curtis, C.; Siemens, J.; Maberly, S.; Kaste, Ø.; Humborg, C.; Loeb, R.; de Klein, J.; Hejzlar, J.; Skoulikidis, N.; Kortelainen, P.; Lepistö, A.; Wright, R. (2011)**: Nitrogen processes in aquatic ecosystems. In: Sutton, M. A., Howard, C. M., Erismann, J. W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H. und Grizzetti, B. (Hg.): The European Nitrogen Assessment. Cambridge: *Cambridge University Press*.
- Durkin, C. A.; Mock, T.; Armbrust, E. V. (2009)**: Chitin in diatoms and its association with the cell wall. In: *Eukaryot. Cell* **8 (7)**: 1038–1050. doi: 10.1128/EC.00079-09.
- Dwivedi, R.; Nothaft, H.; Garber, J.; Xin Kin, L.; Stahl, M.; Flint, A.; van Vliet, A. H. M.; Stintzi, A.; Szymanski, C. M. (2016)**: L-fucose influences chemotaxis and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. In: *Mol. Microbiol.* **101 (4)**: 575–589. doi: 10.1111/mmi.13409.
- Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H.; Stackebrandt, E. (2006)**: The Prokaryotes. New York, NY: *Springer*.
- Edberg, S. C.; Patterson, J. E.; Smith, D. B. (1994)**: Differentiation of distribution systems, source water, and clinical coliforms by DNA analysis. In: *J. Clin. Microbiol.* **32 (1)**: 139–142. doi: 10.1128/JCM.32.1.139-142.1994.
- Edberg, S. C.; Rice, E. W.; Karlin, R. J.; Allen, M. J. (2000)**: *Escherichia coli*. The best biological drinking water indicator for public health protection. In: *J. Appl. Microbiol.* **88 (29)**: 106S–116S. doi: 10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x.
- Edgar, R. C. (2004)**: MUSCLE. Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic Acids Res.* **32 (5)**: 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Edgar, R. C. (2010)**: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. In: *Bioinformatics* **26 (19)**: 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar, R. C. (2013)**: UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. In: *Nat. Methods* **10 (10)**: 996–998. doi: 10.1038/nmeth.2604.
- Egli, A.; Tschudin-Sutter, S.; Oberle, M.; Goldenberger, D.; Frei, R.; Widmer, A. F. (2015)**: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* - a novel tool for real-time outbreak investigation. In: *PLoS ONE* **10 (4)**: e0120624. doi: 10.1371/journal.pone.0120624.
- Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) (Hg.) (2012)**: Durchflusszytometrische Analyse von Wasserproben.
- El-Akhdar, I.; Elsakhawy, T.; Abo-Koura, H. A. (2020)**: Alleviation of salt stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) by plant growth promoting bacteria strains *Bacillus halotolerans* MSR-H4 and *Lelliottia amnigena* MSR-M49. In: *J. Adv. Microbiol* **20 (1)**: 44–58. doi: 10.9734/JAMB/2020/v20i130208.
- Elliott, L. P. (1969)**: Certain bacteria, some of medical interest, associated with the slug *Limax maximus*. In: *J. Invertebr. Pathol.* **15 (3)**: 306–312.

- Europäische Gemeinschaft (1998):** Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch **L 330:** 32–54.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Hg.) (2021):** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. Online verfügbar unter <http://www.eucast.org>.
- European Environment Agency (EEA); World Health Organization (WHO) (Hg.) (2002):** Water and health in Europe. A joint report from the European Environment Agency and the WHO Regional Office for Europe, Bd. 93. Copenhagen.
- Exner, M.; Behringer, K.; Wernicke, F.; Dautzenberg, W. (2005):** Erfahrungen mit Coliformen-Befunden in einem Trinkwasser-Talsperrensystem in Nordrhein-Westfalen. In: Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e.V. (ATT) (Hg.): Coliformen-Befunde gemäß Trinkwasserversordnung 2001. Bewertung und Maßnahmen *ATT-Schriftenreihe*, 5, Bd. 5. Siegburg: 15–24.
- Farmer, J. J.; Davis, B. R.; Hickman-Brenner, F. W.; McWhorter, A.; Huntley-Carter, G. P.; Asbury, M. A.; Riddle, C.; Wathen-Grady, H. G.; Elias, C.; Fanning, G. R. (1985):** Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. In: *J. Clin. Microbiol.* **21 (1):** 46–76.
- Farnleitner, A. H.; Ryzinska-Paier, G.; Reischer, G. H.; Burtscher, M. M.; Knetsch, S.; Kirschner, A. K. T.; Dirnböck, T.; Kuschig, G.; Mach, R. L.; Sommer, R. (2010):** *Escherichia coli* and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. In: *J. Appl. Microbiol.* **109 (5):** 1599–1608. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04788.x.
- Ferrándiz, M.-J.; Bishop, K.; Williams, P.; Withers, H. (2005):** HosA, a member of the SlyA family, regulates motility in enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Infect. Immun.* **73 (3):** 1684–1694. doi: 10.1128/IAI.73.3.1684–1694.2005.
- Feuerpfeil, I.; Botzenhart, K. (2008):** Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fiksdal, L.; Tryland, I. (2008):** Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* **19:** 289–294.
- Fischer, H. B.; List, J. E.; Koh, C. R.; Imberger, J.; Brooks, N. H. (1979):** Mixing in inland and coastal waters. Burlington: Elsevier Science.
- Fleischmann, R. D.; Adams, M. D.; White, O.; Clayton, R. A.; Kirkness, E. F.; Kerlavage, A. R.; Bult, C. J.; Tomb, J. F.; Dougherty, B. A.; Merrick, J. M. (1995):** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. In: *Science* **269 (5223):** 496–512. doi: 10.1126/science.7542800.
- Fleming, A. (1929):** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. In: *Br. J. Exp. Pathol.* **10 (3):** 226–236.
- Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. (2016):** Biofilms. An emergent form of bacterial life. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **14 (9):** 563–575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Francke, C.; Siezen, R. J.; Teusink, B. (2005):** Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. In: *Trends Microbiol.* **13 (11):** 550–558. doi: 10.1016/j.tim.2005.09.001.
- Fraser, C. M.; Gocayne, J. D.; White, O.; Adams, M. D.; Clayton, R. A.; Fleischmann, R. D.; Bult, C. J.; Kerlavage, A. R.; Sutton, G.; Kelley, J. M.; Fritchman, R. D.; Weidman, J. F.; Small, K. V.; Sandusky, M.; Fuhrmann, J.; Nguyen, D.; Utterback, T. R.; Saudek, D. M.; Phillips, C. A.; Merrick, J. M.; Tomb, J. F.; Dougherty, B. A.; Bott, K. F.; Hu, P. C.; Lucier, T. S.; Peterson, S.**

- N.; Smith, H. O.; Hutchison, C. A.; Venter, J. C. (1995):** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. In: *Science* **270 (5235)**: 397–403. doi: 10.1126/science.270.5235.397.
- Freier, K.; Feuerpfeil, I.; Hummel, A.; Schulze, H.; Buder, G. (2005):** Erfahrungen mit Coliformen-Befunden an Trinkwassertalsperren in Sachsen. In: Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e.V. (ATT) (Hg.): Coliformen-Befunde gemäß Trinkwasserversordnung 2001. Bewertung und Maßnahmen *ATT-Schriftenreihe*, 5, Bd. 5. Siegburg: 25–36.
- Galili, T.; O'Callaghan, A.; Sidi, J.; Sievert, C. (2018):** heatmaply. An R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. In: *Bioinformatics* **34 (9)**: 1600–1602. doi: 10.1093/bioinformatics/btx657.
- García-Aljaro, C.; Blanch, A. R.; Campos, C.; Jofre, J.; Lucena, F. (2019):** Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. In: *J. Appl. Microbiol.* **126 (3)**: 701–717. doi: 10.1111/jam.14112.
- Garrity, G. M.; Bell, J. A.; Lilburn, T. (2005):** Class II. *Betaproteobacteria* class. nov. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R. und Staley, J. T. (Hg.): *Bergey's Manual® of systematic bacteriology*. Boston, MA: Springer.
- Gasol, J. M.; Comerma, M.; García, J. C.; Armengol, J.; Casamayor, E. O.; Kojecká, P.; Šimek, K. (2002):** A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. In: *Limnol. Oceanogr.* **47 (1)**: 62–77. doi: 10.4319/lo.2002.47.1.0062.
- Gavini, F.; Ferragut, C.; Izard, D.; Trinel, P. A.; Leclerc, H.; Lefebvre, B.; Mossel, D. A. A. (1979):** *Serratia fonticola*, a new species from water. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29 (2)**: 92–101. doi: 10.1099/00207713-29-2-92.
- Gavini, F.; Leclerc, H.; Mossel, D. A. A. (1985):** *Enterobacteriaceae* of the “coliform group” in drinking water. Identification and worldwide distribution. In: *Syst. Appl. Microbiol.* **6 (3)**: 312–318. doi: 10.1016/S0723-2020(85)80038-2.
- Gerhardy, K. (2019):** Diskussionsbeitrag zu coliformen Bakterien als Indikatoren für eine fäkale Kontamination. In: *DVGW energie | wasser-praxis* **70 (1)**: 47–49.
- Gibb, S.; Strimmer, K. (2012):** MALDIquant. A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. In: *Bioinformatics* **28 (17)**: 2270–2271. doi: 10.1093/bioinformatics/bts447.
- Giebel, R. A.; Fredenberg, W.; Sandrin, T. R. (2008):** Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. In: *Water Res.* **42 (4-5)**: 931–940. doi: 10.1016/j.watres.2007.09.005.
- Giroldo, D.; Vieira, A. A. H. (2005):** Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. In: *J. Plankton Res.* **27 (7)**: 695–705. doi: 10.1093/plankt/fbi043.
- Gong, G.; Um, Y.; Park, T. H.; Woo, H. M. (2015):** Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* GGT036. A furfural tolerant soil bacterium. In: *J. Biotechnol.* **193**: 43–44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.012.
- Green, E. R.; Meccas, J. (2016):** Bacterial secretion systems. An overview. In: *Microbiol. Spectr.* **4 (1)**: 1–19. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
- Gunnarsdottir, M. J.; Gardarsson, S. M.; Figueras, M. J.; Puigdomènech, C.; Juárez, R.; Saucedo, G.; Arnedo, M. J.; Santos, R.; Monteiro, S.; Avery, L.; Pagaling, E.; Allan, R.; Abel, C.; Eglitis, J.; Hamsch, B.; Hügler, M.; Rajkovic, A.; Smigic, N.; Udovicki, B.; Albrechtsen, H.-J.; López-Avilés, A.; Hunter, P. (2020):** Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. In: *Sci. Total Environ.* **698**: 134185. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134185.

- Guo, D.-J.; Singh, R. K.; Singh, P.; Li, D.-P.; Sharma, A.; Xing, Y.-X.; Song, X.-P.; Yang, L.-T.; Li, Y.-R. (2020):** Complete genome sequence of *Enterobacter roggenkampii* ED5, a nitrogen fixing plant growth promoting endophytic bacterium with biocontrol and stress tolerance properties, isolated from sugarcane root. In: *Front. Microbiol.* **11**: 580081. doi: 10.3389/fmicb.2020.580081.
- Gyaneshwar, P.; Parekh, L.J.; Archana, G.; Poole, P.S.; Collins, M.D.; Hutson, R.A.; Kumar, G.N. (1999):** Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* **171 (2)**: 223–229. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13436.x.
- Hadrys, H.; Balick, M.; Schierwater, B. (1992):** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. In: *Mol. Ecol.* **1 (1)**: 55–63.
- Hagedorn, C.; Blanch, A. R.; Harwood, V. J. (2011):** Microbial source tracking. Methods, applications, and case studies. New York: *Springer*.
- Halda-Alija, L.; Hendricks, S. P.; Johnston, T. C. (2001):** Spatial and temporal variation of *Enterobacter* genotypes in sediments and the underlying hyporheic zone of an agricultural stream. In: *Microb. Ecol.* **42 (3)**: 286–294. doi: 10.1007/s00248-001-0021-0.
- Hall, B. G. (2005):** Phylogenetic trees made easy. A how-to manual. 2. Aufl. Sunderland, Mass.: *Sinauer Associates*.
- Hamsch, B. (2010):** Anforderungen an die Qualitätssicherung beim Rohwasser. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **45**: 41–53.
- Hamsch, B.; Hügler, M.; Preuß, G. (2016):** Wirksamkeit von Aufbereitungs- und Desinfektionsverfahren zur Elimination von Krankheitserregern. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **74**: 50–56.
- Hamsch, B.; Korth, A.; Petzoldt, H. (2012):** Occurrence and growth of coliform bacteria in drinking water distribution systems. In: Kay, D. und Fricker, C. (Hg.): Significance of faecal indicators in water. Cambridge: *Royal Society of Chemistry*.
- He, L.; Lin, Z.; Wang, Y.; He, X.; Zhou, J.; Guan, M.; Zhou, J. (2021):** Facilitating harmful algae removal in fresh water via joint effects of multi-species algicidal bacteria. In: *J. Hazard Mater.* **403**: 123662. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123662.
- Hecky, R. E.; Mopper, K.; Kilham, P.; Degens, E. T. (1973):** The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. In: *Marine Biology* **19 (4)**: 323–331. doi: 10.1007/BF00348902.
- Hepp, J.; Rabus, M.; Anhäuser, T.; Bromm, T.; Laforsch, C.; Sirocko, F.; Glaser, B.; Zech, M. (2016):** A sugar biomarker proxy for assessing terrestrial versus aquatic sedimentary input. In: *Org. Geochem.* **98**: 98–104. doi: 10.1016/j.orggeochem.2016.05.012.
- Hintz, W. D.; Schuler, M. S.; Borrelli, J. J.; Eichler, L. W.; Stoler, A. B.; Moriarty, V. W.; Ahrens, L. E.; Boylen, C. W.; Nierzwicki-Bauer, S. A.; Relyea, R. A. (2020):** Concurrent improvement and deterioration of epilimnetic water quality in an oligotrophic lake over 37 years. In: *Limnol. Oceanogr.* **65 (5)**: 927–938. doi: 10.1002/lno.11359.
- Ho, L.; Braun, K.; Fabris, R.; Hoefel, D.; Morran, J.; Monis, P.; Drikas, M. (2012):** Comparison of drinking water treatment process streams for optimal bacteriological water quality. In: *Water Res.* **46 (12)**: 3934–3942. doi: 10.1016/j.watres.2012.04.041.
- Hoehn, E. (2011):** Praxistest und Verfahrensanpassung: Bewertungsverfahren Phytoplankton in natürlichen Mittelgebirgsseen, in Talsperren, Baggerseen und pH-neutralen Tagebauseen zur Umsetzung der EG-Wasserrahmenrichtlinie. Abschlussbericht für das LAWA-Projekt-Nr. O 7.08. Freiburg.
- Hoehn, E. (2013):** Ökologische Bewertung von natürlichen, künstlichen und erheblich veränderten Seen mit der Biokomponente Phytoplankton nach den Anforderungen der EU-Wasserrahmenrichtlinie. Abschlussbericht für das LAWA-Projekt-Nr. O 4.10. Freiburg.

