

Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)
Forschungszentrum Karlsruhe, KIT-Campus Nord

Universität Karlsruhe (TH), KIT-Campus Süd

**Entwicklung eines Monitorings für das
Wasserleitungssystem Bribin (Distrikt Gunung Kidul)
und Konzeption eines Feldlabors zur
Wasserhygienisierung am Bezirkskrankenhaus
Wonosari**

Diplomarbeit

von

and. bio. ing. Kerstin Matthies

Betreuer: Prof. Dr. Ursula Obst
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Karlsruhe, Mai 2010



Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben. Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind im Text kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis vollständig aufgeführt.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Arbeit im Institut für Funktionelle Grenzflächen eingestellt und nicht für kommerzielle Zwecke kopiert werden darf.

Karlsruhe, Mai 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben und mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Obst für die Möglichkeit bedanken meine Diplomarbeit in ihrer Abteilung und in diesem außergewöhnlichen Projekt durchführen zu können. Ich danke ihr für die wissenschaftliche Betreuung meiner Diplomarbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und die Anregungen für die schriftliche Ausarbeitung dieser Arbeit.

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens.

Bei Thomas Schwartz, Silke-Mareike Marten und Silke Kirchen möchte ich mich für die ständige Unterstützung und die vielen hilfreichen Anregungen bedanken.

Jessica Varela-Villarreal, Christina Jungfer, Petra Bischoff und der gesamten Abteilung „Mikrobiologie natürlicher und technischer Grenzflächen“ danke ich für ihre unaufhörliche Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei dem Chemischen Institut Pforzheim, insbesondere bei Herrn Hanno Mühlebach, für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung dieser Diplomarbeit.

Auch bei meinen anderen Kollegen aus dem IWRM-Projekt, insbesondere bei Peter Oberle, Muhammad Ikhwan, Stephan Fuchs und Jutta Eggers, möchte ich mich für die fachliche Unterstützung und die nette Zusammenarbeit in Deutschland und in Indonesien bedanken.

Ich bedanke mich bei Christian Böge für das Interesse an meiner Arbeit und die Hilfe bei der Abrundung der schriftlichen Ausarbeitung.

Letztlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Motivation	1
2 Hygienische Untersuchung des Wasserleitungssystems - Analysemethoden und verwendete Materialien	4
2.1 Das Wasserleitungssystem Bribin	4
2.2 Beschreibung der Probenahmestellen	6
2.3 Analyse chemischer und physikalischer Parameter	7
2.3.1 Temperatur, Sauerstoff und elektrische Leitfähigkeit	7
2.3.2 pH-Wert	8
2.3.3 Trübung	8
2.4 Mikro- und Molekularbiologische Untersuchung	10
2.4.1 Geräte und Materialien	11
2.4.2 Probenahme	13
2.4.3 Kulturverfahren	14
2.4.3.1 Quantitativer Nachweis coliformer Bakterien und E. coli mittels ColiLert-Kulturverfahren	14
2.4.3.2 Kultivierung auf Platte und DNA- Isolierung	15
2.4.4 Probenaufbereitung	16
2.4.5 Spezies- spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.4.6 Populationsanalyse	20
2.4.6.1 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese	20
2.4.6.2 Sequenzierung	22
3 Konzeptionierung der Pilotanlage	25
3.1 Hygienisierungsmaßnahmen	26
3.1.1 Chemische Verfahren	26
3.1.1.1 Chlor und Chlorverbindungen	27
3.1.1.2 Ozon	28
3.1.2 Physikalische Verfahren	28
3.1.2.1 Abkochen	28
3.1.2.2 Strahlung	29
3.1.2.3 Filtration	31
3.1.2.4 Beurteilung der Hygienisierungsmaßnahmen hinsichtlich des Einsatzes im Projektgebiet	34
3.2 Experimenteller Aufbau / Durchführung	37
3.2.1 Verwendete Medien	38
3.2.2 Anzucht der Bakterien	40

3.2.3	Zusammensetzung des Wassers für die Laborversuche	41
3.2.4	Wasseranalyse.....	42
3.2.4.1	Kulturverfahren	42
3.2.4.2	Spezies-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion	43
3.2.5	Chlorung	47
3.2.6	UV- Desinfektion	48
3.2.7	Langsamsandfiltration	48
3.2.8	Keramikfiltration	49
3.2.8.1	200 nm Membranelement.....	50
3.2.8.2	50 nm Membranelement.....	50
4	Ergebnisse und Auswertung.....	51
4.1	Hygienische Untersuchung des Wasserleitungssystems	51
4.1.1	Chemisch-physikalische Analyse	51
4.1.1.1	elektrische Leitfähigkeit, Temperatur und Sauerstoffgehalt	51
4.1.1.2	pH- Wert.....	55
4.1.1.3	Trübung	56
4.1.2	Mikro- und molekularbiologische Analyse	58
4.1.2.1	Kulturverfahren	58
4.1.2.2	Spezies-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion	62
4.1.2.3	Populationsanalyse	65
4.2	Laborversuche zur Konzeptionierung der Pilotanlage	68
4.2.1	Analyse des Leitungswassers	68
4.2.2	Chlorung	68
4.2.2.1	Versuche mit <i>Escherichia coli</i>	68
4.2.2.2	Versuche mit <i>Enterococcus faecium</i>	70
4.2.2.3	Versuche mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
4.2.2.4	Versuche mit <i>Campylobacter jejuni</i>	73
4.2.2.5	Versuche mit <i>Shigella flexneri</i>	75
4.2.2.6	Versuche mit <i>Vibrio vulnificus</i>	76
4.2.3	Keramikfiltration	78
5	Diskussion	84
6	Zusammenfassung.....	88
7	Ausblick	90
8	Literaturverzeichnis	91
9	Anhang.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Lage des Distrikts Gunung Kidul auf Java (Quelle: http://www.iwrm-indonesien.de/)	1
Abbildung 2-1: Das Wasserleitungssystem Bribin mit den einzelnen Behältern (Karte: Geodätisches Institut, KIT, verändert)	5
Abbildung 3-1: Absorptionsspektrum der DNA (Quelle: Voet <i>et al.</i> , 2002)	29
Abbildung 3-2: Design der Keramikfiltrationselemente	49
Abbildung 4-1: Temperaturen des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009	52
Abbildung 4-2: Sauerstoffgehalt des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009 ...	54
Abbildung 4-3: pH-Werte des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009	55
Abbildung 4-4: Trübung des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009	56
Abbildung 4-5: E.coli und Coliforme im Wasser des Leitungssystems Bribin, Oktober 2009	58
Abbildung 4-6: räumliche Verteilung der coliformen Keimzahlen, Oktober 2009	59
Abbildung 4-7: PCR mit Universalprimern	62
Abbildung 4-8: PCR mit <i>E.coli</i> -spezifischen Primern	63
Abbildung 4-9: PCR mit Gamma-Proteobakterien-spezifischen Primern	64
Abbildung 4-10: DGGE der PCR mit GC27f, 517r	65
Abbildung 4-11: DGGE der PCR mit 518f, 785r	66
Abbildung 4-12: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit <i>Escherichia coli</i>	69
Abbildung 4-13: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit <i>Enterococcus faecium</i>	70
Abbildung 4-14: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	72
Abbildung 4-15: Chlorzehrung der Versuche mit <i>Campylobacter jejuni</i>	73
Abbildung 4-16: PCR mit <i>Campylobacter jejuni</i> - spezifischen Primern	74
Abbildung 4-17: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit <i>Shigella flexneri</i>	75
Abbildung 4-18: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit <i>Vibrio vulnificus</i>	77
Abbildung 9-1: Schema zur geplanten Wasseraufbereitung	96
Abbildung 9-2: PCR der Proben vom Sommer 2009 mit <i>E.coli</i> - spezifischen Primern	101
Abbildung 9-3: 1. Teil der 2. DGGE, rot gekennzeichnet die geschnittenen Banden....	102
Abbildung 9-4: 2. Teil der 2. DGGE, rot gekennzeichnet die geschnittenen Banden...	103
Abbildung 9-5: räumliche Verteilung der coliformen Keimzahlen, März 2010	104
Abbildung 9-6: räumliche Verteilung der <i>E.coli</i> -Keimzahlen, März 2010	104
Abbildung 9-7: räumliche Verteilung der Enterokokken-Keimzahlen, März 2010	105
Abbildung 9-8: räumliche Verteilung der Trübungswerte, März 2010-05-06	107
Abbildung 9-9: Laboranlage für die Keramikfiltration (Quelle: Firma Atech)	108
Abbildung 9-10: Testsäulen für die Langsamsandfiltration am IWG	109
Abbildung 9-11: Sieblinie für die Filtersäulen 1 & 2	110
Abbildung 9-12: Sieblinie für die Filtersäulen 3 & 4	111
Abbildung 9-13: Sieblinie für den ursprünglichen Rheinsand	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Puffer	12
Tabelle 2-2: Verwendete Primer	17
Tabelle 3-1: verwendete Bakterienstämme mit zugehörigen Medien	40
Tabelle 3-2: für die Chlorversuche verwendete Primer.....	43
Tabelle 4-1: Zuordnung der nachgewiesenen Mikroorganismen zu den Probenahmestellen.....	67
Tabelle 4-2: Anzahl der zudosierten Bakterien.....	78
Tabelle 4-3: Wachstum der Kolonien vor und nach Filtration	79
Tabelle 4-4: Ergebnisse der Spezies-spezifischen PCR vor und nach der Keramikfiltration.....	81
Tabelle 9-1: in vorherigen Untersuchungen zusätzlich verwendete Primer	95
Tabelle 9-2: Temperaturprofil der Primer InvA139F/ InvA141R (Salmonellen).....	95
Tabelle 9-3: Temperaturprofil der Primer InlA-1-F/ InlA-2-R (<i>Listeria monocytogenes</i>). 95	
Tabelle 9-4: Temperaturprofil der Primer F2/ R2 (<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i>).....	95
Tabelle 9-5: Ergebnisse der Messkampagne Juli/August 2009, chem. Analyse.....	96
Tabelle 9-6: Ergebnisse der Messkampagne Oktober 2009, chem. Analyse	97
Tabelle 9-7: Chemische Daten der Gua Bribin von Juli 2009 bis März 2010.....	98
Tabelle 9-8: Chemische Daten der Gua Seropan von Juli 2009 bis März 2010	99
Tabelle 9-9: Chemische Daten des Leitungswassers im Krankenhaus Wonosari von Juli 2009 bis Dezember 2010.....	100
Tabelle 9-10: Ergebnisse der Messkampagne März 2010, chem Analyse	106
Tabelle 9-11: Ermittlung der Sieblinie für die Filtersäulen 1 & 2	110
Tabelle 9-12: Ermittlung der Sieblinie für die Filtersäulen 3 & 4	111
Tabelle 9-13: Ermittlung der Sieblinie für den ursprünglichen Rheinsand	112