- Hoffmann, H.; Roggenkamp, A. (2003):** Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **69 (9)**: 5306–5318. doi: 10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003.
- Hoffmann, H.; Stindl, S.; Ludwig, W.; Stumpf, A.; Mehlen, A.; Heesemann, J.; Monget, D.; Schleifer, K.-H.; Roggenkamp, A. (2005a):** Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. In: *Syst. Appl. Microbiol.* **28 (3)**: 196–205. doi: 10.1016/j.syapm.2004.12.010.
- Hoffmann, H.; Stindl, S.; Ludwig, W.; Stumpf, A.; Mehlen, A.; Monget, D.; Pierard, D.; Ziesing, S.; Heesemann, J.; Roggenkamp, A.; Schleifer, K.-H. (2005b):** *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp. nov., *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* comb. nov., and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. In: *J. Clin. Microbiol.* **43 (7)**: 3297–3303. doi: 10.1128/jcm.43.7.3297-3303.2005.
- Hoke, A. K.; Reynoso, G.; Smith, M. R.; Gardner, M. I.; Lockwood, D. J.; Gilbert, N. E.; Wilhelm, S. W.; Becker, I. R.; Brennan, G. J.; Crider, K. E.; Farnan, S. R.; Mendoza, V.; Poole, A. C.; Zimmerman, Z. P.; Utz, L. K.; Wurch, L. L.; Steffen, M. M. (2021):** Genomic signatures of Lake Erie bacteria suggest interaction in the *Microcystis* phycosphere. In: *PLoS ONE* **16 (9)**: e0257017. doi: 10.1371/journal.pone.0257017.
- Hong, H.; Qiu, J.; Liang, Y. (2010):** Environmental factors influencing the distribution of total and fecal coliform bacteria in six water storage reservoirs in the Pearl River Delta Region, China. In: *J. Environ. Sci.* **22 (5)**: 663–668. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60160-1.
- Hormaeche, E.; Edwards, P. R. (1960):** A proposed genus *Enterobacter*. In: *Intl. Bull. Bact. Nomen. Tax.* **10**: 71–74.
- Horn, H. (2003):** The relative importance of climate and nutrients in controlling phytoplankton growth in Saldenbach Reservoir. In: *Hydrobiologia* **504 (1-3)**: 159–166. doi: 10.1023/B:HYDR.0000008515.38353.de.
- Hornák, K.; Kasalický, V.; Šimek, K.; Grossart, H.-P. (2017):** Strain-specific consumption and transformation of alga-derived dissolved organic matter by members of the *Limnohabitans*-C and *Polynucleobacter*-B clusters of *Betaproteobacteria*. In: *Environ. Microbiol.* **19 (11)**: 4519–4535. doi: 10.1111/1462-2920.13900.
- Hügler, M. (2016):** Tierische Organismen in Trinkwassersystemen - ein Problem? In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **75**: 131–144.
- Hügler, M.; Hamsch, B. (2012):** Möglichkeiten und Grenzen des Indikatorsystems. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **55**: 53–72.
- Hügler, M.; Petzoldt, H.; Korth, A. (2015):** Innovativer Ansatz zur Ursachenanalyse mikrobiologischer Belastungen. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **70**: 45–57.
- Hügler, M.; Petzoldt, H.; Nitsche, R.; Hamsch, B.; Korth, A. (2014):** Mosquitoes as a source for enterococci in drinking water samples. In: *IWA World Water Congress & Exhibition 2014*.
- Huot, Y.; Babin, M.; Bruyant, F.; Grob, C.; Twardowski, M. S.; Claustre, H. (2007):** Relationship between photosynthetic parameters and different proxies of phytoplankton biomass in the subtropical ocean. In: *Biogeosciences* **4 (5)**: 853–868. doi: 10.5194/bg-4-853-2007.
- Ibáñez de Aldecoa, A. L.; Zafra, O.; González-Pastor, J. E. (2017):** Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. In: *Front. Microbiol.* **8**: 1390. doi: 10.3389/fmicb.2017.01390.
- Ihaka, R.; Gentleman, R. (1996):** R: A language for data analysis and graphics. In: *J. Comput. Graph. Stat.* **5 (3)**: 299–314. doi: 10.1080/10618600.1996.10474713.
- Iredell, J.; Brown, J.; Tagg, K. (2016):** Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*. Mechanisms and clinical implications. In: *Brit. Med. J.* **352**: h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420.

- Ishii, Y.; Kurisu, F.; Kasuga, I.; Furumai, H. (2020): Competition for growth substrates in river water between *Escherichia coli* and indigenous bacteria illustrated by high resolution mass spectrometry. In: *Lett. Appl. Microbiol.* doi: 10.1111/LAM.13343.
- Ito, R.; Mustapha, M. M.; Tomich, A. D.; Callaghan, J. D.; McElheny, C. L.; Mettus, R. T.; Shanks, R. M. Q.; Sluis-Cremer, N.; Doi, Y. (2017): Widespread fosfomycin resistance in Gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. In: *mBio* **8** (4): e00749-17. doi: 10.1128/mBio.00749-17.
- Izard, D.; Gavini, F.; Trinel, P. A.; Leclerc, H. (1981): Deoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter amnigenus* sp. nov. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31** (1): 35–42. doi: 10.1099/00207713-31-1-35.
- Jackson, D. W.; Suzuki, K.; Oakford, L.; Simecka, J. W.; Hart, M. E.; Romeo, T. (2002): Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* **184** (1): 290–301. doi: 10.1128/JB.184.1.290–301.2002.
- Jacoby, G. A. (2009): AmpC  $\beta$ -lactamases. In: *Clin. Microbiol. Rev.* **22** (1): 161-182. doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- Jeon, D. J.; Ligaray, M.; Kim, M.; Kim, G.; Lee, G.; Pachepsky, Y. A.; Cha, D.-H.; Cho, K. H. (2019): Evaluating the influence of climate change on the fate and transport of fecal coliform bacteria using the modified SWAT model. In: *Sci. Total Environ.* **658**: 753–762. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.213.
- Ji, X.-J.; Huang, H.; Ouyang, P.-K. (2011): Microbial 2,3-butanediol production. A state-of-the-art review. In: *Biotechnol. Adv.* **29** (3): 351–364. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.01.007.
- Jin, Q.; Yuan, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Shen, Y.; Lu, W.; Wang, J.; Liu, H.; Yang, J.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, G.; Wu, H.; Di Qu; Dong, J.; Sun, L.; Xue, Y.; Zhao, A.; Gao, Y.; Zhu, J.; Kan, B.; Ding, K.; Chen, S.; Cheng, H.; Yao, Z.; He, B.; Chen, R.; Ma, D.; Qiang, B.; Wen, Y.; Hou, Y.; Yu, J. (2002): Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a. Insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. In: *Nucleic Acids Res.* **30** (20): 4432–4441. doi: 10.1093/nar/gkf566.
- Jost, L. (2006): Entropy and diversity. In: *Oikos* **113** (2): 363–375. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.
- Jost, L. (2007): Partitioning diversity into independent alpha and beta components. In: *Ecology* **88** (10): 2427–2439. doi: 10.1890/06-1736.1.
- Kämpfer, P.; Glaeser, S. P.; Packroff, G.; Behringer, K.; Exner, M.; Chakraborty, T.; Schmithausen, R. M.; Doijad, S. (2018): *Lelliottia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **68** (8): 2454–2461. doi: 10.1099/ijsem.0.002854.
- Kämpfer, P.; Nienhüser, A.; Packroff, G.; Wernicke, F.; Mehling, A.; Nixdorf, K.; Fiedler, S.; Kolauch, C.; Esser, M. (2008): Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. In: *Int. J. Hyg. Environ. Health* **211** (3-4): 374–384. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.021.
- Kandror, O.; DeLeon, A.; Goldberg, A. L. (2002): Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99** (15): 9727–9732. doi: 10.1073/pnas.142314099.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG. Kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic Acids Res.* **28** (1): 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- Kanehisa, M.; Sato, Y.; Morishima, K. (2016): BlastKOALA and GhostKOALA. KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. In: *J. Mol. Biol.* **428** (4): 726–731. doi: 10.1016/j.jmb.2015.11.006.



- Kapaun, E.; Reisser, W. (1995):** A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). In: *Planta* **197** (4). doi: 10.1007/BF00191563.
- Karger, R.; Cord-Landwehr, K.; Hoffmann, F. (2008):** Wasserversorgung. 13. Aufl. Studium. Wiesbaden: Vieweg + Teubner.
- Kassambara, A. (2020):** ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. Online verfügbar unter <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html>.
- Kato, J.; Nagata, C.; Yang, L.; Kuroda, A.; Ikeda, T.; Takiguchi, N.; Ohtake, H. (2001):** Isolation and characterization of the *Enterobacter cloacae* *cheR* mutant defective in phosphate taxis. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65** (2): 456–458. doi: 10.1271/bbb.65.456.
- Kearns, D. B. (2010):** A field guide to bacterial swarming motility. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **8** (9): 634–644. doi: 10.1038/nrmicro2405.
- Kertesz, M. A. (1999):** Riding the sulfur cycle – metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. In: *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (2): 135–175. doi: 10.1016/S0168-6445(99)00033-9.
- Kilian, M.; Bulow, P. (1976):** Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*: I. Detection of bacterial glycosidases. In: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **84** (5): 245–251.
- Kim, A.-L.; Park, S.-Y.; Lee, C.-H.; Lee, C.-H.; Lee, J.-K. (2014):** Quorum quenching bacteria isolated from the sludge of a wastewater treatment plant and their application for controlling biofilm formation. In: *J. Microbiol. Biotechnol.* **24** (11): 1574–1582. doi: 10.4014/jmb.1407.07009.
- Kim, H. S.; Lee, C.-G.; Lee, E. Y. (2011):** Alginate lyase. Structure, property, and application. In: *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16** (5): 843–851. doi: 10.1007/s12257-011-0352-8.
- Kim, M.-J.; Han, J.-K.; Park, J.-S.; Lee, J.-S.; Lee, S.-H.; Cho, J.-I.; Kim, K.-S. (2015):** Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. In: *J. Microbiol. Biotechnol.* **25** (6): 872–879. doi: 10.4014/jmb.1502.02003.
- Kim, S.-M.; Lee, H.-W.; Choi, Y.-W.; Kim, S.-H.; Lee, J.-C.; Lee, Y.-C.; Seol, S.-Y.; Cho, D.-T.; Kim, J. (2012):** Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of *Enterobacter cloacae*. In: *J. Microbiol.* **50** (1): 175–178. doi: 10.1007/s12275-012-2044-2.
- Kirschner, A. K. T.; Reischer, G. H.; Jakwerth, S.; Savio, D.; Ixenmaier, S.; Toth, E.; Sommer, R.; Mach, R. L.; Linke, R.; Eiler, A.; Kolarevic, S.; Farnleitner, A. H. (2017):** Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. In: *Water Res.* **124**: 543–555. doi: 10.1016/j.watres.2017.07.052.
- Kistemann, T.; Classen, T.; Koch, C.; Dangendorf, F.; Fischeder, R.; Gebel, J.; Vacata, V.; Exner, M. (2002):** Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (5): 2188–2197. doi: 10.1128/AEM.68.5.2188–2197.2002.
- Koch, R. (1893):** Wasserfiltration und Cholera. In: *Zentralblatt für Hygiene und Infektionskrankheiten* **14**: 183–206.
- Kolde, R. (2019):** pheatmap: Pretty heatmaps. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.
- Korajkic, A.; Wanjugi, P.; Brooks, L.; Cao, Y.; Harwood, V. J. (2019):** Persistence and decay of fecal microbiota in aquatic habitats. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **83** (4). doi: 10.1128/MMBR.00005-19.
- Korth, A.; Petzoldt, H.; Nitsche, R.; Hamsch, B.; Hügler, M. (2013):** Enterokokkenbelastungen im Trinkwasser - Ursachenanalyse. In: *DVGW energie | wasser-praxis* **64** (9): 54–60.
- Kötzsch, S.; Sinreich, M. (2014):** Zellzahlen zum Grundwasser. Bestimmung mittels Durchflusssytometrie. In: *Aqua & Gas* N°3: 14–21.

- Kouzuma, A.; Watanabe, K. (2015):** Exploring the potential of algae/bacteria interactions. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* **33**: 125–129. doi: 10.1016/j.copbio.2015.02.007.
- Krzywińska, S.; Mokracka, J.; Koczura, R.; Kaznowski, A. (2009):** Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. In: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56 (3)**: 248–252. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00572.x.
- Ksoll, W. B.; Ishii, S.; Sadowsky, M. J.; Hicks, R. E. (2007):** Presence and sources of fecal coliform bacteria in epilithic periphyton communities of Lake Superior. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **73 (12)**: 3771–3778. doi: 10.1128/AEM.02654-06.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016):** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. In: *Mol. Biol. Evol.* **33 (7)**: 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T. (2017):** Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. In: *PeerJ* **5**: e2836. doi: 10.7717/peerj.2836.
- Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T. (2016):** IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. In: *Sci. Rep.* **6**: 33721. doi: 10.1038/srep33721.
- Lambert, A.; Welsch, H.; Kollete, M. (2010):** Partikelentfernung in der Trinkwasseraufbereitung. Problematiken und Lösungsansätze. In: *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* **22 (6)**: 679–685. doi: 10.1007/s12302-010-0162-1.
- Lamendella, R.; Li, K. C.; Oerther, D.; Santo Domingo, J. W. (2013):** Molecular diversity of *Bacteroidales* in fecal and environmental samples and swine-associated subpopulations. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **79 (3)**: 816–824. doi: 10.1128/AEM.02535-12.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. (2007):** Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* **23 (21)**: 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- LaRock, C. N.; Nizet, V. (2015):** Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. In: *Biochim. Biophys. Acta* **1848 (11 Pt B)**: 3047–3054. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.02.010.
- Lau, Y. Y.; How, K. Y.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. (2018):** Cloning and characterization of short-chain N-acetyl homoserine lactone-producing *Enterobacter asburiae* strain L1 from lettuce leaves. In: *MicrobiologyOpen* **7 (6)**: e00610. doi: 10.1002/mbo3.610.
- Lau, Y. Y.; Sulaiman, J.; Chen, J. W.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. (2013):** Quorum sensing activity of *Enterobacter asburiae* isolated from lettuce leaves. In: *Sensors* **13 (10)**: 14189–14199. doi: 10.3390/s131014189.
- Lau, Y. Y.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. (2014):** *Enterobacter asburiae* strain L1. Complete genome and whole genome optical mapping analysis of a quorum sensing bacterium. In: *Sensors* **14 (8)**: 13913–13924. doi: 10.3390/s140813913.
- Layton, A.; McKay, L.; Williams, D.; Garrett, V.; Gentry, R.; Sayler, G. (2006):** Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **72 (6)**: 4214–4224. doi: 10.1128/AEM.01036-05.
- Lebaron, P.; Servais, P.; Agogué, H.; Courties, C.; Joux, F. (2001):** Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? In: *Appl. Environ. Microbiol.* **67 (4)**: 1775–1782. doi: 10.1128/AEM.67.4.1775–1782.2001.

- LeChevallier, M. W. (1990):** Coliform regrowth in drinking water: A review. In: *J. Am. Water Works Assoc.* **82 (11):** 74–86. doi: 10.1002/j.1551-8833.1990.tb07054.x.
- LeChevallier, M. W.; Welch, N. J.; Smith, D. B. (1996):** Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62 (7):** 2201–2211. doi: 10.1128/AEM.62.7.2201-2211.1996.
- Leclerc, H.; Mossel, D. A. A.; Edberg, S. C.; Struijk, C. B. (2001):** Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **55:** 201–234. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.201.
- Lee, I.; Ouk Kim, Y.; Park, S.-C.; Chun, J. (2016):** OrthoANI. An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **66 (2):** 1100–1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.
- Le-Ha, T.-D.; Le, L.; Le-Vo, H.-N.; Anda, M.; Motooka, D.; Nakamura, S.; Tran, L. K.; Tran, P. T.-B.; Iida, T.; van Cao (2019):** Characterization of a carbapenem- and colistin-resistant *Enterobacter cloacae* carrying *Tn6901* in *bla<sub>NDM-1</sub>* genomic context. In: *Infect. Drug Resist.* **12:** 733–739. doi: 10.2147/IDR.S194495.
- Lehman, P. W.; Kurobe, T.; Huynh, K.; Lesmeister, S.; Teh, S. J. (2021):** Covariance of phytoplankton, bacteria, and zooplankton communities within *Microcystis* blooms in San Francisco estuary. In: *Front. Microbiol.* **12:** 632264. doi: 10.3389/fmicb.2021.632264.
- Leister, C.; Petzoldt, H.; Rybicki, M.; Wagner, M.; Korth, A.; Hügler, M. (2021):** Massenentwicklung coliformer Bakterien in Talsperren – Ursachenanalyse und Konsequenzen für die Trinkwasserversorgung. Abschlussbericht zum DVGW-Förderkennzeichen W 201720. In: *Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser* **97.**
- Li, Y.; Lei, X.; Zhu, H.; Zhang, H.; Guan, C.; Chen, Z.; Zheng, W.; Fu, L.; Zheng, T. (2016):** Chitinase producing bacteria with direct algicidal activity on marine diatoms. In: *Sci. Rep.* **6:** 21984. doi: 10.1038/srep21984.
- Lim, Y.-L.; Yong, D.; Ee, R.; Krishnan, T.; Tee, K.-K.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. (2015):** Complete genome sequence of *Serratia fonticola* DSM 4576<sup>T</sup>, a potential plant growth promoting bacterium. In: *J. Biotechnol.* **214:** 43–44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.09.005.
- Lin, W.; Zhao, D.; Luo, J. (2018):** Distribution of alkaline phosphatase genes in cyanobacteria and the role of alkaline phosphatase on the acquisition of phosphorus from dissolved organic phosphorus for cyanobacterial growth. In: *J. Appl. Phycol.* **30 (2):** 839–850. doi: 10.1007/s10811-017-1267-3.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (2021).** Online verfügbar unter [bacterio.net](http://bacterio.net), zuletzt geprüft am 14.06.2021.
- Liu, C.; Di Sun; Zhu, J.; Liu, J.; Liu, W. (2020):** The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP. A Mini-Review. In: *Front. Microbiol.* **11:** 802. doi: 10.3389/fmicb.2020.00802.
- Liu, F.; Yang, J.; Xiao, Y.; Li, L.; Yang, F.; Jin, Q. (2016):** Complete genome sequence of a clinical isolate of *Enterobacter asburiae*. In: *Genome Announc.* **4 (3):** doi: 10.1128/genomeA.00523-16.
- Llirós, M.; Inceoğlu, Ö.; García-Armisen, T.; Anzil, A.; Leporcq, B.; Pigneur, L.-M.; Viroux, L.; Darchambeau, F.; Descy, J.-P.; Servais, P. (2014):** Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. In: *PLoS ONE* **9 (12):** e116145. doi: 10.1371/journal.pone.0116145.
- Locht, C. (1999):** Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. In: *Int. Microbiol.* **2 (3):** 137–144.
- Löffler, M.; Simen, J. D.; Müller, J.; Jäger, G.; Laghrami, S.; Schäferhoff, K.; Freund, A.; Takors, R. (2017):** Switching between nitrogen and glucose limitation. Unraveling transcriptional dynamics in *Escherichia coli*. In: *J. Biotechnol.* **258:** 2–12. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.011.

- Luna Rico, A.; Zheng, W.; Petiot, N.; Egelman, E. H.; Francetic, O. (2019):** Functional reconstitution of the type IVa pilus assembly system from enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Mol. Microbiol.* **111 (3)**: 732–749. doi: 10.1111/mmi.14188.
- Magnuson, J.J.; Robertson, D.M.; Benson, B.J.; Wynne, R.H.; Livingstone, D.M.; Arai, T.; Assel, R.A.; Barry, R.G.; Card, V.; Kuusisto, E.; Granin, N.G.; Prowse, T.D.; Stewart, K.M.; Vuglinski, V.S. (2000):** Historical trends in lake and river ice cover in the northern hemisphere. In: *Science* **289 (5485)**: 1743–1746. doi: 10.1126/science.289.5485.1743.
- Martin, M. (2011):** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. In: *EMBnet j.* **17 (1)**: 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- McArthur, A. G.; Waglehner, N.; Nizam, F.; Yan, A.; Azad, M. A.; Baylay, A. J.; Bhullar, K.; Canova, M. J.; de Pascale, G.; Ejim, L.; Kalan, L.; King, A. M.; Koteva, K.; Morar, M.; Mulvey, M. R.; O'Brien, J. S.; Pawlowski, A. C.; Piddock, L. J. V.; Spanogiannopoulos, P.; Sutherland, A. D.; Tang, I.; Taylor, P. L.; Thaker, M.; Wang, W.; Yan, M.; Yu, T.; Wright, G. D. (2013):** The comprehensive antibiotic resistance database. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* **57 (7)**: 3348–3357. doi: 10.1128/AAC.00419-13.
- McDonough, R. J.; Sanders, R. W.; Porter, K. G.; Kirchman, D. L. (1986):** Depth distribution of bacterial production in a stratified lake with an anoxic hypolimnion. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **52 (5)**: 992–1000. doi: 10.1128/AEM.52.5.992-1000.1986.
- McFeters, G. A.; Stuart, S. A.; Olson, S. B. (1978):** Growth of heterotrophic bacteria and algal extracellular products in oligotrophic waters. In: *Appl. Environ. Public Health Microbiol.* **35 (2)**: 383–391. doi: 10.1128/AEM.35.2.383-391.1978.
- Meyer, N.; Bigalke, A.; Kaulfuß, A.; Pohnert, G. (2017):** Strategies and ecological roles of algicidal bacteria. In: *FEMS Microbiol. Rev.* **41 (6)**: 880–899. doi: 10.1093/femsre/fux029.
- Mezzatesta, M. L.; Gona, F.; Stefani, S. (2012):** *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. In: *Future Microbiol.* **7 (7)**: 887–902. doi: 10.2217/fmb.12.61.
- Mi, C.; Sadeghian, A.; Lindenschmidt, K.-E.; Rinke, K. (2019):** Variable withdrawal elevations as a management tool to counter the effects of climate warming in Germany's largest drinking water reservoir. In: *Environ Sci Eur* **31 (1)**: 2283. doi: 10.1186/s12302-019-0202-4.
- Mi, C.; Shatwell, T.; Ma, J.; Xu, Y.; Su, F.; Rinke, K. (2020):** Ensemble warming projections in Germany's largest drinking water reservoir and potential adaptation strategies. In: *Sci. Total Environ.* **748**: 141366. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141366.
- Michal, G. (1999):** Biochemical pathways. Biochemie-Atlas. Heidelberg: *Spektrum Akad. Verl.*
- Mishra, M.; Panda, S.; Barik, S.; Sarkar, A.; Singh, D. V.; Mohapatra, H. (2020):** Antibiotic resistance profile, outer membrane proteins, virulence factors and genome sequence analysis reveal clinical isolates of *Enterobacter* are potential pathogens compared to environmental isolates. In: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**: 54. doi: 10.3389/fcimb.2020.00054.
- Moreno-Vivián, C.; Cabello, P.; Martínez-Luque, M.; Blasco, R.; Castillo, F. (1999):** Prokaryotic nitrate reduction. Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. In: *J. Bacteriol.* **181 (21)**: 6573–6584. doi: 10.1128/JB.181.21.6573-6584.1999.
- Mosley, L. M. (2015):** Drought impacts on the water quality of freshwater systems; review and integration. In: *Earth-Sci. Rev.* **140**: 203–214. doi: 10.1016/j.earscirev.2014.11.010.
- Mukherjee, S.; Bassler, B. L. (2019):** Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **17 (6)**: 371–382. doi: 10.1038/s41579-019-0186-5.
- Mulamattathil, S. G.; Bezuidenhout, C.; Mbewe, M.; Ateba, C. N. (2014):** Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. In: *J. Pathog.* **2014**: 371208. doi: 10.1155/2014/371208.

- Müller, V. (2008):** Bacterial fermentation. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester: 1–8. doi: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2.
- Mustafa, A.; Ibrahim, M.; Rasheed, M. A.; Kanwal, S.; Hussain, A.; Sami, A.; Ahmed, R.; Bo, Z. (2020):** Genome-wide analysis of four *Enterobacter cloacae* complex type strains. Insights into virulence and niche adaptation. In: *Sci. Rep.* **10 (1)**: 8150. doi: 10.1038/s41598-020-65001-4.
- DIN EN ISO 7899-2 (2000):** Nachweis und Zählung von intestinalen Enterokokken Teil 2: Verfahren durch Membranfiltration.
- Nasser, W.; Bouillant, M. L.; Salmond, G.; Reverchon, S. (1998):** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expl-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. In: *Mol. Microbiol.* **29 (6)**: 1391–1405. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01022.x.
- Natale, P.; Brüser, T.; Driessen, A. J. M. (2008):** Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. In: *Biochim. Biophys. Acta* **1778 (9)**: 1735–1756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.07.015.
- Newton, R. J.; Jones, S. E.; Eiler, A.; McMahon, K. D.; Bertilsson, S. (2011):** A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75 (1)**: 14–49. doi: 10.1128/MMBR.00028-10.
- Nienhüser, A.; Packroff, G. (2006):** Leitfaden zur Beurteilung der mikrobiologischen Analyseverfahren für den Nachweis coliformer Bakterien im Wasser. *ATT Technische Informationen*, 12.
- Octavia, S.; Lan, R. (2014):** The Family *Enterobacteriaceae*. In: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. und Thompson, F. (Hg.): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Oh, M.; Han, J. W.; Lee, C.; Choi, G. J.; Kim, H. (2018):** Nematicidal and plant growth-promoting activity of *Enterobacter asburiae* HK169. Genome analysis provides insight into its biological activities. In: *J. Microbiol. Biotechnol.* **28 (6)**: 968–975. doi: 10.4014/jmb.1801.01021.
- O'Hara, C. M.; Rhoden, D. L.; Miller, J. M. (1992):** Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. A new look at an old product. In: *J. Clin. Microbiol.* **30 (1)**: 123–125. doi: 10.1128/jcm.30.1.123-125.1992.
- Oksanen, J.; Blanchet, F. G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlenn, D.; Minchin, P. R.; O'Hara, R. B.; Simpson, G. L.; Solymos, P.; Stevens, M. H. H.; Szoecs, E.; Wagner, H. (2019):** vegan: Community ecology package. R package version 2.5-6. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ortega, D. R.; Zhulin, I. B.; Punta, M. (2016):** Evolutionary genomics suggests that CheV is an additional adaptor for accommodating specific chemoreceptors within the chemotaxis signaling complex. In: *PLoS Comput. Biol.* **12 (2)**: e1004723. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004723.
- Packroff, G.; Clasen, J. (2005):** Eine Massenentwicklung von *Enterobacter asburiae* im Wasser der Wahnbachtalsperre im September 2003. In: Arbeitsgemeinschaft Trinkwassertalsperren e.V. (ATT) (Hg.): *Coliformen-Befunde gemäß Trinkwasserversordnung 2001. Bewertung und Maßnahmen ATT-Schriftenreihe*, 5, Bd. 5. Siegburg: 37–54.
- Packroff, G.; Clasen, J.; Hoyer, O. (2003):** Eine Massenentwicklung von *Enterobacter asburiae* im Wasser der Wahnbachtalsperre und ihre Konsequenzen für die Wasserversorgung. Wahnbachtalsperrenverband (Hg.).
- Palarea-Albaladejo, J.; Mclean, K.; Wright, F.; Smith, D. G. E. (2018):** MALDIrppa. Quality control and robust analysis for mass spectrometry data. In: *Bioinformatics* **34 (3)**: 522–523. doi: 10.1093/bioinformatics/btx628.
- Palchevskiy, V.; Finkel, S. E. (2006):** *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. In: *J. Bacteriol.* **188 (11)**: 3902–3910. doi: 10.1128/JB.01974-05.