Abkürzungsverzeichnis und Indonesische Bezeichnungen

	Bezeichnung
A	Adenin
BHI	Brain Heart Infusion
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DBP	Disinfection by-product (Desinfektions-Nebenprodukt)
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DPD	Diethyl-para-phenylenediamine
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.
IWRM	Integriertes Wasser Ressourcen Management
FAO	Food and agriculture organization of the United Nations
G	Guanin
GATE	Deutsches Zentrum für Entwicklungstechnologien
GTZ	Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH
Gua	Indonesisch für Höhle
MPN	Most probable number
NTU	Nephelometrischer Trübungswert
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDAM	Indonesische Trinkwasserbehörde
T	Thymin
TVO	Trinkwasserverordnung
UV	Ultraviolett
VBNC	Viable but not culturable (lebend aber nicht kultivierbar)
WHO	World Health Organization

1 Motivation

Laut World Health Organization (WHO) lassen sich 80 % aller Infektionskrankheiten auf unsauberes Wasser zurückführen. Darunter sind die Durchfallerkrankungen am schwerwiegendsten. Diarrhöe gilt als die siebthäufigste Todesursache der Welt, und weist mit vier Milliarden Fällen die mit Abstand höchste Erkrankungsziffer auf. (WHO, *World Health Report*, 2000)

In den Entwicklungsländern ist die Hauptursache für Durchfallerkrankungen neben schlechter Abfall- und Abwasserbeseitigung und unzureichender Allgemeinhygiene in der schlechten Trinkwasserqualität zu finden (Solsona *et al.*, 2003).

Dies macht deutlich, dass eine Versorgung mit Wasser in ausreichender Menge und guter Qualität für die Gesundheit von entscheidender Bedeutung ist. Diese Versorgung ist jedoch nicht überall gewährleistet, und vor allem trockene Regionen leiden sowohl unter Wassermangel als auch unter schlechter Wasserqualität.

Eine dieser Regionen ist der Distrikt Gunung Kidul im Süden der indonesischen Insel Java, die in der folgenden Abbildung dargestellt ist (Abbildung 1-1).



Abbildung 1-1: Lage des Distrikts Gunung Kidul auf Java (Quelle: <http://www.iwrm-indonesien.de/>)

Durch den Distrikt Gunung Kidul läuft ein etwa 1.400 km² großes Kalksteingebiet, das Gunung Sewu genannt wird (Uhlig, 1980). Aufgrund dieses Karstbodens versickert das Regenwasser sofort im Untergrund und fließt dort über das im Kalkstein bestehende

unterirdische Entwässerungssystem in den Indischen Ozean ab. So herrscht in dieser Region vor allem in der Trockenzeit von Mai bis September ein akuter Wassermangel (Nestmann *et al.*, 2009).

Die Tatsache, dass in der Region kaum Wasseraufbereitungsmaßnahmen bestehen, oder sie unzureichend sind, macht die Situation noch schwieriger. Der Karstboden hat eine sehr schlechte Filterkapazität und ist so kaum in der Lage, das Abwasser aus der mangelhaften Abwasserentsorgung zu filtern. Dadurch gelangen viele fäkale Mikroorganismen ins Grundwasser. Außerdem kommt der besonders schlechte Zustand des Wasserleitungssystems hinzu, wodurch das Wasser über Einträge an maroden Stellen oder offene Speicher-Behälter zusätzlich kontaminiert wird. Die zum größten Teil oberirdisch verlaufenden Leitungen heizen sich in der tropischen Sonne stark auf, und tragen damit ebenfalls zum Wachstum der Mikroorganismen bei. Neben der fäkalen Belastung weist das Wasser einen hohen Kontaminationsgrad durch pathogene Mikroorganismen auf. Des weiteren kommt hinzu, dass die Wasserqualität gar nicht oder nicht regelmäßig kontrolliert wird, so dass ein Durchbruch an fäkalen und pathogenen Mikroorganismen nicht rechtzeitig bemerkt werden könnte, um einer Verbreitung der Mikroorganismen entgegen wirken zu können. Um dennoch nicht zu erkranken sind die Verbraucher gezwungen, wenig nachhaltige Hygienisierungsmaßnahmen, wie Abkochen des Wassers, durchzuführen.

Im Rahmen eines Integrierten Wasser Ressourcen Management (IWRM)-Projektes sollen nachhaltige und an die Region angepasste Verfahren entwickelt werden, um die Bevölkerung mit Wasser in ausreichender Menge und Qualität zu versorgen. Dabei ist eine sorgfältige Hygienisierung des Wassers von essentieller Bedeutung. Geplant ist eine Aufbereitung des Wassers in drei Schritten. Zunächst soll eine zentrale Sandfiltration zur Vermeidung von Trübstoff-Durchbrüchen erfolgen, die sich möglichst nah an der Wasserquelle, also direkt hinter dem ersten Sammelbehälter (siehe Kapitel 2.1) befinden sollte. Indem die Sandfiltration hinter und unterhalb des ersten Behälters installiert wird, erspart der Höhenunterschied außerdem den Einsatz zusätzlicher Pumpen für die Beschickung der Filtrationsanlage. Anschließend soll eine dezentrale und verbrauchernahe Hygienisierung des Wassers erfolgen. Dies könnte realisiert werden, indem man beispielsweise in jedem Dorf eine entsprechende Aufbereitung

installiert und die Bevölkerung von dort versorgt. In einem dritten Schritt soll dann im Haushalt eine Vor-Ort-Keramikfiltration erfolgen, um durch den Transport ins Wasser gelangte Mikroorganismen zu eliminieren. Die Entwicklung dieser Filtration ist jedoch nicht mehr Teil des IWRM- Projekts.

Thema dieser Arbeit ist die Einführung eines Monitoringprogramms zur hygienischen Untersuchung des Wasserleitungssystems Bribin im Distrikt Gunung Kidul und die Konzeption eines Feldlabors zur Wasserhygienisierung, dem zweiten Schritt der geplanten Wasseraufbereitung. Dieses Feldlabor soll am Bezirkskrankenhaus der Stadt Wonosari, die sich im Distrikt Gunung Kidul befindet, installiert werden.

Mit Hilfe des Feldlabors sollen vier verschiedene Hygienisierungsverfahren auf ihre Anwendbarkeit im Projektgebiet geprüft werden. Nach Abschluss der Untersuchungen sollen die gewonnenen Daten aus der hygienischen Analyse des Leitungssystems und aus den Versuchen im Pilotmaßstab (Feldlabor) verglichen werden, um das für die Region am besten geeignete Verfahren zu finden und zu empfehlen.

2 Hygienische Untersuchung des Wasserleitungssystems - Analysemethoden und verwendete Materialien

In Deutschland ist eine regelmäßige Kontrolle der Wasserqualität vorgeschrieben und gesetzlich genau geregelt (TrinkwV, 2001). Solche Kontrollen existieren im Projektgebiet nicht. Die von der indonesischen Trinkwasserverordnung geforderte Trinkwasserqualität wird nicht überprüft. Eine solche Kontrolle ist jedoch besonders wichtig um die Bevölkerung zu schützen, und bei Auftreten bestimmter pathogener Keime vor dem Verzehr des Wassers zu warnen, sowie entsprechende Aufbereitungsmaßnahmen einzuleiten.

Aus diesem Grund war die Einführung eines regelmäßigen Monitorings der Wasserqualität essentiell. Des weiteren konnten auf diese Weise Daten für die Auswahl eines geeigneten Hygienisierungsverfahrens erfasst werden.

Der Monitoring-Plan setzte sich aus zwei Teilen zusammen. Zunächst wurde eine halbjährliche Beprobung des gesamten Wasserleitungssystems Bribin eingeführt (siehe Kapitel 2.1). Zusätzlich konnte ein monatliches Monitoring der beiden Höhlen und des PDAM-Anschlusses im Krankenhaus Wonosari (siehe Kapitel 2.2) etabliert werden.

2.1 Das Wasserleitungssystem Bribin

In der folgenden Abbildung 2-1 ist das Netzwerk der Hauptwasserleitungen des Systems Bribin dargestellt. Die Gua Bribin (nicht in der Abbildung eingezeichnet) ist eine Karsthöhle (Gua (indonesisch) = Höhle), in der im Rahmen des IWRM-Projektes Wasser angestaut, und dann mit Hilfe von Pumpen in das Leitungsnetzwerk eingespeist wird (Website des IWRM-Projektes, 2010).

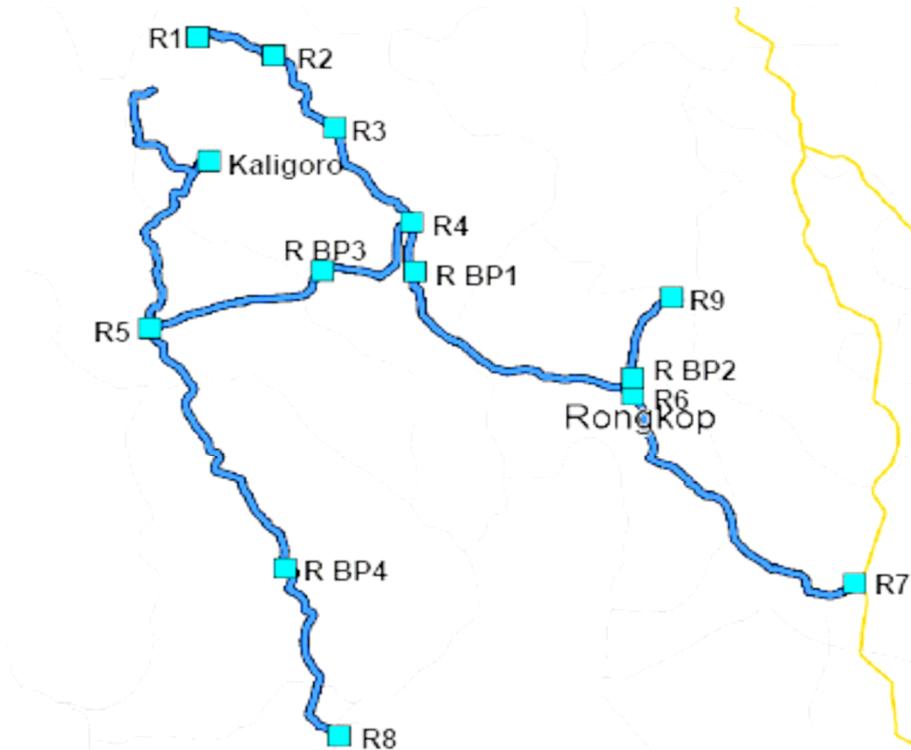


Abbildung 2-1: Das Wasserleitungssystem Bribin mit den einzelnen Behältern (Karte: Geodätisches Institut, KIT, verändert)

Mit R1 bis R9 sind die einzelnen Behälter bezeichnet, von denen das Wasser durch den Höhenunterschied oder mit Hilfe von Pumpstationen zum nächsten Behälter gelangt. Von den Behältern gehen zusätzlich noch kleinere Rohrleitungen aus, die sich weiter verzweigen und das Wasser in die einzelnen Orte leiten. Sie wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Abbildung aufgenommen. Die Pumpstationen sind mit R BP1 bis R BP4 beschriftet.