- Paliy, O.; Shankar, V. (2016):** Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. In: *Mol. Ecol.* **25 (5)**: 1032–1057. doi: 10.1111/mec.13536.
- Pandey, P. K.; Kass, P. H.; Soupir, M. L.; Biswas, S.; Singh, V. P. (2014):** Contamination of water resources by pathogenic bacteria. In: *AMB Express* **4**: 51. doi: 10.1186/s13568-014-0051-x.
- Pandin, C.; Caroff, M.; Condemine, G. (2016):** Antimicrobial peptide resistance genes in the plant pathogen *Dickeya dadantii*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **82 (21)**: 6423–6430. doi: 10.1128/AEM.01757-16.
- Papenfort, K.; Bassler, B. L. (2016):** Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **14 (9)**: 576–588. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.
- Parte, A. C. (2018):** LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **68 (6)**: 1825–1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786.
- Paruch, L.; Paruch, A. M.; Eiken, H. G.; Sørheim, R. (2019):** Faecal pollution affects abundance and diversity of aquatic microbial community in anthropo-zoogenically influenced lotic ecosystems. In: *Sci. Rep.* **9 (1)**: 19469. doi: 10.1038/s41598-019-56058-x.
- Paton, A. W.; Paton, J. C. (1996):** *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. In: *J. Clin. Microbiol.* **34 (2)**: 463–465.
- Pavlovic, M.; Konrad, R.; Iwobi, A. N.; Sing, A.; Busch, U.; Huber, I. (2012):** A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. In: *FEMS Microbiol. Lett.* **328 (1)**: 46–53. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x.
- Pearlmutter, N. L.; Lembi, C. A. (1978):** Localization of chitin in algal and fungal cell walls by light and electron microscopy. In: *J. Histochem. Cytochem.* **26 (10)**: 782–791. doi: 10.1177/26.10.722047.
- Pelacic, V. (2008):** Type IV pili. E pluribus unum? In: *Mol. Microbiol.* **68 (4)**: 827–837. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06197.x.
- Perna, N. T.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J. D.; Rose, D. J.; Mayhew, G. F.; Evans, P. S.; Gregor, J.; Kirkpatrick, H. A.; Pósfai, G.; Hackett, J.; Klink, S.; Boutin, A.; Shao, Y.; Miller, L.; Grotbeck, E. J.; Davis, N. W.; Lim, A.; Dimalanta, E. T.; Potamouisis, K. D.; Apodaca, J.; Anantharaman, T. S.; Lin, J.; Yen, G.; Schwartz, D. C.; Welch, R. A.; Blattner, F. R. (2001):** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. In: *Nature* **409 (6819)**: 529–533. doi: 10.1038/35054089.
- Pernthaler, J. (2017):** Competition and niche separation of pelagic bacteria in freshwater habitats. In: *Environ. Microbiol.* **19 (6)**: 2133–2150. doi: 10.1111/1462-2920.13742.
- Perrin, Y.; Bouchon, D.; Delafont, V.; Moulin, L.; Héchar, Y. (2019):** Microbiome of drinking water: A full-scale spatio-temporal study to monitor water quality in the Paris distribution system. In: *Water Res.* **149**: 375–385. doi: 10.1016/j.watres.2018.11.013.
- Pinel, I. S. M.; Moed, D. H.; Vrouwenvelder, J. S.; van Loosdrecht, M. C. M. (2020):** Bacterial community dynamics and disinfection impact in cooling water systems. In: *Water Res.* **172**: 115505. doi: 10.1016/j.watres.2020.115505.
- Pinto, A. J.; Schroeder, J.; Lunn, M.; Sloan, W.; Raskin, L. (2014):** Spatial-temporal survey and occupancy-abundance modeling to predict bacterial community dynamics in the drinking water microbiome. In: *mBio* **5 (3)**: e01135-14. doi: 10.1128/mBio.01135-14.
- Popović, N. T.; Kazazić, S. P.; Strunjak-Perović, I.; Čož-Rakovac, R. (2017):** Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. In: *Environ. Res.* **152**: 7–16. doi: 10.1016/j.envres.2016.09.020.

- Procopio, N. A.; Atherholt, T. B.; Goodrow, S. M.; Lester, L. A. (2017):** The likelihood of coliform bacteria in NJ domestic wells based on precipitation and other factors. In: *Ground Water* **55 (5)**: 722–735. doi: 10.1111/gwat.12518.
- Proctor, C. R.; Besmer, M. D.; Langenegger, T.; Beck, K.; Walser, J.-C.; Ackermann, M.; Bürgmann, H.; Hammes, F. (2018):** Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. In: *ISME J.* **12 (5)**: 1344–1359. doi: 10.1038/s41396-018-0070-8.
- Props, R.; Monsieurs, P.; Vandamme, P.; Leys, N.; Denef, V. J.; Boon, N. (2019):** Gene expansion and positive selection as bacterial adaptations to oligotrophic conditions. In: *mSphere* **4 (1)**: e00011-19. doi: 10.1128/mSphereDirect.00011-19.
- Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. (2012):** SINA. Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. In: *Bioinformatics* **28 (14)**: 1823–1829. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252.
- R Core Team (2019):** R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Online verfügbar unter <https://www.R-project.org/>.
- Ramanan, R.; Kim, B.-H.; Cho, D.-H.; Oh, H.-M.; Kim, H.-S. (2016):** Algae-bacteria interactions. Evolution, ecology and emerging applications. In: *Biotechnol. Adv.* **34 (1)**: 14–29. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003.
- Ramette, A. (2007):** Multivariate analyses in microbial ecology. In: *FEMS Microbiol. Ecol.* **62 (2)**: 142–160. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- Reitter, C.; Neuhaus, K.; Hügler, M. (2021a):** Draft genome sequences of *Enterobacter* spp., *Lelliottia* spp., and *Serratia* spp., coliform bacteria from drinking water reservoirs and lakes. In: *Microbiol. Resour. Announc.* **10 (32)**: e0062221. doi: 10.1128/MRA.00622-21.
- Reitter, C.; Petzoldt, H.; Korth, A.; Schwab, F.; Stange, C.; Hamsch, B.; Tiehm, A.; Lagkouvardos, I.; Gescher, J.; Hügler, M. (2021b):** Seasonal dynamics in the number and composition of coliform bacteria in drinking water reservoirs. In: *Sci. Total Environ.* **787 (6)**: 147539. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147539.
- Ren, Y.; Ren, Y.; Zhou, Z.; Guo, X.; Li, Y.; Feng, L.; Wang, L. (2010):** Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. In: *J. Bacteriol.* **192 (9)**: 2463–2464. doi: 10.1128/JB.00067-10.
- Richter, M.; Rosselló-Móra, R. (2009):** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **106 (45)**: 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
- Robarts, R. D.; Wicks, R. J.; Gehr, R. (1990):** Seasonal changes in the dissolved free amino acid and DOC concentrations in a hypertrophic African reservoir and its inflowing rivers. In: *Hydrobiologia* **199 (3)**: 201–216. doi: 10.1007/BF00006353.
- Rodriguez-R, L. M.; Tsementzi, D.; Luo, C.; Konstantinidis, K. T. (2020):** Iterative subtractive binning of freshwater chronoserries metagenomes identifies over 400 novel species and their ecologic preferences. In: *Environ. Microbiol.* **22 (8)**: 3394–3412. doi: 10.1111/1462-2920.15112.
- Rogers, S.; Haines, J. (2005):** Detecting and migrating the environmental impact of fecal pathogens originating from confined animal feeding operations: Review. EPA/600/R-06/021. Cincinnati, Ohio: U.S. Environmental Protection Agency.
- Rogge, A.; Vogts, A.; Voss, M.; Jürgens, K.; Jost, G.; Labrenz, M. (2017):** Success of chemolithoautotrophic SUP05 and *Sulfurimonas* GD17 cells in pelagic Baltic Sea redox zones is facilitated by their lifestyles as K- and r-strategists. In: *Environ. Microbiol.* **19 (6)**: 2495–2506. doi: 10.1111/1462-2920.13783.
- Rosenberg, E.; DeLong, E. F.; Lory, S.; Stackebrandt, E.; Thompson, F. (Hg.) (2014):** The Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer.

- Rosenstock, B.; Simon, M. (1993):** Use of dissolved combined and free amino acids by planktonic bacteria in Lake Constance. In: *Limnol. Oceanogr.* **38 (7):** 1521–1531. doi: 10.4319/lo.1993.38.7.1521.
- Rottman, M.; Benzerara, Y.; Hanau-Berçot, B.; Bizet, C.; Philippon, A.; Arlet, G. (2002):** Chromosomal *ampC* genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* **210 (1):** 87–92. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11164.x.
- Ruppé, É.; Woerther, P.-L.; Barbier, F. (2015):** Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. In: *Ann. Intensive Care* **5 (1):** 61. doi: 10.1186/s13613-015-0061-0.
- Russell, A. B.; Peterson, S. B.; Mougous, J. D. (2014):** Type VI secretion system effectors. Poisons with a purpose. In: *Nat. Rev. Microbiol.* **12 (2):** 137–148. doi: 10.1038/nrmicro3185.
- Sachse, S.; Bresan, S.; Erhard, M.; Edel, B.; Pfister, W.; Saupe, A.; Rödel, J. (2014):** Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of  $\beta$ -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. In: *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **80 (4):** 267–271. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.005.
- Salvà-Serra, F.; Jaén-Luchoro, D.; Karlsson, R.; Bennasar-Figueras, A.; Jakobsson, H. E.; Moore, E. R. B. (2019):** Beware of false "type strain" genome sequences. In: *Microbiol. Resour. Announc.* **8 (22):** doi: 10.1128/MRA.00369-19.
- Sánchez, E.; Nadal, I.; Donat, E.; Ribes-Koninckx, C.; Calabuig, M.; Sanz, Y. (2008):** Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. In: *BMC Gastroenterol.* **8:** 50. doi: 10.1186/1471-230X-8-50.
- Sánchez-España, J.; Mata, M. P.; Vegas, J.; Morellón, M.; Rodríguez, J. A.; Salazar, Á.; Yusta, I.; Chaos, A.; Pérez-Martínez, C.; Navas, A. (2017):** Anthropogenic and climatic factors enhancing hypolimnetic anoxia in a temperate mountain lake. In: *J. Hydrol.* **555:** 832–850. doi: 10.1016/j.jhydrol.2017.10.049.
- Sanders, W. E.; Sanders, C. C. (1997):** *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. In: *Clin. Microbiol. Rev.* **10 (2):** 220–241. doi: 10.1128/CMR.10.2.220.
- Sandrin, T. R.; Goldstein, J. E.; Schumaker, S. (2013):** MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level. A review. In: *Mass Spectrom. Rev.* **32 (3):** 188–217. doi: 10.1002/mas.21359.
- Sarmiento, H.; Romera-Castillo, C.; Lindh, M.; Pinhassi, J.; Sala, M. M.; Gasol, J. M.; Marrase, C.; Taylor, G. T. (2013):** Phytoplankton species-specific release of dissolved free amino acids and their selective consumption by bacteria. In: *Limnol. Oceanogr.* **58 (3):** 1123–1135. doi: 10.4319/lo.2013.58.3.1123.
- Sato, T.; Usui, M.; Harada, K.; Fukushima, Y.; Nakajima, C.; Suzuki, Y.; Yokota, S.-I. (2021):** Complete genome sequence of an *mcr-9*-Possessing *Enterobacter asburiae* strain isolated from a cat in Japan. In: *Microbiol. Resour. Announc.* **10 (26):** e0028121. doi: 10.1128/MRA.00281-21.
- Sauget, M.; Valot, B.; Bertrand, X.; Hocquet, D. (2017):** Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? In: *Trends Microbiol.* **25 (6):** 447–455. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.006.
- Schultz-Fademrecht, C.; Wichern, M.; Horn, H. (2008):** The impact of sunlight on inactivation of indicator microorganisms both in river water and benthic biofilms. In: *Water Res.* **42 (19):** 4771–4779. doi: 10.1016/j.watres.2008.08.022.
- Sedláček, I.; Holochová, P.; Mašlaňová, I.; Kosina, M.; Spröer, C.; Bryndová, H.; Vandamme, P.; Rudolf, I.; Švec, P. (2013):** *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **63 (2):** 502–510. doi: 10.1099/ijs.0.041152-0.
- Sekowska, A.; Kung, H. F.; Danchin, A. (2000):** Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria. Facts and fiction. In: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2 (2):** 145–177.



- Seymour, J. R.; Amin, S. A.; Raina, J.-B.; Stocker, R. (2017):** Zooming in on the phycosphere. The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. In: *Nat. Microbiol.* **2**: 17065. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.65.
- Shannon, C. E. (2001):** A mathematical theory of communication. In: *SIGMOBILE Mob. Comput. Commun. Rev.* **5 (1)**: 3–55. doi: 10.1145/584091.584093.
- Sheppard, A. E.; Stoesser, N.; Wilson, D. J.; Sebra, R.; Kasarskis, A.; Anson, L. W.; Giess, A.; Pankhurst, L. J.; Vaughan, A.; Grim, C. J.; Cox, H. L.; Yeh, A. J.; Sifri, C. D.; Walker, A. S.; Peto, T. E.; Crook, D. W.; Mathers, A. J. (2016):** Nested russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene *bla<sub>KPC</sub>*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* **60 (6)**: 3767–3778. doi: 10.1128/AAC.00464-16.
- Shirkhorshidi, A. S.; Aghabozorgi, S.; Wah, T. Y. (2015):** A comparison study on similarity and dissimilarity measures in clustering continuous data. In: *PLoS ONE* **10 (12)**: e0144059. doi: 10.1371/journal.pone.0144059.
- Shivaji, S.; Prakash, J. S. S. (2010):** How do bacteria sense and respond to low temperature? In: *Arch. Microbiol.* **192 (2)**: 85–95. doi: 10.1007/s00203-009-0539-y.
- Siddhardha, B.; Dyavaiah, M.; Syed, A. (2020):** Model organisms for microbial pathogenesis, biofilm formation and antimicrobial drug discovery. Singapore: *Springer*.
- Sidhu, J. P. S.; Gupta, V. V. S. R.; Stange, C.; Ho, J.; Harris, N.; Barry, K.; Gonzalez, D.; van Nostrand, J. D.; Zhou, J.; Page, D.; Tiehm, A.; Toze, S. (2020):** Prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in the biofilms from an aquifer recharged with stormwater. In: *Water Res.* **185**: 116269. doi: 10.1016/j.watres.2020.116269.
- Siegrist, T. J.; Anderson, P. D.; Huen, W. H.; Kleinheinz, G. T.; McDermott, C. M.; Sandrin, T. R. (2007):** Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). In: *J. Microbiol. Methods* **68 (3)**: 554–562. doi: 10.1016/j.mimet.2006.10.012.
- Silverman, J. M.; Brunet, Y. R.; Cascales, E.; Mougous, J. D. (2012):** Structure and regulation of the type VI secretion system. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 453–472. doi: 10.1146/annurev-micro-121809-151619.
- Šimek, K.; Horňák, K.; Jezbera, J.; Nedoma, J.; Vrba, J.; Straškrábová, V.; Macek, M.; Dolan, J. R.; Hahn, M. W. (2006):** Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. In: *Environ. Microbiol.* **8 (9)**: 1613–1624. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01053.x.
- Simpson, E. H. (1949):** Measurement of diversity. In: *Nature* **163 (4148)**: 688. doi: 10.1038/163688a0.
- Slininger, P. J.; Burkhead, K. D.; Schisler, D. A. (2004):** Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:T:07. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31 (11)**: 517–524. doi: 10.1007/s10295-004-0180-3.
- Smriga, S.; Fernandez, V. I.; Mitchell, J. G.; Stocker, R. (2016):** Chemotaxis toward phytoplankton drives organic matter partitioning among marine bacteria. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **113 (6)**: 1576–1581. doi: 10.1073/pnas.1512307113.
- Song, C.; Søndergaard, M.; Cao, X.; Zhou, Y. (2018):** Nutrient utilization strategies of algae and bacteria after the termination of nutrient amendment with different phosphorus dosage. A mesocosm case. In: *Geomicrobiol. J.* **35 (4)**: 294–299. doi: 10.1080/01490451.2017.1350890.
- Sowell, S. M.; Wilhelm, L. J.; Norbeck, A. D.; Lipton, M. S.; Nicora, C. D.; Barofsky, D. F.; Carlson, C. A.; Smith, R. D.; Giovanonni, S. J. (2009):** Transport functions dominate the SAR11 metaproteome at low-nutrient extremes in the Sargasso Sea. In: *ISME J.* **3 (1)**: 93–105. doi: 10.1038/ismej.2008.83.

- Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Remans, R. (2007):** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. In: *FEMS Microbiol. Rev.* **31 (4)**: 425–448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.
- Sperandio, V.; Torres, A. G.; Kaper, J. B. (2002):** Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC). A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. In: *Mol. Microbiol.* **43 (3)**: 809–821. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02803.x.
- Stamatakis, A. (2014):** RAxML version 8. A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. In: *Bioinformatics* **30 (9)**: 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Stamatakis, A.; Hoover, P.; Rougemont, J. (2008):** A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. In: *Syst. Biol.* **57 (5)**: 758–771. doi: 10.1080/10635150802429642.
- Stange, C.; Sidhu, J. P. S.; Tiehm, A.; Toze, S. (2016):** Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. In: *Int. J. Hyg. Environ. Health* **219 (8)**: 823–831. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.07.015.
- Stange, C.; Tiehm, A. (2020):** Occurrence of antibiotic resistance genes and microbial source tracking markers in the water of a karst spring in Germany. In: *Sci. Total Environ.*: 140529. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140529.
- Stange, C.; Yin, D.; Xu, T.; Guo, X.; Schäfer, C.; Tiehm, A. (2019):** Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. In: *Sci. Total Environ.* **655**: 337–346. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.211.
- Staskawicz, B. J.; Mudgett, M. B.; Dangl, J. L.; Galan, J. E. (2001):** Common and contrasting themes of plant and animal diseases. In: *Science* **292 (5525)**: 2285–2289. doi: 10.1126/science.1062013.
- Statistisches Bundesamt (Hg.) (2018):** Öffentliche Wasserversorgung und öffentliche Abwasserentsorgung. Öffentliche Wasserversorgung.
- Stevens, M.; Ashbolt, N. J.; Cunliffe, D. (2003):** Review of coliforms as microbial indicators of drinking water quality. Recommendations to change the use of coliforms as microbial indicators of drinking water quality. Canberra: *Australian Government National Health and Medical Research Council (NHMRC)*.
- Stuber, K.; Frey, J.; Burnens, A. P.; Kuhnert, P. (2003):** Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. In: *Mol. Cell. Probes* **17 (1)**: 25–32. doi: 10.1016/S0890-8508(02)00108-1.
- Sung, B. H.; Lee, C. H.; Yu, B. J.; Lee, J. H.; Lee, J. Y.; Kim, M. S.; Blattner, F. R.; Kim, S. C. (2006):** Development of a biofilm production-deficient *Escherichia coli* strain as a host for biotechnological applications. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **72 (5)**: 3336–3342. doi: 10.1128/AEM.72.5.3336–3342.2006.
- Sutton, G. G.; Brinkac, L. M.; Clarke, T. H.; Fouts, D. E. (2018):** *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. In: *F1000Research* **7**: 521. doi: 10.12688/f1000research.14566.2.
- Suzuki, Y.; Niina, K.; Matsuwaki, T.; Nukazawa, K.; Iguchi, A. (2018):** Bacterial flora analysis of coliforms in sewage, river water, and ground water using MALDI-TOF mass spectrometry. In: *J. Environ. Sci. Health A* **53 (2)**: 160–173. doi: 10.1080/10934529.2017.1383128.
- Taghavi, S.; van der Lelie, D.; Hoffman, A.; Zhang, Y.-B.; Walla, M. D.; Vangronsveld, J.; Newman, L.; Monchy, S. (2010):** Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. In: *PLoS Genet.* **6 (5)**: e1000943. doi: 10.1371/journal.pgen.1000943.

- Taghavi, S.; Wu, X.; Ouyang, L.; Zhang, Y. B.; Stadler, A.; McCorkle, S.; Zhu, W.; Maslov, S.; van der Lelie, D. (2015):** Transcriptional responses to sucrose mimic the plant-associated life style of the plant growth promoting endophyte *Enterobacter* sp. 638. In: *PLoS ONE* **10** (1): e0115455. doi: 10.1371/journal.pone.0115455.
- Tagini, F.; Greub, G. (2017):** Bacterial genome sequencing in clinical microbiology. A pathogen-oriented review. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **36** (11): 2007–2020. doi: 10.1007/s10096-017-3024-6.
- Tamames, J.; Abellán, J. J.; Pignatelli, M.; Camacho, A.; Moya, A. (2010):** Environmental distribution of prokaryotic taxa. In: *BMC Microbiol.* **10**: 85. doi: 10.1186/1471-2180-10-85.
- Taneja, N. K.; Ganguly, T.; Bakaletz, L. O.; Nelson, K. J.; Dubey, P.; Poole, L. B.; Deora, R. (2013):** D-alanine modification of a protease-susceptible outer membrane component by the *Bordetella pertussis* *dra* locus promotes resistance to antimicrobial peptides and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing. In: *J. Bacteriol.* **195** (22): 5102–5111. doi: 10.1128/JB.00510-13.
- Tatusova, T.; DiCuccio, M.; Badretdin, A.; Chetvernin, V.; Nawrocki, E. P.; Zaslavsky, L.; Lomsadze, A.; Pruitt, K. D.; Borodovsky, M.; Ostell, J. (2016):** NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. In: *Nucleic Acids Res.*: 6614–6624. doi: 10.1093/nar/gkw569.
- Temperton, B.; Gilbert, J. A.; Quinn, J. P.; McGrath, J. W. (2011):** Novel analysis of oceanic surface water metagenomes suggests importance of polyphosphate metabolism in oligotrophic environments. In: *PLoS ONE* **6** (1): e16499. doi: 10.1371/journal.pone.0016499.
- Teufel, R.; Mascaraque, V.; Ismail, W.; Voss, M.; Perera, J.; Eisenreich, W.; Haehnel, W.; Fuchs, G. (2010):** Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **107** (32): 14390–14395. doi: 10.1073/pnas.1005399107.
- Tipping, E.; Thacker, S. A.; Wilson, D.; Hall, J. R. (2008):** Long-term nitrate increases in two oligotrophic lakes, due to the leaching of atmospherically-deposited N from moorland ranker soils. In: *Environ. Pollut.* **152** (1): 41–49. doi: 10.1016/j.envpol.2007.06.001.
- Toledo, F. L.; Gonzalez-Lopez, J.; Calvo, C. (2008):** Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. In: *Bioresour. Technol.* **99** (17): 8470–8475. doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.055.
- Torres, C. A. V.; Antunes, S.; Ricardo, A. R.; Grandfils, C.; Alves, V. D.; Freitas, F.; Reis, M. A. M. (2012):** Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis. In: *Bioresour. Technol.* **119**: 148–156. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.106.
- Tranvik, L. J.; Jørgensen, N. O. G. (1995):** Colloidal and dissolved organic matter in lake water. Carbohydrate and amino acid composition, and ability to support bacterial growth. In: *Biogeochemistry* **30** (2). doi: 10.1007/BF00002725.
- Trinkwasserverordnung (2001):** Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch.
- Troisfontaines, P.; Cornelis, G. R. (2005):** Type III secretion. More systems than you think. In: *Physiology* **20**: 326–339. doi: 10.1152/physiol.00011.2005.
- Uhlmann, D.; Horn, W. (2006):** Ökologie von Stauseen. Lebensräume, Organismen, Raum-Zeit-Strukturen. In: *Biol. Unserer Zeit* **36** (2): 92–101. doi: 10.1002/biuz.200610306.
- Umweltbundesamt (UBA) (2009):** Coliforme Bakterien im Trinkwasser. Empfehlung zur Risikoabschätzung und Maßnahmen bei systemischer Kontamination - Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit beim Umweltbundesamt. In: *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **52** (4): 474–482. doi: 10.1007/s00103-009-0823-7.

- Umweltbundesamt (UBA) (Hg.) (2010):** Quantitative Bestimmung der Wirksamkeit von Stoffen zur Desinfektion in der Trinkwasseraufbereitung. Dessau-Roßlau.
- United Nations (UN):** Resolution 64/292.
- United Nations (UN) (2018):** Sustainable development goals report 2018. New York: *United Nations Publications*.
- Unno, T.; Jang, J.; Han, D.; Kim, J. H.; Sadowsky, M. J.; Kim, O.-S.; Chun, J.; Hur, H.-G. (2010):** Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watersheds. In: *Environ. Sci. Technol.* **44 (20)**: 7777–7782. doi: 10.1021/es101500z.
- Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Klochkova, N. G. (1995):** Polysaccharides of algae. 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). In: *Botanica Marina* **38 (1-6)**: 1183. doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43.
- van Houdt, R.; Moons, P.; Hueso Buj, M.; Michiels, C. W. (2006):** N-acyl-L-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens* MG1. In: *J. Bacteriol.* **188 (12)**: 4570–4572. doi: 10.1128/JB.00144-06.
- van Lieverloo, J. H. M.; Hoogenboezem, W.; Veenendaal, G.; van der Kooij, D. (2012):** Variability of invertebrate abundance in drinking water distribution systems in the Netherlands in relation to biostability and sediment volumes. In: *Water Res.* **46 (16)**: 4918–4932. doi: 10.1016/j.watres.2012.03.047.
- Varivarn, K.; Champa, L. A.; Silby, M. W.; Robleto, E. A. (2013):** Colonization strategies of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. Activation of soil-specific genes important for diverse and specific environments. In: *BMC Microbiol.* **13**: 92. doi: 10.1186/1471-2180-13-92.
- Vaz-Moreira, I.; Nunes, O. C.; Manaia, C. M. (2014):** Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. In: *FEMS Microbiol. Rev.* **38 (4)**: 761–778. doi: 10.1111/1574-6976.12062.
- Vazquez, P.; Holguin, G.; Puente, M. E.; Lopez-Cortes, A.; Bashan, Y. (2000):** Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. In: *Biol. Fertil. Soils* **30 (5-6)**: 460–468. doi: 10.1007/s003740050024.
- Verstraeten, N.; Braeken, K.; Debkumari, B.; Fauvart, M.; Fransaer, J.; Vermant, J.; Michiels, J. (2008):** Living on a surface. Swarming and biofilm formation. In: *Trends Microbiol.* **16 (10)**: 496–506. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.004.
- Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. (2012):** Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). In: *Pure Appl. Chem.* **84 (2)**: 377–410. doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- Volkan, E.; Kalas, V.; Hultgren, S. (2015):** Pili and fimbriae of Gram-negative bacteria. In: Tang, Y.-W., Sussmann, M., Dongyou, L., Poxton, I. und Schwartzman, J. (Hg.): *Molecular medical microbiology*. 1. Aufl.: Elsevier.
- von Bodman, S. B.; Majerczak, D. R.; Coplin, D. L. (1998):** A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. In: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95 (13)**: 7687–7692. doi: 10.1073/pnas.95.13.7687.
- Wadhams, G. H.; Armitage, J. P. (2004):** Making sense of it all. Bacterial chemotaxis. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5 (12)**: 1024–1037. doi: 10.1038/nrm1524.
- Walters, M.; Sperandio, V. (2006):** Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: *Int. J. Med. Microbiol.* **296 (2-3)**: 125–131. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.041.

- Wang, X.; Preston, J. F.; Romeo, T. (2004):** The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. In: *J. Bacteriol.* **186** (9): 2724–2734. doi: 10.1128/JB.186.9.2724–2734.2004.
- DIN EN ISO 9308-1 (2017):** Wasserbeschaffenheit – Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien – Teil 1: Membranfiltrationsverfahren für Wasser mit niedriger Begleitflora (ISO 9308-1:2014 + Amd 1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 9308-1:2014 + A1:2017.
- DIN EN ISO 9308-2 (2014):** Wasserbeschaffenheit - Zählung von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien - Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl (ISO 9308-2:2012); Deutsche Fassung EN ISO 9308-2:2014.
- Wasserchemische Gesellschaft; Deutsches Institut für Normung e. V. (DIN) (2020):** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. 1-111. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Beuth Verlag GmbH.
- Wattam, A. R.; Brettin, T.; Davis, J. J.; Gerdes, S.; Kenyon, R.; Machi, D.; Mao, C.; Olson, R.; Overbeek, R.; Pusch, G. D.; Shukla, M. P.; Stevens, R.; Vonstein, V.; Warren, A.; Xia, F.; Yoo, H. (2018):** Assembly, annotation, and comparative genomics in PATRIC, the all bacterial Bioinformatics Resource Center. In: *Meth. Mol. Biol.* **1704**: 79–101. doi: 10.1007/978-1-4939-7463-4\_4.
- Weber, M.; Rinke, K.; Hipsey, M. R.; Boehrer, B. (2017):** Optimizing withdrawal from drinking water reservoirs to reduce downstream temperature pollution and reservoir hypoxia. In: *J. Environ. Manage.* **197**: 96–105. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.03.020.
- Wei, T.; Simko, V. (2021):** R package 'corrplot': Visualization of a correlation matrix. Online verfügbar unter <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- Wen, X.; Chen, F.; Lin, Y.; Zhu, H.; Yuan, F.; Kuang, D.; Jia, Z.; Yuan, Z. (2020):** Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality - A Review. In: *Sustainability* **12** (6): 2249. doi: 10.3390/su12062249.
- Wentzky, V. C.; Frassl, M. A.; Rinke, K.; Boehrer, B. (2019):** Metalimnetic oxygen minimum and the presence of *Planktothrix rubescens* in a low-nutrient drinking water reservoir. In: *Water Res.* **148**: 208–218. doi: 10.1016/j.watres.2018.10.047.
- Wentzky, V. C.; Tittel, J.; Jäger, C. G.; Rinke, K. (2018):** Mechanisms preventing a decrease in phytoplankton biomass after phosphorus reductions in a German drinking water reservoir-results from more than 50 years of observation. In: *Freshw. Biol.* **63** (9): 1063–1076. doi: 10.1111/fwb.13116.
- Weston, N.; Sharma, P.; Ricci, V.; Piddock, L. J. V. (2018):** Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*. In: *Res. Microbiol.* **169** (7-8): 425–431. doi: 10.1016/j.resmic.2017.10.005.
- Wetzel, R. G. (2001):** Limnology. Lake and river ecosystems. 3. Aufl. San Diego, Calif.: Acad. Press Elsevier.
- White-Ziegler, C. A.; Davis, T. R. (2009):** Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. In: *J. Bacteriol.* **191** (3): 1106–1110. doi: 10.1128/JB.00599-08.
- Wick, R. R.; Judd, L. M.; Gorrie, C. L.; Holt, K. E. (2017):** Unicycler. Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. In: *PLoS Comput. Biol.* **13** (6): e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Wickham, H. (2016):** ggplot2: Elegant graphics for data analysis. 1. Aufl. New York: Springer.
- Wiedenmann, A.; Langhammer, W.; Botzenhart, K. (1988):** Enterobakterien als Qualitätskriterium bei Roh-, Trink- und Badewasser - Vergleichende Untersuchungen über das Vorkommen von Enterobakterien, *E. coli*, coliformen Keimen, Kolonienzahl, Fäkalstreptokokken und *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* **187**: 91–106.