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war der Behälter R1 der erste Behälter direkt nach der Höhle. Von hier floss das Wasser über die Behälter R2 und R3 zum Behälter R4. Dann wurde das Wasser mit Hilfe der Pumpstationen R BP1 bzw. R BP3 zu den Behältern R6, bzw. R5 gepumpt. Der Behälter R7 war schon seit längerem nicht mehr in Betrieb, so dass das Wasser von Behälter R6 nur noch über die Pumpstation R BP2 zu Behälter R9 gelangte. Vom Behälter R5 floss das Wasser zur Pumpstation R BP4 und wurde von dort zum Behälter R8 hochgepumpt.

Kaligoro ist ein neuer Behälter, in den das Wasser direkt von der Höhle gepumpt werden soll. Er war jedoch zur Zeit der Probenahmen für diese Arbeit noch nicht in Betrieb.

2.2 Beschreibung der Probenahmestellen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Probenahme-Kampagne im Oktober 2009. Eine weitere Probenahme-Kampagne erfolgte im März 2010, auf sie wird jedoch nicht ausführlich eingegangen, da dies den Rahmen einer Diplomarbeit sprengen würde.

Beprobt wurden die Behälter und Pumpstationen, sowie die Gua Bribin.

In der Gua Bribin fanden im Erstellungszeitraum dieser Arbeit noch Bauarbeiten statt, so dass das Wasser beim Höhleneingang durch die hygienische Belastung und den aufgewirbelten Schlamm nicht den Normalzustand des Höhlenwassers widerspiegelte. Stattdessen wurde eine Wasserleitung beprobt, die das Wasser aus der Höhle etwas stromaufwärts der Baustelle abpumpte.

Wie bereits erwähnt, waren zur Zeit der Messkampagne die Behälter R7 und Kaligoro nicht in Betrieb, so dass hier keine Proben genommen werden konnten. Die Pumpstation R BP2 wurde nicht beprobt, da die Wasserqualität in etwa der des Behälters R6 entspricht.

Zusätzlich wurde die Gua Seropan beprobt, da dort neben anderen Projektarbeiten auch eine Filtrationsanlage gebaut werden soll. Diese Anlage entspricht dem ersten Schritt der geplanten Wasseraufbereitung. Die Beprobung erfolgte hier an einem Wehr innerhalb der Höhle.

Im Bezirkskrankenhaus Wonosari wurde die Wasserleitung der PDAM (indonesische Trinkwasserbehörde) beprobt, da das Feldlabor voraussichtlich mit dem Wasser dieser Leitung beschickt werden soll. Dieses PDAM-Wasser wird aus verschiedenen Quellen gespeist und entspricht qualitativ ungefähr dem Wasser aus der Gua Bribin nach Durchlaufen des Verteilungsnetzes.

2.3 Analyse chemischer und physikalischer Parameter

Die Analyse der chemischen und physikalischen Parameter erfolgte direkt an der Probenahmestelle, da sie sich im Laufe eines Transports verändert hätten.

2.3.1 Temperatur, Sauerstoff und elektrische Leitfähigkeit

Nach der deutschen Trinkwasserverordnung von 1990 durfte das Wasser eine Temperatur von 25 °C nicht überschreiten. Heute wird die Temperatur jedoch nicht mehr als Parameter aufgeführt (TrinkwV, 2001), da die Einhaltung des Grenzwertes in Deutschland ohnehin kein ernsthaftes Problem darstellt und die Temperatur hauptsächlich als Bezugsgröße für die Sauerstoff- und Calcitsättigung dient (Kölle, 2001). Indonesien hätte mit seinen tropischen Temperaturen ein größeres Problem, diese Wassertemperaturen einzuhalten. So ist in der indonesischen Trinkwasserverordnung lediglich festgelegt, dass sich die Wassertemperatur nur um ± 3 °C von der Umgebungstemperatur unterscheiden darf (Indonesische TrinkwV, 2002). Die hohen Wassertemperaturen in Indonesien führen zu einem vermehrten Wachstum von Mikroorganismen, die eine Gefahr für die Gesundheit der Bevölkerung darstellen.

Um verschiedene chemische, biologische und ökologische Verhältnisse zu unterscheiden, wird häufig die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff herangezogen. Sauerstoff ist nicht nur Teil unserer Umwelt, sondern dient als Reaktionspartner für viele chemische und biologische Reaktionen (Kölle, 2001). Da verschiedene Mikroorganismen sich in ihrem Sauerstoffbedarf und auch in ihrer Toleranz gegenüber Sauerstoff unterscheiden (Madigan *et al.*, 2001), kann die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff Hinweise auf das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen liefern.

Für den Sauerstoffgehalt des Wassers werden weder in der deutschen, noch in der indonesischen Trinkwasserverordnung Grenzwerte aufgeführt.

Die elektrische Leitfähigkeit gilt als Maß für die Gesamtkonzentration der im Wasser dissoziierten Ionen, und ist somit ein Maß für die mineralischen Inhaltsstoffe des Wassers (Kölle, 2001). Dabei sollten die Werte für Trinkwasser 2.500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ nicht

überschreiten und „Das Wasser sollte nicht korrosiv wirken“ (TrinkwV, 2001). Die indonesische Trinkwasserverordnung führt die elektrische Leitfähigkeit nicht als Parameter auf.

Temperatur, Sauerstoffgehalt und elektrische Leitfähigkeit wurden mit einem Multimeter (HQ 40d, mit Sauerstoffsensor) der Firma Hach bestimmt. Der Sauerstoffsensor (LDO, Outdoor, Hach) und der Leitfähigkeitssensor (Outdoor, Hach) wurden direkt in die zu beprobende Wasserquelle gehalten, bis ein konstanter Wert angezeigt wurde. Bei der Beprobung von Wasserleitungen wurde das Wasser in einen Behälter mit relativ großem Volumen (60 l) gefüllt und dann vermessen.

2.3.2 pH-Wert

Als Maß für die Wasserstoffionen-Aktivität spiegelt der pH-Wert in natürlichen Gewässern hauptsächlich die enthaltenen Inhaltsstoffe und ihre Pufferwirkung wider (Kölle, 2001). Trinkwasser sollte dabei einen pH-Wert zwischen 6,5 und 9,5 haben (TrinkwV, 2001). Die indonesische Trinkwasserverordnung schreibt einen pH-Wert zwischen 6,5 und 8,5 vor (indon. TrinkwV, 2002).

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mit Hilfe eines Standard-pH-Sensors der Firma Hach. Hierfür wurde der mitgelieferte Becher zunächst zweimal mit dem zu messenden Wasser gespült und anschließend gefüllt. Der pH-Sensor wurde so lange in das Wasser gehalten, bis die Anzeige des pH-Wertes stabil war. Zur Überprüfung und Kalibrierung wurden die mitgelieferten Pufferlösungen verwendet.

2.3.3 Trübung

Die Trübung des Wassers wird vor allem durch ungelöste Inhaltsstoffe verursacht, die zu einer Streuung des Lichts führen. Diese ungelösten Stoffe können organischer (z.B. Bakterien) oder anorganische Herkunft (z.B. Tonpartikel) sein. (Kölle, 2001)

In Deutschland sind Trübungswerte von 1 NTU am Ausgang des Wasserwerks zugelassen (TrinkwV, 2001), während in Indonesien 5 NTU als Grenzwert gelten (indon. TrinkwV, 2002).

Karst-Aquifer sind wegen der zerklüfteten Karstgesteine mit großen Karströhren und -Spalten besonders empfindlich gegenüber Trübstoffeinträgen. Vor allem bei Starkregen-Ereignissen kommt es zu hohen Sedimenteinträgen und Trübstoffeinbrüchen, die besonders riskant sein können, wenn durch anthropogene Einwirkung auch mikrobiell belastete oder chemische Verunreinigungen eingespült werden. (Hötzl, 2009)

In dieser Arbeit war die Trübung außerdem ein wichtiger Parameter, da sich eine hohe Trübung fast immer negativ auf die Desinfektionsleistung der Hygienisierungsmaßnahmen auswirkt (siehe Kapitel 3.1).

Die Bestimmung der Trübung erfolgte mit Hilfe eines Trübungsmessgerätes (Nephla) von Dr. Lange. Eine der mitgelieferten Küvetten wurde zunächst zweimal mit dem zu messenden Wasser gespült und anschließend gefüllt und vermessen. Der Wert konnte nach etwa 10 Sekunden abgelesen werden.

2.4 Mikro- und Molekularbiologische Untersuchung

Zusätzlich zu der Erfassung der chemischen und physikalischen Parameter erfolgten mikro- und molekularbiologische Untersuchungen. In der deutschen Trinkwasserverordnung sind regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen mittels Kulturverfahren vorgeschrieben. Dabei wird die Gesamtkeimzahl bei 22 und 36 °C und die Keimzahl der coliformen Bakterien, *Escherichia coli*, Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, sowie *Clostridium perfringens* (inklusive Sporen) bestimmt (TrinkwV, 2001). In der indonesischen Trinkwasserverordnung gibt es entsprechende Bestimmungen, die im Projektgebiet jedoch bislang nicht umgesetzt werden. Das einzuführende Monitoring musste an die herrschenden Begebenheiten, wie die Ausstattung des indonesischen Labors und die mangelnde Hygiene im Labor, angepasst werden.

So wurden vor Ort lediglich die coliformen Keimzahlen und *E.coli*-Keimzahlen mit Hilfe eines ColiLert-Systems (siehe Kapitel 2.4.3.1) bestimmt. Dieses Verfahren ist relativ unkompliziert und zuverlässig, sowie weniger anfällig gegenüber Fremdkontaminationen aus dem Labor, wie die traditionellen Kulturverfahren. Zusätzlich wurden stichprobenartig Flüssigproben einiger Probenahmestellen nach Deutschland transportiert und mit klassischen Kulturverfahren untersucht. Des Weiteren wurde eine DNA-basierte Populationsanalyse durchgeführt, um die Zusammensetzung der Bakterienpopulation in dem zu untersuchenden und zu behandelnden Wasser zu bestimmen.

Sowohl die deutsche als auch die indonesische Trinkwasserverordnung fordern für coliforme Bakterien und *E.coli* 0 KBE/100 ml (KBE = Kolonie-bildende Einheiten). Des Weiteren fordert die deutsche Trinkwasserverordnung für Wasser „für den menschlichen Gebrauch, das zur Abfüllung in Flaschen oder sonstige Behältnisse zum Zwecke der Abgabe bestimmt ist“ für *E.coli*, coliforme Bakterien, Enterokokken und *Pseudomonas aeruginosa* einen Wert von 0 KBE/250 ml. Die Gesamtkeimzahl bei 22 °C darf 100 KBE/ml betragen, bei 36 °C darf sie 20 KBE/ml nicht überschreiten. In der indonesischen Trinkwasserverordnung werden keine Grenzwerte für die Gesamtkeimzahl aufgeführt. (TrinkwV, 2001 & indon. TrinkwV, 2002)

Mit Ausnahme der ColiLert-Untersuchungen (siehe Kapitel 2.4.3.1) zur Quantifizierung der coliformen Bakterien, die im Labor der Universitas Islam Indonesia (UII) in Yogyakarta durchgeführt wurden, fanden die mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen im Labor des Instituts für Funktionelle Grenzflächen (IFG) in Karlsruhe statt.

2.4.1 Geräte und Materialien

Im Folgenden werden die Geräte und Materialien aufgeführt, die häufig verwendet wurden. Die Geräte und Materialien, die speziell für eine Methode benötigt wurden, werden im jeweiligen Kapitel aufgeführt.

Geräte

Sterilbank (Holten Lamin Air)

Vortex Mixer Stuart (Bibby Sterlin)

Zentrifuge 5403 (Eppendorf)

Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus)

Autoklav Dampfsterilisator (Varioklav)

Lumi-Imager T1TM (Roche Diagnostics Mannheim)

Thermo mixer compact (Eppendorf)

Magnetrührer MR 3001 (Heidolph)

PH-Meter 776 Calimatic (Knick)

Analysen-Waage Laboratory LC 220 S (Satorius)

Waage BL 3100 (Satorius)

Kühlbrutschrank KB 400 bei 37°C (Binder)

Kühlbrutschrank Modell ICP 600 bei 20 °C (Mettler)

Präzisionsbrutschrank Modell BP 600 bei 30 °C (Mettler)

Misch- und Schüttelgerät UNIMAX 2010 (Heidolph)

Inkubator CERTOMAT[®]H bei 30 °C und 37 °C (B.Braun Biotech International)

Materialien

Sterile PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml, DNA- frei (Eppendorf)

Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)

Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

Skalpell (VWR)

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml) (Eppendorf)

Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml) (Eppendorf)

Duran-Flaschen 1 l (Schott)

Nitril-Handschuhe (Ansell health care)

Latex-Handschuhe, Peha-soft, powderfree (Hartmann)

Ethanol, 99 % (Roth)

Isopropanol (Merck)

LiChroSolv PCR-Wasser (Merck)

3 M NaAc (Merck)

Tabelle 2-1: Verwendete Puffer

Puffer	Herstellung
TAE, 50x, pH 8	242 g <i>Tris-Base (Sigma)</i> wurden mit 67 ml <i>Eisessig (Sigma)</i> und 100 ml 0,5 M <i>EDTA (Riedl-deHaen)</i> gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt sowie auf pH 8 eingestellt
TAE, 1x, pH 8	Verdünnung von TAE, 50x, pH 8
TAE, 50x, pH 8,5	242 g <i>Tris-Base (Sigma)</i> wurden mit 67 ml <i>Eisessig (Sigma)</i> und 100 ml 0,5M, pH 8 <i>EDTA (Riedl-deHaen)</i> gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, sowie auf pH 8,5 eingestellt
Beschickungspuffer	2 ml 0,5 M, pH 8 <i>EDTA (Riedl-deHaen)</i> wurden mit 0,4 g (20 %) <i>Ficoll (Sigma)</i> , 5 mg (0,25 %) <i>Bromphenolblau (Sigma)</i> und 5 mg (0,25 %) <i>Xylen-Cyanol (Sigma)</i> gemischt
PCR-Puffer	<i>PCR-Puffer, 10x, enthält 15 M MgCl₂ (QIAGEN)</i>

2.4.2 Probenahme

Probenahmegefäß 1 l, mit Schnur 15 m (Eigenbau)

Sterile Muttermilchbeutel, 200 ml (Lansinoh)

Spritze Omnifix® 50 ml (B. Braun, Melsungen)

Sterile Cellulose Filter 0,2 µm (VWR)

Die Probenahme musste verschiedenen Gegebenheiten (tropisches Klima, beschränkte Möglichkeiten vor Ort, lange Transportwege) angepasst werden. Eine Kühlbox musste verwendet werden, da das herrschende tropische Klima zu einer raschen Erwärmung der Proben geführt hätte. Die Infrastruktur im Untersuchungsgebiet ist sehr schlecht ausgebaut, so dass die Fahrtzeit zwischen den einzelnen Probenahmestellen sehr lang war und auch der anschließende Transport zum Labor sehr viel Zeit in Anspruch nahm. Die Proben waren somit einige Stunden ungekühlt und konnten durch die Verwendung der Kühlbox nur bedingt vor einer weiteren Erwärmung geschützt werden.

Wasserproben wurden mit einem 1 l Plastikgefäß mit Nylonschnur aus den jeweiligen Probenahmestellen entnommen, da die Probenahmestellen teilweise schlecht zugänglich waren und die Wasseroberfläche einige Meter von der Behälteröffnung entfernt war.

Je etwa 200 ml Wasser wurden für die spätere ColiLert-Analyse (siehe Kapitel 2.4.3.1) in einen sterilen Muttermilchbeutel gefüllt und bis zur Analyse in einer Kühlbox gelagert, um sie vor direkter Sonneneinstrahlung und Erhitzung zu schützen. Die Muttermilchbeutel wurden anstelle von Flaschen benutzt um einen platzsparenden Transport (u.a. für die leeren Gefäße per Flugzeug) zu ermöglichen. Zusätzlich wurden stichprobenartig einige 2 ml Flüssigproben genommen und in Reaktionsgefäße gefüllt, um sie auf Agarplatten auszustreichen und zu kultivieren. Des Weiteren wurden je 100 ml Wasser mit Hilfe einer Spritze durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße gedrückt. Die Filter und Flüssigproben wurden während der Probenahme ebenfalls mehrere Stunden in der Kühlbox und anschließend, bis zum Rückflug nach Deutschland, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.4.3 Kulturverfahren

2.4.3.1 Quantitativer Nachweis coliformer Bakterien und *E. coli* mittels ColiLert-Kulturverfahren

ColiLert-System; QuantiTray18 (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA)

Inkubator (Memmert)

UV-Handlampe, 366 nm (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA)

Mit Hilfe des ColiLert-Systems wurde eine quantitative Bestimmung von *E. coli* und Gesamtcoliformen durchgeführt. Der Nachweis von coliformen Bakterien beruht dabei auf der Spaltung eines synthetischen Substrats (4-Nitrophenol- β -D-galactopyranosid) durch das Coliformen-spezifischen Enzym β -Galactosidase (Edberg, 1988). Durch die β -Galactosidase wird von dem Substrat 4-Nitrophenol abgespalten, welches zu einer Gelbfärbung führt (Wiegand-Rosinus, 1999). Bei Vorhandensein von *E. coli* führt das *E. coli*-spezifische Enzym β -Glucuronidase zusätzlich zur Spaltung eines synthetischen Substrats (Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid). Bei dieser Spaltung wird das fluoreszierende Methylumbelliferon frei, welches mittels einer UV-Lampe detektiert wird (Wiegand-Rosinus, 1999). Die Quantifizierung erfolgt nach dem Most-Probable-Number-Verfahren (MPN).

Mit Ausnahme der Wasserprobe aus dem Krankenhaus Wonosari wurden die Proben meist im Verhältnis 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt. Anschließend wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Nach der Inkubationszeit von 18 h, wurde visuell die Anzahl der gelben und fluoreszierenden Färbungen bestimmt. Danach konnte mit Hilfe der beiliegenden MPN-Tabelle die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten von *E. coli* und Coliformen ermittelt werden.

2.4.3.2 Kultivierung auf Platte und DNA- Isolierung

Brain Heart Infusion (Merck)

Chromocult Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Coli ID Medium (BioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich)

D-Coccosel Agar (BioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich)

R2A Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

DNA-Isolations-Kit (QIAGEN)

NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific)

Stichprobenartig wurden von einigen Wasserquellen Flüssigproben genommen, und in 2 ml Reaktionsgefäßen nach Deutschland transportiert. Je 40 µl wurden auf Chromocult-, R2A-, ColiID- und Coccosel-Agar ausgestrichen, und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das R2A-Medium ist für heterotrophe Bakterien aus Wasserproben geeignet, Coccosel-Agar für Enterokokken und sowohl Chromocult, als auch ColiID dienen dem Nachweis von coliformen Bakterien und *E.coli*. Hauptsächlich sollten die Proben auf Vorhandensein von *E.coli* geprüft werden.