- Wilkins, M. J.; Kennedy, D. W.; Castelle, C. J.; Field, E. K.; Stepanauskas, R.; Fredrickson, J. K.; Konopka, A. E. (2014):** Single-cell genomics reveals metabolic strategies for microbial growth and survival in an oligotrophic aquifer. In: *Microbiology* **160** (2): 362–372. doi: 10.1099/mic.0.073965-0.
- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. (1990):** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucleic Acids Res.* **18** (22): 6531–6535.
- Willmitzer, H.; Jäschke, K.; Berendonk, T. U.; Paul, L. (2015):** Einfluss von Klimaänderungen auf die Wasserqualität von Talsperren und Strategien zur Minimierung der Auswirkungen. In: *DVGW energie | wasser-praxis* **66**: 84–88.
- Wong, T. Y.; Preston, L. A.; Schiller, N. L. (2000):** Alginate lyase. Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. In: *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 289–340. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.289.
- World Health Organization (WHO) (Hg.) (2001):** Water quality: Guidelines, standards and health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. London: *IWA Publishing*.
- World Health Organization (WHO) (2016):** Protecting surface water for health. Identifying, assessing and managing drinking-water quality risks in surface-water catchments. Geneva, Switzerland: *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.
- World Health Organization (WHO) (2017):** Guidelines for drinking-water quality. 4. Aufl. Geneva: *World Health Organization*.
- World Health Organization (WHO); United Nations Children's Fund (UNICEF) (2000):** Global water supply and sanitation assessment 2000 report.
- Yang, L.; Kuroda, A.; Ikeda, T.; Takiguchi, N.; Ohtake, H.; Kato, J. (2004):** Characterization of pEC01, a novel plasmid required for phosphate taxis in *Enterobacter cloacae* IFO 3320. In: *Microb. Environ.* **19** (1): 45–52. doi: 10.1264/jsme2.19.45.
- Yankova, Y.; Neuenschwander, S.; Köster, O.; Posch, T. (2017):** Abrupt stop of deep water turnover with lake warming. Drastic consequences for algal primary producers. In: *Sci. Rep.* **7** (1): 13770. doi: 10.1038/s41598-017-13159-9.
- Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Lim, J.; Kwon, S.; Chun, J. (2017):** A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. In: *Antonie van Leeuwenhoek* **110** (10): 1281–1286. doi: 10.1007/s10482-017-0844-4.
- Yuk, K.-J.; Kim, Y.-T.; Huh, C.-S.; Lee, J.-H. (2018):** *Lelliottia jeotgali* sp. nov., isolated from a traditional Korean fermented clam. In: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **68** (5): 1725–1731. doi: 10.1099/ijsem.0.002737.
- Zampieri, M.; Hörl, M.; Hotz, F.; Müller, N. F.; Sauer, U. (2019):** Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. In: *Nat. Commun.* **10** (1): 3354. doi: 10.1038/s41467-019-11331-5.
- Zeileis, A.; Grothendieck, G. (2005):** zoo. S3 infrastructure for regular and irregular time series. In: *J. Stat. Softw.* **14** (6). doi: 10.18637/jss.v014.i06.
- Zeng, D.-N.; Fan, Z.-Y.; Chi, L.; Wang, X.; Qu, W.-D.; Quan, Z.-X. (2013):** Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. In: *World J. Microbiol. Biotech.* **29** (9): 1573–1584. doi: 10.1007/s11274-013-1321-5.
- Zhang, T.; Lu, X.; Yu, R.; Qin, M.; Wei, C.; Hong, S. (2020):** Response of extracellular and intracellular alkaline phosphatase in *Microcystis aeruginosa* to organic phosphorus. In: *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **27** (34): 42304–42312. doi: 10.1007/s11356-020-09736-7.

- Zhang, Y.; Burkhardt, D. H.; Rouskin, S.; Li, G.-W.; Weissman, J. S.; Gross, C. A. (2018):** A stress response that monitors and regulates mRNA structure is central to cold shock adaptation. In: *Mol. Cell* **70** (2): 274-286.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.035.
- Zhang, Y.; Peng, C.; Wang, J.; Huang, S.; Hu, Y.; Zhang, J.; Li, D. (2019):** Temperature and silicate are significant driving factors for the seasonal shift of dominant diatoms in a drinking water reservoir. In: *J. Ocean. Limnol.* **37** (2): 568–579. doi: 10.1007/s00343-019-8040-1.
- Zhou, J.; Lao, Y.-M.; Ma, Z.-P.; Cai, Z.-H. (2016):** Genome sequence of *Enterobacter* sp. ST3, a quorum sensing bacterium associated with marine dinoflagellate. In: *Genom. Data* **7**: 195–199. doi: 10.1016/j.gdata.2016.01.008.
- Zhu, B.; Wang, S.; Li, O.; Hussain, A.; Hussain, A.; Shen, J.; Ibrahim, M. (2017):** High-quality genome sequence of human pathogen *Enterobacter asburiae* type strain 1497-78<sup>T</sup>. In: *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **8**: 104–105. doi: 10.1016/j.jgar.2016.12.003.
- Zogaj, X.; Nimitz, M.; Rohde, M.; Bokranz, W.; Römling, U. (2001):** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. In: *Mol. Microbiol.* **39** (6): 1452–1463. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x.
- Zweckverband Wasserversorgung Kleine Kinzig (ZVWKK) (2012):** Informationsbroschüre. Schema der Verfahrenstechnik der Wasserversorgung Kleine Kinzig. Online verfügbar unter <https://www.zvwkk.de/content/3-betriebsbesichtigung/modules/3-section-1a41pkq/wkk-informationsbroschuere.pdf>.
- Zweckverband Wasserversorgung Kleine Kinzig (ZVWKK) (2018):** Geschäftsbericht 2018. Alpirsbach-Reinerzau.
- Zweckverband Wasserversorgung Kleine Kinzig (ZVWKK) (2019):** Geschäftsbericht 2019. Alpirsbach-Reinerzau.

# Anhang

- Tabelle A 1 Mikrobiologische Parameter der Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig pro Quartal der Jahre 2018 und 2019.
- Tabelle A 2 Mikrobiologische Parameter im Rohwasser der fünf untersuchten Talsperren.
- Tabelle A 3 Meteorologische Parameter der fünf untersuchten Talsperren.
- Tabelle A 4 Physikochemische Parameter im Tiefenprofil der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 1 Tiefenschnitt des Chlorophyllgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 2 Tiefenschnitt des Manganangehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 3 Tiefenschnitt des Nitratgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 4 Tiefenschnitt des TOC-Gehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 5 Tiefenschnitt des Gesamtphosphatgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.
- Abbildung A 6 Phytoplankton-Daten aus dem Rohwasser der Rappbode Talsperre (R5).



**Tabelle A 1 Mikrobiologische Parameter der Talsperren Klingenberg und Kleine Kinzig pro Quartal der Jahre 2018 und 2019.**

Proben n positiv			2018									2019											
			Apr–Juni (Q2)			Juli–Sept (Q3)			Okt–Dez (Q4)			Jan–Mär (Q1)			Apr–Juni (Q2)			Juli–Sept (Q3)			Okt–Dez (Q4)		
			Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max	Median	Min	Max
<b>Klingenberg Talsperre (R1)</b>																							
<b>Oberflächenwasser</b>																							
CF	32	32 (100 %)	<b>77</b>	7	236	<b>608</b>	88	2092	<b>35</b>	9	435	<b>25</b>	8	39	<b>16</b>	3	225	<b>57</b>	21	88	<b>26</b>	10	36
EC	32	10 (31 %)	<b>0</b>	0	1	<b>2</b>	0	6	<b>0</b>	0	1	<b>1</b>	0	6	<b>0</b>	0	1	<b>0</b>	0	1	<b>0</b>	0	0
EN	32	19 (59 %)	<b>1</b>	0	1	<b>0</b>	0	1	<b>2</b>	0	4	<b>2</b>	0	11	<b>0</b>	0	2	<b>1</b>	0	2	<b>0</b>	0	1
<b>Rohwasser</b>																							
CF	32	32 (100 %)	<b>14</b>	1	86	<b>1389</b>	4	3973	<b>102</b>	13	1633	<b>29</b>	6	42	<b>9</b>	6	10	<b>34</b>	12	50	<b>25</b>	13	57
EC	32	11 (34 %)	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	4	<b>1</b>	0	4	<b>2</b>	0	7	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	4	<b>0</b>	0	1
EN	32	16 (50 %)	<b>0</b>	0	1	<b>3</b>	0	16	<b>0</b>	0	4	<b>3</b>	0	23	<b>0</b>	0	0	<b>1</b>	0	1	<b>0</b>	0	0
<b>Zufluss</b>																							
CF	26	26 (100 %)	<b>439</b>	69	727	<b>1540</b>	228	3106	<b>276</b>	70	980	<b>143</b>	75	517	<b>222</b>	18	326	<b>464</b>	179	727	<b>205</b>	129	387
EC	26	26 (100 %)	<b>15</b>	2	58	<b>22</b>	11	153	<b>25</b>	10	34	<b>12</b>	2	29	<b>17</b>	1	36	<b>29</b>	9	43	<b>9</b>	5	9
EN	26	26 (100 %)	<b>54</b>	1	96	<b>64</b>	26	420	<b>25</b>	19	47	<b>10</b>	2	53	<b>5</b>	1	108	<b>85</b>	30	143	<b>6</b>	1	12
<b>Kleine Kinzig Talsperre (R2)</b>																							
<b>Oberflächenwasser</b>																							
CF	44	43 (98 %)	<b>461</b>	44	5400	<b>670</b>	87	3670	<b>336</b>	11	770	<b>16</b>	0	46	<b>40</b>	0	2420	<b>9460</b>	467	>24200	<b>29</b>	10	125
EC	44	15 (34 %)	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	10	<b>0</b>	0	1	<b>1</b>	0	2	<b>0</b>	0	3	<b>1</b>	0	4	<b>0</b>	0	2
EN	44	12 (27 %)	<b>2</b>	0	19	<b>1</b>	0	6	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	1	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	9	<b>0</b>	0	0
<b>Rohwasser</b>																							
CF	44	43 (98 %)	<b>24</b>	13	228	<b>104</b>	10	1779	<b>55</b>	16	486	<b>13</b>	0	30	<b>4</b>	0	19	<b>794</b>	50	1677	<b>24</b>	13	114
EC	44	6 (14 %)	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>1</b>	0	4	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	1
EN	44	4 (9 %)	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	1	<b>0</b>	0	2	<b>0</b>	0	1	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0

**Tabelle A 2 Mikrobiologische Parameter im Rohwasser der fünf untersuchten Talsperren.**

	<b>CF</b>	<b>EC</b>	<b>EN</b>	<b>HPC22</b>	<b>HPC36</b>
	n/100 ml	n/100 ml	n/100 ml	n/100 ml	n/100 ml
<b>Klingenberg Talsperre (R1)</b>					
2018	792±1404	1±1	3±5	151±304	67±88
2019	25±18	1±2	2±6	103±123	33±26
2020	501±1261	2±5	1±1	83±111	71±105
<b>Kleine Kinzig Talsperre (R2)</b>					
2018	275±552	0±1	0±1	60±71	12±16
2019	380±643	0±1	0±0	59±67	17±27
2020	104±120	0±1	0±0	33±28	7±6
<b>Wahnbach Talsperre (R3)</b>					
2018	640±1861	1±3	1±2	68±59	37±53
2019	31±25	1±2	1±1	60±68	18±18
2020	26±16	0±1	1±1	86±116	56±96
<b>Breitenbach Talsperre (R4)</b>					
2018	24±24	1±2	0±1	55±134	7±9
2019	417±1336	1±2	1±1	124±134	14±15
2020	2466±6251	1±10	0±1	133±212	31±57
<b>Rappbode Talsperre (R5)</b>					
2018	176±471	1±2	1±3	38±57	8±6
2019	275±592	0±1	0±1	28±23	7±6
2020	1418±3127	0±1	0±1	34±31	15±21

Die Werte zeigen den Mittelwert, sowie die Standardabweichung an. CF = Coliforme Bakterien, EC = *E. coli*, EN = Enterokokken, HPC22 = Koloniezahl bei 22 °C, HPC36 = Koloniezahl bei 36 °C. Es wurden folgende Zeiträume betrachtet: R1: April 2018 bis Oktober 2020, R2: Januar 2018 bis September 2020, R3: Januar 2018 bis November 2020, R4: Januar 2018 bis November 2020, R5: Januar 2018 bis November 2020.