Nach Angaben des Herstellers des Chromocult-Agars sollte es sich bei Kolonien, die pink bis violett gefärbt waren, um *E.coli* handeln. Um herauszufinden, ob es sich bei diesen Kolonien tatsächlich um *E.coli* handelte, wurden mit einer sterilen Impföse zwei violett gefärbte Einzelkolonien von einer Chromocult-Agarplatte entnommen. Sie wurden in zwei 15 ml Reaktionsgefäße mit je 5 ml BHI-Medium (1:4) überführt, und für 24 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe eines DNA-Isolations-Kits entsprechend den Angaben des Herstellers (Protocol D for bacteria, S.53 und 35f).

Im Anschluss wurde die DNA-Menge mit Hilfe des NanoDrop-Systems quantifiziert.

2.4.4 Probenaufbereitung

Die Filter wurden mit Hilfe einer Kneifzange geöffnet, das Filterpapier wurde jeweils mit einem abgeflammtten Skalpell entnommen, und in ein Reaktionsgefäß von 1,5 ml Volumen gegeben. Anschließend wurden je 250 µl bzw. 500 µl PCR-Wasser zugegeben. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 800 rpm und Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mindestens 24 Stunden bei 4 °C gelagert wurden. Während dieser Zeit sollten die Bakterien bzw. Bakterienteile vom Filter im Wasser gelöst werden. Bei dem folgenden Gefrier-Tau-Verfahren wurden die Proben fünf mal zunächst für eine Stunde bei –80 °C eingefroren und anschließend für 15 min bei 30 °C und 450 rpm in einem Schüttler aufgetaut. Nach einem letzten Gefrierschritt bei –20 °C wurden die Filterpapiere entnommen und die Proben bis zur weiteren Analyse bei –20 °C gelagert. Das Gefrier-Tau-Verfahren diente der Zerstörung der Zellen und Freisetzung der DNA.

2.4.5 Spezies- spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Thermocycler GeneAmp®PCR-System 9700 (Applied Biosystem)

Sterile PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml, DNA-frei (Eppendorf)

10x PCR-Puffer, einschließlich 15 mM MgCl₂ (QIAGEN)

dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); je 100 mM Endkonzentration (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland)

HotStar™ Polymerase, 5 units/µl (Peqlab)

Elektrophoresekammer (Renner)

Elektrophoresenetzgerät (Biorad)

QA-Agarose™ Multipurose (Qbiogen)

Ethidiumbromid Stammlösung (Sigma)

Längenstandard 100 bp Ladder (Roche)

Tabelle 2-2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Größe [bp]	Zielgruppe	Referenz
27f 517r	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	526	Bacteria	Kilb <i>et al.</i> , 1998
ECOuidAF ECOuidAR	GTGTGATATCTACCCGCTTCGC AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA	87	E.coli	Frahm & Obst, 2003
Gamma395f Gamma871r	CMATGCCGCGTGTGTGAA ACTCCCCAGGCGGTCDACTTA	476	Gamma- Proteobacteria	Mühling <i>et al.</i> , 2008
518f 785r	CCAGCAGCCGCGGTAAT CTACCAGGGTATCTAATCC	267	Gamma- Proteobacteria	Mühling <i>et al.</i> , 2008
1F 1R	CACTTGTTGGGTATGCTGG CCGGCAAACAGATTAGAAA	1200	Shigella flexneri	Li <i>et al.</i> , 2006

M=A/C D=G/A/T N=G/A/C/T

In Tabelle 2-2 wurden die in diesem Kapitel verwendeten Primer mit Sequenz und Literaturreferenzen aufgeführt.

Die Amplifikation bestimmter Zielsequenzen erfolgte im Thermocycler durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Sie setzt sich im Wesentlichen aus drei Schritten zusammen, die 30 – 40 mal wiederholt werden.

Nach einem Denaturierungsschritt, bei dem die Doppelstrang-DNA durch hohe Temperaturen aufgetrennt wird, folgt ein Hybridisierungsschritt. In diesem Schritt lagern sich die Primer an spezifische, zu ihnen komplementäre, DNA-Abschnitte an. Dieser Vorgang wird auch als Annealing bezeichnet. Im letzten Schritt, dem Elongationsschritt, kommt es mit Hilfe der zugegebenen DNA-Polymerase und Nukleotidbausteinen zur Synthese der neuen Gegenstränge der DNA.

Für alle parallel bearbeiteten Proben wurde ein Mastermix angesetzt und anschließend auf die Reaktionsgefäße verteilt, bevor die Templates zugegeben wurden.

Der Ansatz für eine Probe setzte sich folgendermaßen zusammen:

25 µl PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	0,5 µl
Vorwärtsprimer	0,25 µl
Rückwärtsprimer	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,13 µl
DNA-Template	5 µl
PCR-Wasser	16,38 µl

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben wurden entsprechende Positivkontrollen (1 µl + 4 µl PCR-Wasser) und eine Negativkontrolle (5 µl PCR-Wasser) mitgeführt, um eventuelle Fehler bei der Durchführung oder fehlerhafte Reagenzien auszuschließen.

Die Temperaturprofile für die einzelnen Primerpaare und die entsprechenden Positivkontrollen sind im Folgenden aufgeführt:

Primer 27f/517r

Positivkontrolle: Salmollen oder *E.coli*

Temperaturprofil:

	94 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	95 °C	30 s	Denaturierung
35 Zyklen	55 °C	30 s	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Sollte im Anschluss eine DGGE erfolgen wurde der Primer 27f mit einer GC-Klammer verwendet.

Primer ECOuidAF/ECOuidAR

Positivkontrolle: *E. coli*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
30 Zyklen	54 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Die PCR für die Gamma-Proteobakterien wurde als Nested PCR durchgeführt. Zunächst erfolgte eine PCR mit dem Primerpaar Gamma395f/Gamma871r und anschließend mit dem PCR-Produkt eine PCR mit dem Primerpaar 518f-GC/785r. Dabei wurden 2 µl des PCR-Produktes der ersten PCR mit 3 µl PCR-Wasser als Template eingesetzt.

Primer Gamma395f/Gamma871r

Positivkontrolle: *E. coli*

Temperaturprofil:

	96 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	96 °C	1 min	Denaturierung
30 Zyklen	54 °C	1 min	Annealing
	74 °C	1 min	Elongation
	74 °C	10 min	Abschließende Extension

Primer 518f-GC/785r

Positivkontrolle: *E. coli*

Temperaturprofil:

	96 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	96 °C	1 min	Denaturierung
30 Zyklen	56 °C	1 min	Annealing
	74 °C	1 min	Elongation
	74 °C	10 min	Abschließende Extension

Nach Abschluss der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Agarosegele besaßen einen Anteil von etwa 1 % Agarose. Sie wurde durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst, bevor 1 % Ethidiumbromid zugegeben wurde. Da das Ethidiumbromid in die DNA-Doppelstränge interkaliert, wird die DNA unter UV-Licht sichtbar. Von den PCR-Produkten wurden 5 µl mit 1 µl Beschwerungspuffer gemischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug zwischen 80 und 100 V. Die DNA-Banden wurden anschließend im UV-Licht (600 nm) ausgewertet.

2.4.6 Populationsanalyse

2.4.6.1 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese

Elektrophoresekammer: Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRAD)

Elektrophoresenetzgerät (BioRAD)

UV-Tisch (Fröbel Labortechnik)

SybrGold (Invitrogen)

Bei der Denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) handelt es sich um eine hochauflösende Form der Elektrophorese, bei der ein Polyacrylamid-Gel mit einem chemischen Denaturierungsmittel versetzt wird. Das chemische Denaturierungsmittel, das zum Schmelzen der DNA-Fragmente führt, liegt als Gradient parallel zur Elektrophoreserichtung vor. Da die DNA-Fragmente mit gleicher Länge und unterschiedlichen Sequenzen ein unterschiedliches Schmelzverhalten aufweisen, werden sie bei der DGGE aufgetrennt.

Zunächst wurde eine PCR mit GC-Primern durchgeführt. Neben den Universalprimern wurden auch Gamma-Proteobakterien-spezifische Primer eingesetzt. Je ein Primer der Primerpaare besaß dabei eine Modifizierung, die nicht komplementär zur Zielsequenz war. Bei der PCR entsteht dadurch eine sogenannte GC-Klammer. Das ist ein Abschnitt der etwa 40 Basenpaare umfasst, und fast nur aus den Basen Guanin und Cytosin besteht. Da sie im Gegensatz zu den anderen Basen durch drei anstelle von zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, verhindert die GC-Klammer so eine komplette Denaturierung der PCR-Produkte bei der DGGE. Die Auftrennung von PCR-Produkten gleicher Länge erfolgt bei der DGGE durch die unterschiedliche Sequenz

dieser Produkte und dem mit ihr einhergehenden unterschiedlichen Denaturierungsverhalten. Würden die Produkte komplett denaturieren, wären sie gleich lang und könnten nicht aufgetrennt werden.

Da eine Populationsanalyse jeder einzelnen Probe sehr viel Zeit in Anspruch genommen hätte, wurden vier Proben ausgewählt, in denen aufgrund der Ergebnisse der ColiLert-Analyse besonders viele Bakterien vermutet wurden.

8 µl der PCR-Produkte dieser ausgewählten Proben wurden mit 3 µl LoadingDye versetzt und auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der denaturierende Gradient des Gels wurde durch Zugabe von 40 bis 70 % Harnstoff erreicht.

Die DGGE lief etwa 16 Stunden (über Nacht) bei 70 V und 56 °C. Im Anschluss wurde das Gel 20 min in einer SYBR Gold-Lösung (30 µl SybrGold in 300 ml 1xTAE-Puffer) geschwenkt. Dadurch wurden die Banden angefärbt, bevor sie anschließend im UV-Licht (520 nm) ausgewertet wurden.

Die ausgewählten Banden wurden an einem UV-Tisch mit dem Skalpell sauber ausgeschnitten und mit 50 µl PCR-Wasser in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 4 °C über Nacht eluiert. Die reamplifizierten Proben (siehe Kapitel 2.4.5) wurden nochmals auf eine DGGE aufgetragen, um möglichst reine Einzelbanden zu erhalten. Anschließend erfolgte eine Reamplifikation mit den entsprechenden Primern ohne GC-Klammer. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung eingesetzt.

2.4.6.2 Sequenzierung

ExoSAP-IT[®] for PCR Product Clean-Up (USB[®] Products, Affymetrix Inc.)