**Tabelle A 3 Meteorologische Parameter der fünf untersuchten Talsperren.**

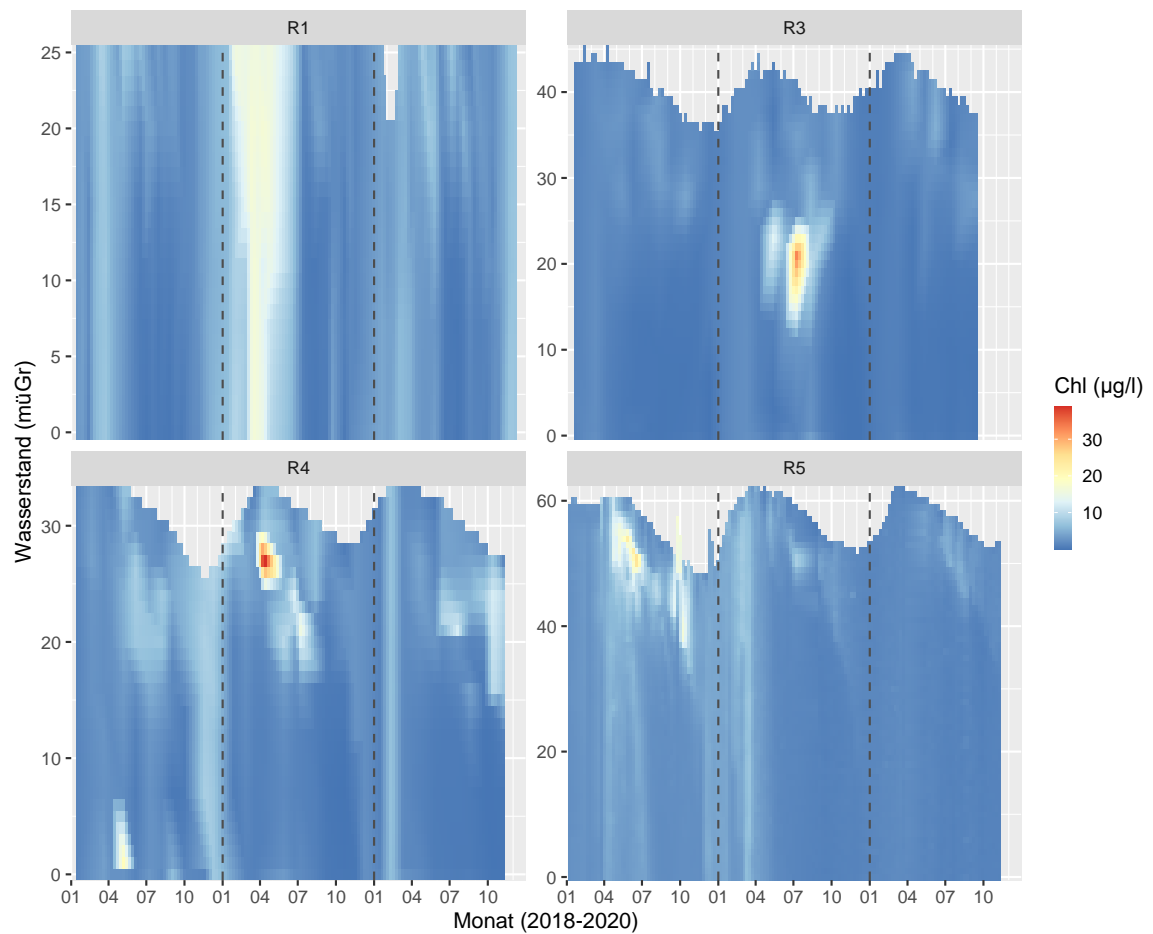
	PR	WS	AT
	l/m <sup>3</sup>	m/s	°C
<b>Klingenberg Talsperre (R1)</b>			
2018	536,0	1,0±0,5	9,2±8,2
2019	690,4	1,0±0,5	9,3±7,4
2020	704,6	1,0±0,4	9,1±6,6
<b>Kleine Kinzig Talsperre (R2)</b>			
2018	1454,0	2,5±0,7	9,7±7,8
2019	1940,6	2,4±0,7	9,2±7,1
2020	1132,8	2,6±0,7	10,9±6,6
<b>Wahnbach Talsperre (R3)</b>			
2018	640,5	3,4±1,4	12,1±7,4
2019	853,4	3,4±1,4	11,7±6,6
2020	611,8	3,5±1,9	11,7±6,2
<b>Breitenbach Talsperre (R4)</b>			
2018	985,3	-	10,9±8,4
2019	1128,2	-	9,7±7,0
2020	963,1	-	10,9±6,1
<b>Rappbode Talsperre (R5)</b>			
2018	429,4	-	10,8±8,2
2019	545,4	-	10,8±7,0
2020	438,7	-	10,9±6,3

Die Werte zeigen den Mittelwert, sowie die Standardabweichung an. PR = Niederschlag, WS = Windgeschwindigkeit, AT = Lufttemperatur. Es wurden folgende Zeiträume betrachtet: R1: Januar 2018 bis Dezember 2020, R2: Januar 2018 bis September 2020, R3: Januar 2018 bis Dezember 2020, R4: Januar 2018 bis November 2020, R5: Januar 2018 bis Dezember 2020.

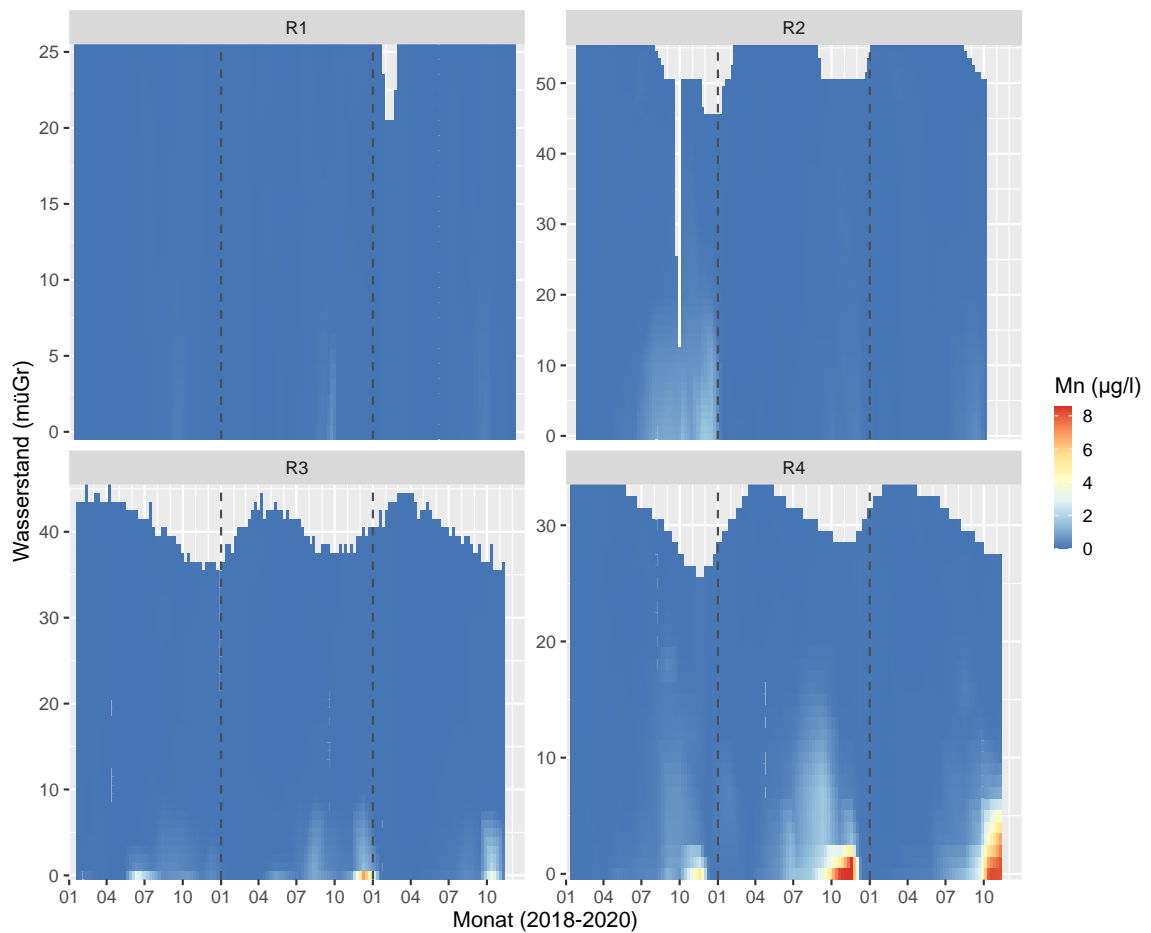
**Tabelle A 4 Physikochemische Parameter im Tiefenprofil der fünf untersuchten Talsperren.**

	WT	pH	OXY_K	OXY_S	TUR	SAK	CON	Chl	TOC	NO3	NO2	NH4	oPO4	TP	SO4	SI	Mn	Fe	
	°C		mg/l	%	FNU	m <sup>-1</sup>	µS/cm	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	
<b>Klingenberg Talsperre (R1)</b>																			
2018	9,2±5,1	7,2±0,3	10,4±1,9	91,5±8,8	0,5±0,4	6,8±0,9	146±2,6	3,5±2,0	3,5±0,2	13,0±2,5	0,040±0,032	0,040±0,017	0,005±0,002	0,025±0,005	20,0±0,7	6,9±0,5	0,015±0,023	0,010±0,004	
2019	8,8±4,6	7,1±0,2	10,8±2,1	93,6±13,4	1,0±0,4	6,6±0,6	156,8±8,0	6,6±5,3	3,5±0,3	13,6±3,3	0,028±0,031	0,037±0,011	0,006±0,003	0,020±0,004	21,1±0,7	5,8±0,4	0,021±0,039	0,012±0,006	
2020	9,6±4,7	7,2±0,3	10,6±1,8	95,1±9,3	1,0±0,7	6,7±0,7	147,9±3,3	3,7±1,8	3,5±0,4	9,9±1,4	0,026±0,031	0,038±0,017	0,004±0,001	0,022±0,004	21,2±0,4	5,6±0,7	0,016±0,023	0,011±0,006	
<b>Kleine Kinzig Talsperre (R2)</b>																			
2018	6,2±3,3	6,7±0,3	9,2±2,7	79,4±24,2	1,4±2,2	8,4±2,6	40,5±3,3	7,0±2,5	2,2±0,2	1,6±0,5	-	-	-	0,029±0,011	-	1,4±0,4	0,155±0,274	0,204±0,253	
2019	6,6±3,2	6,7±0,3	8,5±1,6	73,7±14,2	0,6±0,4	7,9±1,8	39,8±4,3	5,2±3,6	2,4±0,2	1,5±0,4	-	-	-	0,019±0,007	-	1,5±0,1	0,025±0,034	0,047±0,029	
2020	7,0±3,4	6,8±0,3	8,2±1,7	72,5±18,8	0,5±0,3	7,0±1,5	38,5±3,6	2,0±1,3	2,1±0,3	1,5±0,3	-	-	-	0,064±0,168	-	1,6±0,1	0,029±0,053	0,059±0,057	
<b>Wahnbach Talsperre (R3)</b>																			
2018	7,8±4,7	7,4±0,3	12,0±2,1	101,9±17,7	0,7±0,4	2,7±0,2	174,6±57,7	1,5±0,9	1,6±0,2	10,0±1,2	0,036±0,024	0,031±0,036	-	0,140±0,517	-	2,1±0,7	0,040±0,160	0,016±0,044	
2019	8,1±4,4	7,4±0,4	11,7±2,1	102,1±17,4	1,2±1,1	2,7±0,2	187,3±55,2	2,8±3,5	1,7±0,2	10,3±1,1	0,025±0,015	0,030±0,026	-	0,166±0,541	-	2,0±0,6	0,071±0,315	0,014±0,005	
2020	8,8±4,4	7,3±0,4	10,9±2,0	96,6±18,0	0,8±0,6	2,8±0,2	176,8±51,8	1,2±0,9	1,7±0,2	11,1±1,0	0,026±0,015	0,023±0,011	-	0,379±0,849	-	2,2±0,8	0,055±0,227	0,013±0,004	
<b>Breitenbach Talsperre (R4)</b>																			
2018	7,4±4,7	7,3±0,5	-	85,0±23,6	1,3±1,0	3,0±0,3	-	3,9±2,3	1,7±0,3	3,5±0,9	0,019±0,024	0,056±0,071	0,002±0,002	0,039±0,011	10,4±1,7	1,5±0,8	0,130±0,332	0,038±0,032	
2019	7,7±4,4	7,3±0,6	-	79,8±25,8	1,3±0,7	3,2±0,2	-	3,0±3,5	1,9±0,4	3,2±0,8	0,013±0,006	0,058±0,074	0,003±0,004	0,038±0,012	10,1±0,9	1,6±0,9	0,319±0,865	0,047±0,034	
2020	8,2±4,6	7,3±0,6	-	80,3±28,6	1,1±0,8	3,0±0,1	-	2,8±2,5	1,7±0,3	2,9±0,8	0,019±0,016	0,057±0,084	0,003±0,001	0,027±0,010	10,4±0,2	1,2±0,7	0,265±0,968	0,038±0,012	
<b>Rappbode Talsperre (R5)</b>																			
2018	5,9±4,0	7,4±0,3	10,6±1,4	90,1±10,8	1,2±0,9	-	144,3±3,6	4,3±2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2019	6,0±3,7	7,2±0,4	10,6±1,4	85,8±10,8	0,6±0,4	-	158,5±2,5	2,8±1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2020	6,2±3,6	7,4±0,8	10,3±1,6	83,3±12,9	0,9±0,7	-	157,4±2,5	1,8±0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Die Werte zeigen den Mittelwert, sowie die Standardabweichung an. WT = Wassertemperatur, pH = pH-Wert, OXY\_K = Sauerstoffgehalt, OXY\_S = Sauerstoffsättigung, TUR = Trübung, SAK = SAK 254 nm, CON = Leitfähigkeit, Chl = Chlorophyll a, TOC = gesamter organischer Kohlenstoff, NO3 = Nitrat, NO2 = Nitrit, NH4 = Ammoniak, oPO4 = ortho-Phosphat, TP = Gesamtphosphat, SO4 = Sulfat, SI = Silikat, Mn = Mangan, Fe = Eisen. Es wurden folgende Zeiträume betrachtet: R1: Januar 2018 bis Dezember 2020, R2: Januar 2018 bis Oktober 2020, R3: Januar 2018 bis November 2020, R4: Januar 2018 bis November 2020, R5: Januar 2018 bis November 2020.