Sequenzier-Kit: BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Hi-Di-Formamid (Applied Biosystems)

Polymer POP4 (Applied Biosystems)

Buffer 10x mit EDTA (Applied Biosystems)

LiChroSolvWasser (VWR)

ABI PRISM Genetic Analyser 310 (Applied Biosystems)

Glaskapillare, 47 cm x 50 cm (Applied Biosystems)

Software Sequencing Analysis (Applied Biosystems)

In dieser Arbeit wurde eine Sequenziermethode verwendet, die auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) beruht. Der zu sequenzierende Abschnitt wird bei diesem Verfahren in einem PCR-ähnlichen Ansatz vervielfältigt. Dieser Ansatz enthält neben einer Pufferlösung, einem geeigneten Primer, einer Polymerase und den vier dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) zusätzlich ddNTPs (Di-Desoxyribonukleosidtriphosphate), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Werden sie bei der Extension eingebaut, kommt es zu einer Kettenabbruch-Reaktion, da sie keine OH-Gruppe am C₃-Atom besitzen, und somit keine Phosphodiesterbindung ausbilden können. Die ddNTPs werden zufällig eingebaut, so dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen, die ein durch den Primer definiertes 5'-Ende besitzen.

Anschließend werden die unterschiedlich großen Produkte unter denaturierenden Bedingungen (Harnstoff-Gradient) in einer Kapillarelektrophorese getrennt. Die Glaskapillare wird durch Anlegen einer Spannung über wenige Sekunden mit den Produkten beladen, wobei die DNA entlang des Spannungsfeldes durch die Kapillare wandert. Die Trennung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente erfolgt über Wechselwirkungen mit dem Polymer und der Wand der Kapillare. Da die ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, können sie mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Die Abfolge dieser spezifischen Farbsignale wird in die entsprechende Basensequenz der untersuchten DNA-Probe umgewandelt.

Vor der eigentlichen Sequenzierreaktion erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte. Dazu wurden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl ExoSAP-IT® gemischt und im Thermocycler zwei Inkubationsschritten unterzogen. Zunächst erfolgte die Enzymreaktion für 15 min bei 37 °C und anschließend die Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 80 °C. Dieses aufgereinigte Produkt wurde mit 28 µl PCR-Wasser verdünnt (1:5) und in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung (10 µl):

BigDye Sequencing Mix1.1	2	µl
Primer 40 pM (517r)	0,125	µl
PCR-Wasser	6,875	µl
DNA-Template	1	µl

Temperaturprofil:

	96 °C	5 min	
	96 °C	10 s	Denaturierung
25 Zyklen	60 °C	5 s	Annealing
	60 °C	1 min	Elongation

Nach der Sequenzierreaktion wurde eine DNA-Fällung zum Entfernen überschüssiger ddNTPs durchgeführt.

Der Ansatz (72 µl) enthielt:

3M NaAc	2	µl
EtOH (99 %)	50	µl
H ₂ O	10	µl
Sequenzierprobe	10	µl

Nachdem der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde, folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15-20 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet mit 250 µl EtOH (70 %) gewaschen, bevor die Probe erneut für

10 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und das Sediment für 30 min bei Raumtemperatur bei geöffnetem Deckel getrocknet, um dann in 10 µl PCR-Wasser gelöst zu werden. Von dieser aufgereinigten DNA wurden 6 µl mit 9 µl HiDi-Formamid gemischt und für die Kapillarelektrophorese eingesetzt.

3 Konzeptionierung der Pilotanlage

Aufgrund der schlechten Qualität des Wassers nach Durchlaufen des Bribin-Leitungsnetzes ist eine Aufbereitung bzw. Nachbereitung des Wassers unbedingt notwendig. Diese Aufbereitung ist in drei Schritten geplant. Der erste Schritt wird dem Transportsystem vorangestellt und soll aus einer zentralen Sandfiltration bestehen. Mithilfe dieser Filtration sollen Trübstoffe und ihnen anhaftende Bakterien entfernt werden, um vor allem in der Regenzeit Durchbrüche größerer Trübstoffmengen zu vermeiden.

Im Anschluss an das Leitungsnetz soll eine dezentrale Hygienisierung stattfinden, um Bakterien und andere Mikroorganismen abzutöten.

Ein dritter Schritt, der aber weder Teil dieser Arbeit, noch Teil des IWRM-Projektes ist, soll eine Vor-Ort-Keramikfiltration im Haushalt umfassen.

Dieses Kapitel befasst sich mit dem zweiten Schritt der Wasseraufbereitung, der dezentralen Hygienisierung. Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit ist die Konzeptionierung einer Pilotanlage für die Erprobung verschiedener Desinfektionsmethoden. Um die Durchführbarkeit und Effektivität der Verfahren auch unter den tropischen Bedingungen Indonesiens überprüfen zu können, soll eine Pilotanlage in einem Überseecontainer konstruiert werden. Der Container soll zunächst an einer Quelle im Schwarzwald, die in ihrer mikrobiellen Belastung den untersuchten Wässern in Indonesien entspricht, getestet werden. Im Anschluss soll sie nach Indonesien verschifft, und dort am Krankenhaus in Wonosari installiert werden. Beschickt werden soll die Anlage mit PDAM-Wasser (siehe Kapitel 2.2), sowie verschiedenen Bakterienzusätzen. Das PDAM-Wasser ist aus unterschiedlichen Quellen gespeist und entspricht in seiner Qualität etwa dem Wasser aus der Gua Bribin nach Durchlaufen des Netzwerkes.

3.1 Hygienisierungsmaßnahmen

Eine Desinfektion von Wasser kann durch verschiedene Verfahren erfolgen (Parodi, 2003):

- Chemische Verfahren: Oxidationsmittel und Silberung
- Physikalische Verfahren: Strahlung, Hitzeeinwirkung und Filtration

Die deutsche Trinkwasserverordnung lässt nur bestimmte Desinfektionsverfahren zu. Neben der UV-Bestrahlung und der Dosierung von Chlorgas-, Natrium- und Calciumhypochloritlösungen sind die elektrolytische Herstellung und Dosierung von Chlor vor Ort, die Dosierung einer vor Ort hergestellten Chlordioxidlösung und die Erzeugung und Dosierung von Ozon und Ozonlösungen vor Ort erlaubt (DVGW, W 290, 2005 & TrinkwV, 2001).

Der Erfolg eines Desinfektionsprozesses hängt neben der angewandten Methode von verschiedenen Faktoren ab (Heber, GATE, 1989):

- Mikroorganismenart und -konzentration im zu behandelnden Wasser
- Eigenschaften und Qualität des zu behandelnden Wassers (z.B. Trübstoffe)
- Einwirkzeit, bzw. Kontaktzeit des Desinfektionsmittels mit den Mikroorganismen
- Wassertemperatur, da hohe Temperaturen zu schnelleren chemischen Reaktionen führen

Über die Anzahl der Mikroorganismen, genauer über die Anzahl der logarithmischen Reduktionsstufen pro Zeiteinheit, lässt sich der Erfolg eines Desinfektionsverfahrens messen.

3.1.1 Chemische Verfahren

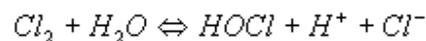
In der deutschen Trinkwasserverordnung ist genau festgelegt, welche Desinfektionsmittel in Deutschland erlaubt sind. Hierbei handelt es sich um Chlor, Natrium- und Calciumhypochlorit, Chlordioxid und Ozon (DVGW, W 290, 2005). Obwohl die indonesischen Gesetze denen in Deutschland gleichen, ist die Einhaltung dieser Normen in Indonesien kaum möglich, da die dortigen Verhältnisse nicht mit unseren

hohen Standards bezüglich Trinkwasserqualitäten und Leitungssystemen oder den klimatischen und finanziellen Verhältnissen zu vergleichen sind. Dennoch geben diese Vorschriften einen guten Überblick.

3.1.1.1 Chlor und Chlorverbindungen

Die Einführung von Chlor zur Desinfektion von Wasser im 20. Jahrhundert führte in den Entwicklungsländern zu einer Erhöhung der Lebenserwartung um 50 %. Gründe hierfür sind die weite Verbreitung von Chlor, die moderaten Kosten, der ‚Resteffekt‘, die hohe Oxidationskapazität und die damit einhergehende Zerstörung organischer Substanzen sowie die effektive Abtötung von Mikroorganismen. Chlor wird in verschiedenen Formen verwendet. Neben gasförmigem Chlor kann auch Chlorkalk, Natriumhypochlorit, Calciumhypochlorit und Chlordioxid verwendet werden. (Solsona & Méndez, WHO, 2003)

Bei dem eigentlichen oxidierenden Agens handelt es sich in allen Fällen um Hypochlorige Säure (HOCl). Sie entsteht, sobald Chlor in Wasser gegeben wird.



Als „aktives Chlor“ bezeichnet man den Teil des zugegebenen Chlors oder der Chlorverbindungen, der nach der Zugabe oxidativ wirksam wird. Chlor reagiert wegen seiner hohen Oxidationskapazität mit sehr vielen Wasserinhaltsstoffen, so dass nur ein Teil dieses aktiven Chlors zur Desinfektion beiträgt und entsprechend überdosiert werden muss, um den empfohlenen Chlorrestgehalt von 0,1 bis 0,5 mg/l zu erhalten. Die Einwirkzeit sollte mindestens 30 Minuten betragen. (Heber, GATE, 1989) Nach Trinkwasserverordnung ist in Deutschland eine maximale Dosierung von 1,2 mg/l freiem Chlor zugelassen (Umweltbundesamt 2009, §11 Trinkwasserverordnung).

Durch die Reaktion des Chlors mit Wasserinhaltsstoffen können unerwünschte Desinfektionsnebenprodukte (DBPs) entstehen, die teilweise in dem Verdacht stehen, karzinogen zu wirken. Aber auch die nicht-toxischen DBPs sind unerwünscht, da sie zum Verbrauch des aktiven Chlors führen. Weiterhin kann durch die Oxidation die Bioverfügbarkeit einiger organischer Wasserinhaltsstoffe erhöht werden, so dass die mikrobielle Rekontaminationsgefahr zunimmt. (Parodi, 2003)

Eingeschränkt wird die Effektivität der Chlorung vor allem durch hohe pH-Werte über 8 und durch organische und andere Stoffe, die im Wasser gelöst sind (Brikké, WHO, 2003). Auch kolloidale und partikuläre Stoffe reagieren mit Chlor und verringern so seine Desinfektionswirkung. Die WHO gibt hierbei den Grenzwert von 5 NTU als kritisch an, wobei eine optimale Desinfektion bei unter 1 NTU gegeben ist (Solsona, WHO, 2003).