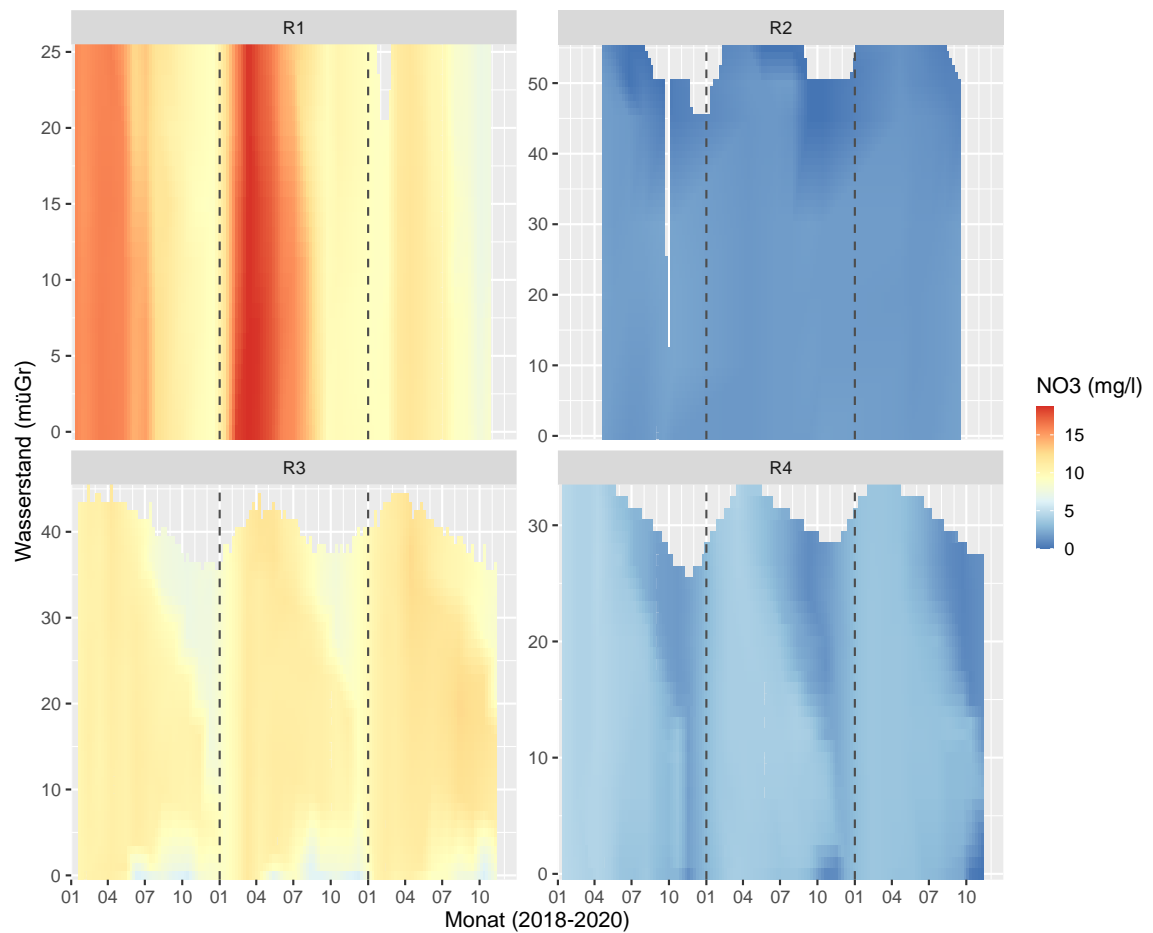


**Abbildung A 1 Tiefenschnitt des Chlorophyllgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.** Gezeigt sind die interpolierten Daten des Chlorophylls (Chl,  $\mu\text{g/l}$ ) in den verschiedenen Tiefen der Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach, R5 = Rappbode. Aus der Talsperre Kleine Kinzig (R2) gab es nicht ausreichend Daten für eine Interpolation.

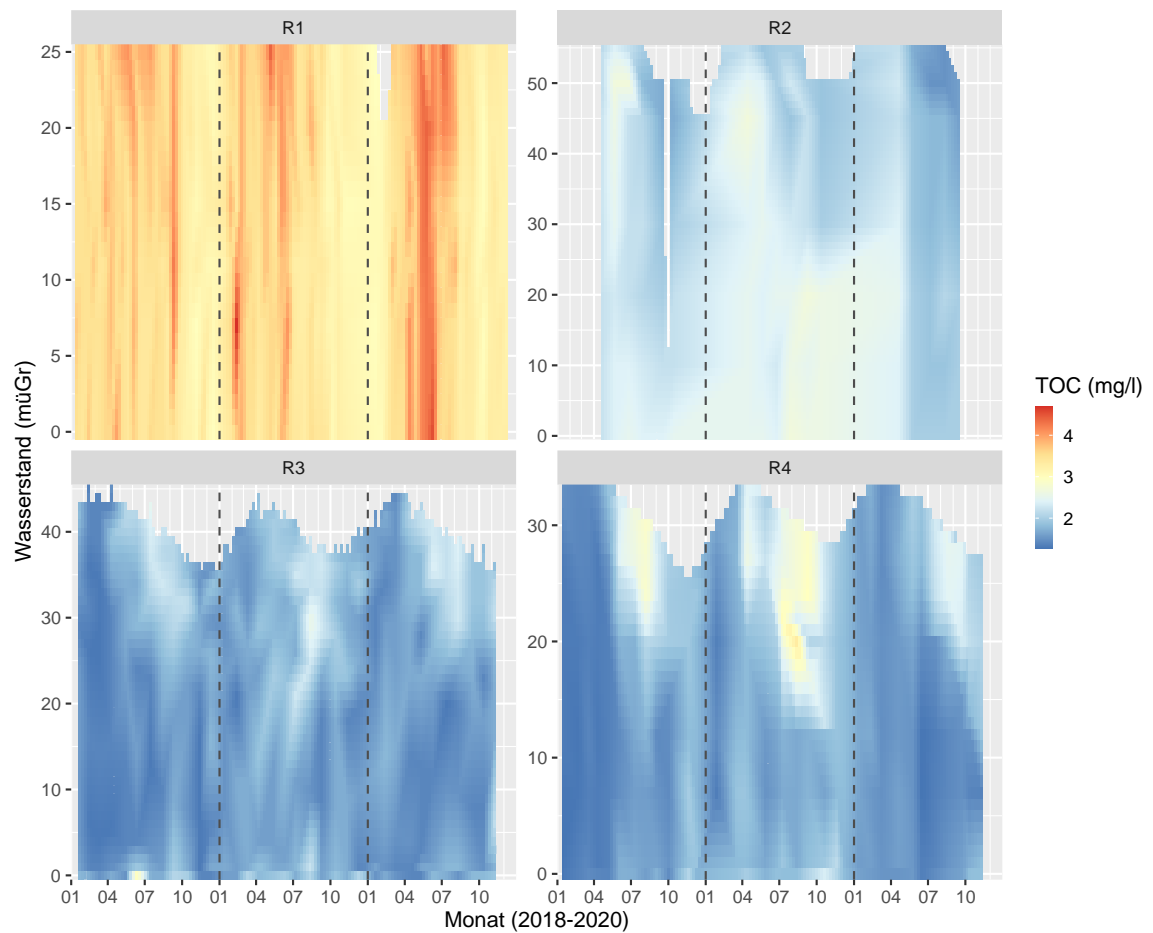


**Abbildung A 2 Tiefenschnitt des Mangangehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.**

Gezeigt sind die interpolierten Daten des Mangans (Mn,  $\mu\text{g/l}$ ) in den verschiedenen Tiefen der Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach. Aus der Talsperre Rappbode (R5) gab es keine Daten für eine Interpolation.



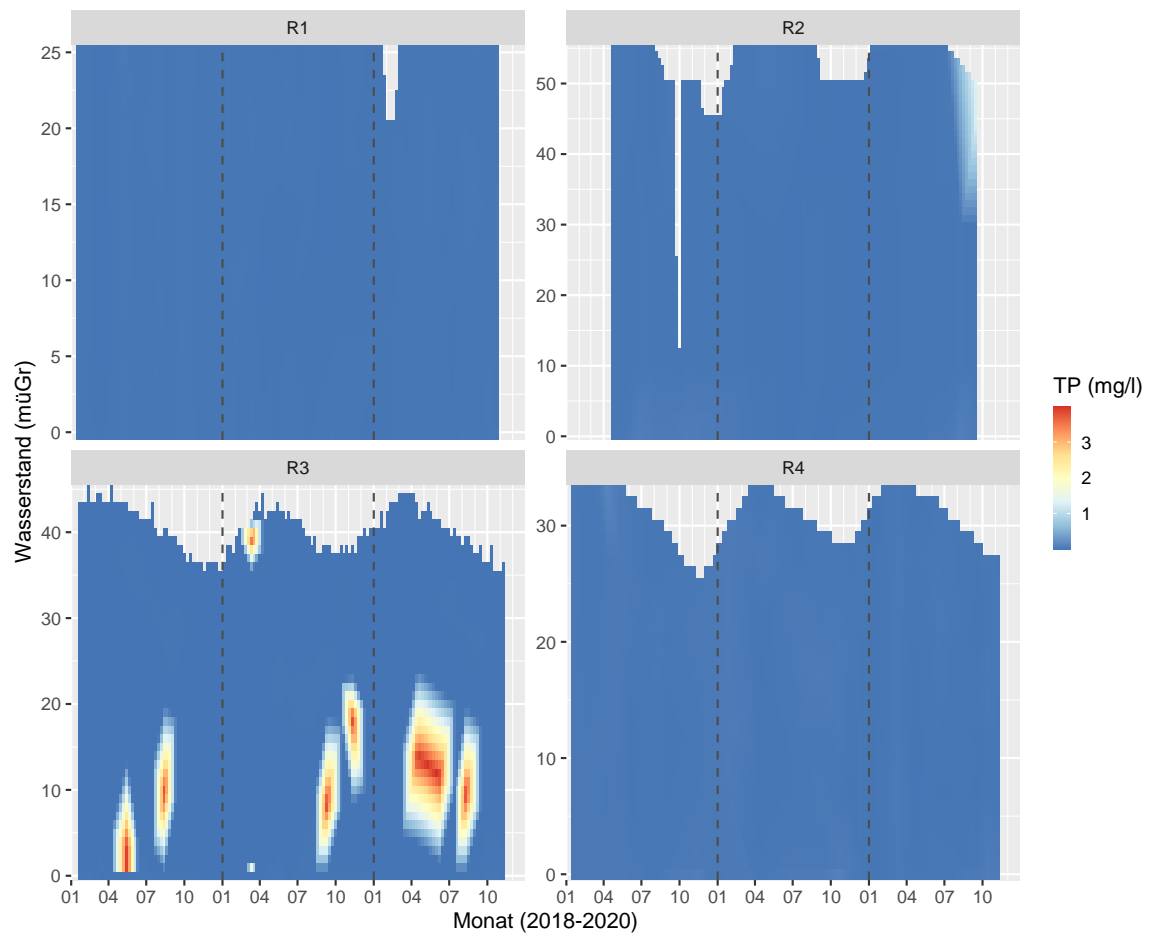
**Abbildung A 3 Tiefenschnitt des Nitratgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.** Gezeigt sind die interpolierten Daten des Nitrats (NO<sub>3</sub>, mg/l) in den verschiedenen Tiefen der Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach. Aus der Talsperre Rappbode (R5) gab es keine Daten für eine Interpolation.



**Abbildung A 4 Tiefenschnitt des TOC-Gehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.**

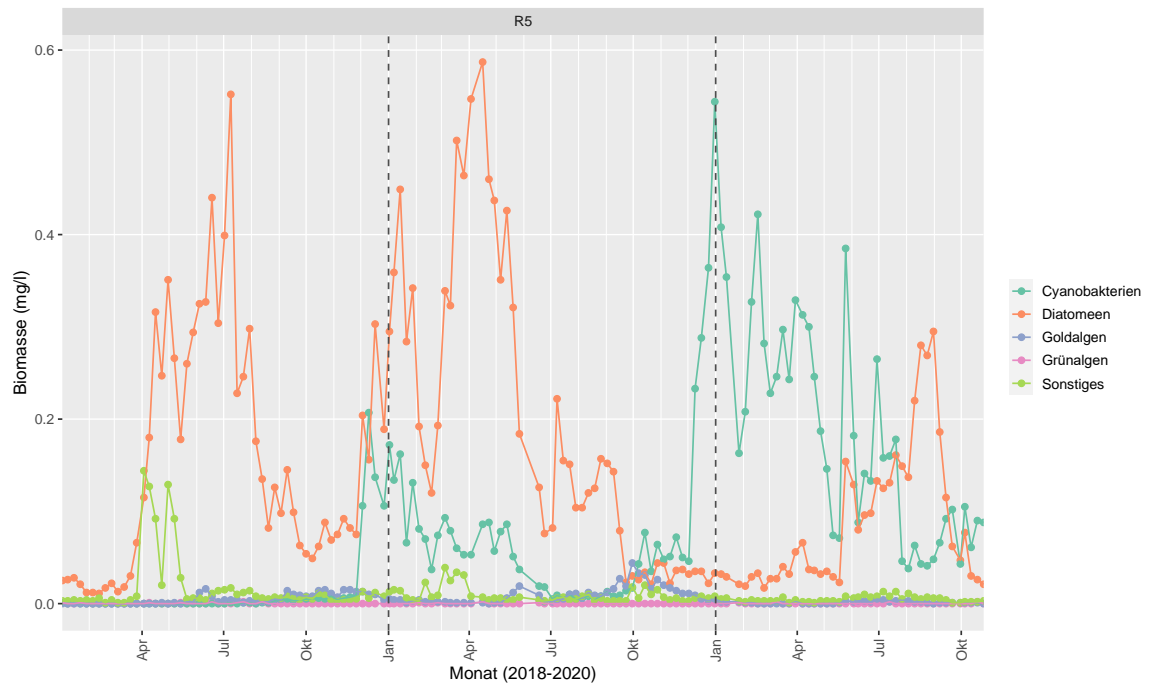
Gezeigt sind die interpolierten Daten des TOC-Gehalts (TOC, mg/l) in den verschiedenen Tiefen der Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach. Aus der Talsperre Rappbode (R5) gab es keine Daten für eine Interpolation.





**Abbildung A 5 Tiefenschnitt des Gesamtphosphatgehalts in vier der fünf untersuchten Talsperren.**

Gezeigt sind die interpolierten Daten des Gesamtphosphats (TP, mg/l) in den verschiedenen Tiefen der Talsperren über den Zeitraum von drei Jahren (2018–2020). R1 = Klingenberg, R2 = Kleine Kinzig, R3 = Wahnbach, R4 = Breitenbach. Aus der Talsperre Rappbode (R5) gab es keine Daten für eine Interpolation.



**Abbildung A 6 Phytoplankton-Daten aus dem Rohwasser der Rappbode Talsperre (R5).** Dargestellt ist die Biomasse (mg/l) des Phytoplanktons aus dem Rohwasser der Rappbode Talsperre mit Cyanobakterien, Diatomeen, Goldalgen, Grünalgen, sowie weiteren Algen von 2018–2020.