In dieser Arbeit wurde Calciumhypochlorit verwendet, da diese Chlorverbindung im Projektgebiet fast ausschließlich eingesetzt wird. Im Gegensatz zu den Hypochloriten erfordert die Verwendung von gasförmigem Chlor und Chlordioxid sehr kompetentes Personal mit einer guten Ausbildung und komplexere, empfindlichere Geräte mit entsprechend höheren Kosten. Chlorkalk ist im Rahmen dieser Arbeit ungeeignet, da es relativ schnell an Desinfektionsstärke verliert (WHO, 1963).

3.1.1.2 Ozon

Obwohl Ozon sehr gute oxidative Eigenschaften besitzt, ist seine Verwendung in Indonesien nicht geeignet. Zu den sehr hohen Investitions- und laufenden Kosten kommen eine komplexe Bedienung und Wartung. Ein weiteres großes Problem ist die erforderliche Stromversorgung, die im Projektgebiet nicht dauerhaft gewährleistet ist. (WHO, 1963)

3.1.2 Physikalische Verfahren

3.1.2.1 Abkochen

Gegenwärtig kocht die Bevölkerung im Projektgebiet ihr Wasser ab. Das Abkochen von Wasser ist sehr effektiv bezüglich der Elimination von Mikroorganismen. Zudem haben Trübstoffe oder andere Verunreinigungen kaum Einfluss auf die Desinfektionsleistung. Jedoch ist das Abkochen von Wasser eine sehr Energie-verbrauchende Methode und damit wenig nachhaltig.

3.1.2.2 Strahlung

Zur Desinfektion eingesetzte Strahlungen umfassen neben der UV-Strahlung noch die „Gamma“- und Röntgenstrahlen. Die „Gamma“- und Röntgenbestrahlung sind jedoch zu teuer und werden wegen verschiedener Risiken nicht für Trinkwasser eingesetzt. Deshalb wird in dieser Arbeit nur die UV-Desinfektion einbezogen. (WHO, 1963)

UV-Desinfektion

Die UV-Desinfektion ist die einzige physikalische Methode, die auch auf klein-kommunaler Ebene mit zentralem Wassersystem zur Wasserdesinfektion genutzt wird. Sie führt nicht zu physikalischen oder chemischen Veränderungen im behandelten Wasser und bringt so keine DBPs mit sich, hinterlässt jedoch auch keinen Desinfektionsmittelrest für die Sicherung beim Wassertransport.

Im wesentlichen wird für die UV-Bestrahlung eine UV-Lampe und ein Gefäß benötigt, das möglichst transparent für UV-Strahlen ist. Besonders geeignet ist Quarz, das auch als Schutz für die UV-Lampen genutzt wird.

Die für die Desinfektion benötigte Wellenlänge liegt im Bereich zwischen 240 und 280 nm, wobei die größte Effektivität bei 260 nm im UV-C Bereich beobachtet werden kann (WHO, 1963). Das UV-C-Licht wird von der DNA, der RNA und den Proteinen absorbiert und bewirkt so eine Inaktivierung der Bakterien und Viren (Jungfer, 2006).

Wie in Abbildung 3-1 erkennbar, ist die Absorption der Strahlen durch die DNA bei 260 nm am höchsten, so dass bei dieser Wellenlänge die beste Desinfektionsleistung erzielt wird.

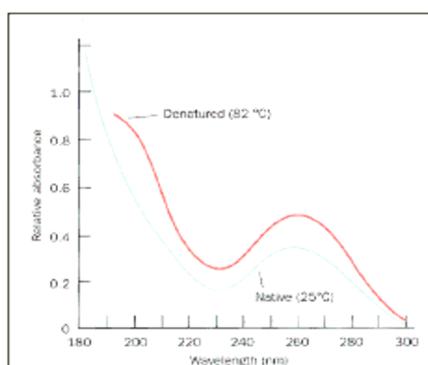


Abbildung 3-1: Absorptionsspektrum der DNA (Quelle: Voet *et al.*, 2002)

Da die Intensität der Strahlung mit größerer Entfernung zur Lampe abnimmt, wird empfohlen eine Wassertiefe von 75 mm nicht zu überschreiten. Mikroorganismen können sehr unterschiedlich resistent gegen UV-Strahlung sein. So wird für coliforme Bakterien eine maximale Zerstörung zwischen 6.000 und 10.000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ (60 bis 100 J/m^2) beobachtet. Jedoch liegt die Standard-Dosis zwischen 16.000 und 38.000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ (160 bis 380 J/m^2). Die Expositionszeit liegt normalerweise zwischen 10 und 20 s. (WHO, 1963)

Zur Abtötung der, verglichen mit Bakterien, sehr viel Strahlungs-resistenteren Viren ist eine Intensität von mindestens 400 J/m^2 notwendig (Röske & Uhlmann, 2005).

Um eine ausreichende Desinfektion garantieren zu können, sollten Trübungen über 5 NTU vermieden werden (Solsona, WHO, 2003).

Der große Nachteil der UV-Desinfektion im Rahmen des hier untersuchten Projektes ist die benötigte zuverlässige Stromquelle, für die nicht garantiert werden kann.

Solare Wasserdesinfektion

Die solare Wasserdesinfektion nutzt einen Teil der UV-Desinfektion, da hier der UV-A-Anteil des Lichts die Bakterien hemmt oder abtötet. Außerdem erwärmt sich das Wasser dabei auf 30-50 °C.

Das Wasser wird in durchsichtige Plastik-Getränkeflaschen gefüllt und für sechs Stunden in die Sonne gelegt. Die Flaschen können auch halbseitig schwarz bemalt werden und es können anstelle von Plastikflaschen auch Plastiksäcke oder Flachkollektoren eingesetzt werden.

Obwohl das Verfahren sehr einfach ist und gute Erfolge in Entwicklungshilfeprojekten erzielt, kann es im Rahmen dieses Projektes nicht angewandt werden, da die solare Wasserdesinfektion zu lange dauert und sie nicht für größere Wassermengen geeignet ist. (Parodi, 2003 & eawag 2010)

3.1.2.3 Filtration

Sowohl das Rückhaltevermögen als auch die Elimination von Mikroorganismen in Filtersystemen sind von verschiedenen Faktoren abhängig (Stevik *et al.*, 2003):

- Retention:
 - Verformung der Mikroorganismen
 - Filtermaterial
 - Zellform und Größe der Bakterien
 - Hydraulische Beladung
 - Verstopfung
 - Adsorption
 - Porosität des Filtermaterials
 - Gehalt an organischem Material
 - Biofilmbildung (Fouling)
 - Temperatur
 - Wasserfließgeschwindigkeit
 - Ionenstärke und –art
 - pH-Wert
 - Hydrophobizität
 - elektrostatische Ladungen auf der Zelloberfläche
 - weitere Eigenschaften der Zelloberflächen
 - Chemotaxis
 - Bakterienkonzentration
- Elimination:
 - abiotische Faktoren
 - Feuchtigkeitsgehalt
 - pH-Wert
 - Temperatur
 - Gehalt an organischem Material
 - biotische Faktoren
 - Bakterienart
 - Vorhandensein anderer Mikroorganismen und gegenseitige Wechselwirkungen

Filter können in Volumen- und Oberflächenfilter eingeteilt werden. Sie können aus verschiedenen Materialien bestehen. In der Gruppe der Volumenfilter findet man die häufig zur Wasseraufbereitung eingesetzten Sandfilter, aber auch Kiese und Aktivkohle. Im Unterschied zu den Volumenfiltern bestehen Oberflächenfilter in der Regel aus nur einem Material mit vielen kleinen Poren. Beispiele hierfür sind Membran-, Papier- und Keramikfilter. (Parodi, 2003)

Da in der Trinkwasseraufbereitung häufig Membranfiltrationen eingesetzt werden, wird hier kurz näher auf sie eingegangen.

Je nach Porengröße unterscheidet man zwischen Reverser Osmose, Nano-, Ultra- und Mikrofiltration. Dabei haben die bei der Mikrofiltration verwendeten Membranen die größten Poren (0,1 bis 10 μm), während bei der Reversen Osmose selbst Salze zurückgehalten werden können.

Als reines Siebverfahren eignet sich die Membranfiltration besonders gut zur Abscheidung von Krankheitserregern (Röske & Uhlmann, 2005). Da aber auch andere organische und anorganische Stoffe von der Membran zurückgehalten werden, finden die Mikroorganismen in den Ablagerungen ein gutes Nährstoffangebot. So können sie sich, vor allem während längerer Stillstandszeiten, gut vermehren und führen zu einem sogenannten Fouling oder sogar zum Durchwachsen der Membran. Ein weiteres, an Membranen auftretendes, Phänomen ist das sogenannte Scaling, bei dem durch Überschreiten des Löslichkeitsproduktes an der Membran Salze ausgefällt werden. (Parodi, 2003).

Die Verblockung der Membran macht ein regelmäßiges Rückspülen der Filter mit Filtrat oder Luft erforderlich. Der größte Nachteil der Verfahrens sind die hohen Kosten (Röske & Uhlmann, 2005).

Als Beispiele für die Volumen- und Oberflächenfiltration soll an dieser Stelle die Langsamsand- und die Keramikfiltration genauer betrachtet werden.

Langsamsandfiltration

Als eine der ältesten bekannten Methoden zur Wasserbehandlung wird die Langsamsandfiltration schon lange nicht mehr ausschließlich zur Entfernung von Trübstoffen aus Regenwasser genutzt. Sie ist eine weit verbreitete Technik zur Wasserdesinfektion. Dabei sind die richtige Auslegung und Anwendung essentiell.

Bei der Langsamsandfiltration werden im Gegensatz zu den chemischen Verfahren keine zusätzlichen Chemikalien benötigt, die die Umwelt belasten. Entstehende DBPs (Desinfektions-Nebenprodukte) sind ausschließlich natürliche Substanzen, die aus dem biologischen Abbau hervorgehen.

Die desinfizierende Wirkung kommt durch verschiedene Transportmechanismen innerhalb des Filterbettes, durch Haftmechanismen und biologische Abbau-mechanismen zustande. So wirken neben den Siebeffekten, die die Mikroorganismen auf Grund ihrer Größe abtrennen, außerdem Gravitationskräfte, Massenanziehungs-kräfte und elektrostatische Anziehungskräfte, die zur Kollision der Partikel und Mikroorganismen mit dem Filtermaterial führen. Im Laufe der Betreibung eines Langsamsandfilters kommt es zum Wachstum eines Biofilmes, der dem Filter ein zusätzliches Rückhaltevermögen verleiht. Diese „Schmutzdecke“ ist essentiell bei dem Betrieb des Filters für die Desinfektion. (WHO, 1963)

Bei hohen Trübungswerten von über 30 NTU kann es allerdings zu einer schnellen Verblockung des Filters kommen, so dass eine Vorstufe zur Trübungsentfernung erforderlich wird (Brikké, WHO, 2003).

Keramikfiltration

In den letzten Jahren hat die Keramikfiltration an Bedeutung für die Trinkwasser-aufbereitung in Haushalten und kleinen Gemeinden gewonnen. Die konventionellen Trinkwasseraufbereitungsverfahren, die aus Flockung, Sedimentation und Filtration, gefolgt von einer chemischen Desinfektion bestehen, werden hauptsächlich von großen Gemeinden genutzt und sind für kleinere Gemeinden meist nicht sehr Kosten-effektiv. Kleinere Systeme, zu denen auch die Kartuschen- und Membranfiltrationssysteme gehören, sind für kleinere Gemeinden meist günstiger und bringen den Vorteil mit, dass

sie keine chemische Vorbehandlung und nur eine geringe Vorfiltration erfordern. Auf Grund ihrer relativ guten chemischen, thermischen und strukturellen Stabilität, der langen Lebensdauer, Haltbarkeit und unkomplizierter Reinigung sind Keramikfilter für die Anwendung zur Wasseraufbereitung gut geeignet. (Muhammad *et al.*, 2009)

Dabei werden sowohl Filterkerzen als auch keramische Membranen eingesetzt.

Keramikfilter bestehen hauptsächlich aus Aluminiumoxid und Siliziumcarbid. Um die elektrische Ladung und Behinderungen durch die submikrone Porengröße zu kontrollieren, wird Titandioxid zugegeben. (Muhammad *et al.*, 2009) Meist wird dies umgesetzt, indem die feinere Titandioxid-Schicht mittels Sol-Gel-Verfahren auf das grob-porösere Trägermaterial aufgetragen wird (Informationszentrum Technische Keramik, 2010).

Die Elimination der Mikroorganismen erfolgt bei der Keramikfiltration über ein rein mechanisch-physikalisches Trennverfahren. Mit einer entsprechend gewählten Porengröße können niedermolekulare Stoffe die Membran passieren, während größere Moleküle zurückgehalten werden. (Atech, 2010)

3.1.2.4 Beurteilung der Hygienisierungsmaßnahmen hinsichtlich des Einsatzes im Projektgebiet

In diesem Kapitel wurden verschiedene Desinfektionsmethoden erläutert, die an dieser Stelle noch einmal zusammenfassend auf den Einsatz im Projektgebiet hin diskutiert werden.

Das Abkochen des Wassers ist gegenwärtig die einzige Möglichkeit der Bevölkerung sich vor Krankheiten zu schützen, die durch das Wasser übertragen werden. Doch obwohl dies ein sehr effektives Verfahren ist, ist es wenig nachhaltig. So sollen hier nachhaltige und angepasste Methoden gefunden und entwickelt werden.

Die großen Vorteile der Chlorung sind das breite Wirkungsspektrum, die hohe Aktivität und der nachhaltige Effekt (Röske & Uhlmann, 2005). Des Weiteren ist Calciumhypochlorit (unter dem Namen Kaporit) im Projektgebiet weit verbreitet und mit relativ geringem Kostenaufwand erhältlich. Nachteile ergeben sich vor allem aus der Bildung toxischer DBPs (Röske & Uhlmann, 2005). Einen nicht zu vernachlässigenden Nachteil beim Einsatz im Projektgebiet bildet außerdem der „chlorige“ Geschmack, den das

Wasser bekommt. Sollte sich herausstellen, dass eine große Menge Chlor benötigt wird, um das Wasser aufzubereiten, wird das gechlorte Wasser womöglich, aufgrund mangelnder Akzeptanz der Bevölkerung, nicht mehr als Nahrungsmittel verwendet.

Dennoch sollte die Anwendung von Chlor, in Form von Kaporit, im Projektgebiet näher untersucht werden, da es sich um ein relativ kostengünstiges, einfach durchzuführendes und effizientes Verfahren handelt.

Obwohl die Desinfektion mit Ozon ein relativ umweltfreundliches Verfahren ist, machen die hohen Investitions- und laufenden Kosten das Verfahren ungeeignet für den Einsatz im Projektgebiet. Hinzu kommen die komplexe Bedienung und Wartung, sowie die erforderlich Stromversorgung, die im Projektgebiet nicht gegeben ist.

Die UV-Desinfektion hat den großen Vorteil, dass sie die Krankheitserreger ohne Verwendung toxischer Chemikalien oder Bildung von DBPs sehr wirksam inaktiviert. Die Hauptnachteile ergeben sich aus den, verglichen mit der Chlorung, hohen Betriebskosten und den hohen Anforderungen an die Rohwasserqualität bezüglich Trübung und Färbung (Röske & Uhlmann, 2005). Ein weiterer Nachteil für den Einsatz im Projektgebiet ist die benötigte stabile Stromversorgung, die nicht gewährleistet ist. Möglich wäre, dass die UV-Lampen aufgrund von Stromschwankungen besonders schnell verschleißern. Wie schwerwiegend diese Nachteile gegenüber den Vorteilen sind, soll mit Hilfe des Feldlabors unter indonesischen Bedingungen geprüft werden.

Den Vorteilen der solaren Desinfektion, die sehr kostengünstig und unkompliziert ist, steht der große Nachteil gegenüber, dass sie nicht dafür geeignet ist größere Mengen Wasser zu desinfizieren. Das Verfahren dauert zu lange und eine Kontrolle des Desinfektionserfolges ist schlecht realisierbar (Parodi, 2003). Sie ist somit nicht für den Einsatz als dezentrale Hygienisierung des Wassers geeignet.

Die Langsamsandfiltration stellt eine besonders unkomplizierte und effiziente Methode zur Wasseraufbereitung dar. Zusätzlich zu den Mikroorganismen werden auch die unerwünschten Trübstoffe zurückgehalten. Der große Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe Platzbedarf, der jedoch den geringen Kosten gegenübersteht. In Anbetracht der Verhältnisse in Indonesien scheint die Langsamsandfiltration die wohl am besten geeignete Methode zur Wasseraufbereitung zu sein, da sie besonders kostengünstig und unkompliziert ist und mit Materialien aus der Region betrieben werden kann.

Je nach Membrantyp können Membranfiltrationssysteme sehr teuer und aufwändig in der Handhabung sein. Sie sind jedoch sehr effektiv und bei der Filtration werden keine DBPs gebildet. Als Vertreter dieser Membransysteme soll eine Filtration mit keramischen Membranen auf die Eignung zum Einsatz im Projektgebiet experimentell untersucht werden. Keramische Membranen sind im Vergleich zu anderen Membransystemen relativ kostengünstig und einfach zu handhaben.

Für die Konzeptionierung der Pilotanlage wurden somit vier verschiedene Verfahren ausgewählt: die Chlorung, die UV-Desinfektion, die Langsamsandfiltration und die Keramikfiltration.

3.2 Experimenteller Aufbau / Durchführung

Anhand der in Kapitel 3.1 aufgeführten Argumente für und gegen die verschiedenen Desinfektionsmethoden wurden die Chlorung, die UV-Desinfektion, die Langsamsand- und die Keramikfiltration für die Konzeptionierung der Pilotanlage ausgewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Laborversuche zu diesen Desinfektionsmethoden durchgeführt. Sie erfolgten mit Leitungswasser, dem verschiedene Trübstoffgehalte und verschiedene Bakterien zugesetzt wurden.

Bei diesen Bakterien handelte es sich um *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* und *Vibrio vulnificus*. Bis auf das gram-positive Bakterium *Enterococcus faecium* waren alle eingesetzten Bakterien gram-negativ.

Escherichia coli, das wohl am besten charakterisierte Bakterium überhaupt, besiedelt den Säugerdickdarm (Voet *et al.*, 2002) und gilt bei Wasser- und Lebensmitteluntersuchungen als Indikator für fäkale Verunreinigungen.

Ein weiteres Indikatorbakterium für fäkale Verunreinigungen stellt *Enterococcus faecium* aus der Gruppe der fäkalen Streptokokken dar. Das Bakterium ist dafür bekannt, im Vergleich zu *E.coli* eine höhere Resistenz gegenüber Desinfektionsmechanismen zu zeigen, was auf unterschiedliche physiologische Eigenschaften zurückzuführen ist. (Frahm *et al.*, 1998)

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der diverse Infektionen hervorrufen kann. Das Wasserbakterium kann selbst in destilliertem Wasser überleben und Kolonien bilden (Favero *et al.*, 1971) und ist außerdem als Biofilmbildner bekannt.

Ein gastrointestinal-pathogenes Bakterium, das auch im Trinkwasser überleben kann (Pokorný, 1988) ist *Campylobacter jejuni*, das ebenfalls für seine Biofilmbildung bekannt ist (Joshua *et al.*, 2006).

Shigella flexneri verursacht entzündliche Darmerkrankungen und stellt insbesondere in Entwicklungsländern mit mangelhafter Wasserversorgung und –aufbereitung ein Gesundheitsrisiko dar (Zychlinsky, 2003).

Bei *Vibrio vulnificus* handelt es sich um ein pathogenes marines Bakterium, das Blutvergiftungen und Wundinfektionen hervorruft. Da *Vibrio vulnificus* hauptsächlich im Salz- und Brackwasser vorkommt und vorwiegend über Austern und Krebse vom Menschen aufgenommen wird, stellt er keine Gefahr im aufzubereitenden Wasser im Projektgebiet dar. Das Bakterium wird jedoch viel im Zusammenhang mit „Viable But Not Culturable“- (VBNC) und Stressuntersuchungen bei Bakterien genutzt. (Paludan-Müller *et al.*, 1996) VBNC beschreibt einen Zustand, in dem das Bakterium nicht in der Lage ist, Kolonien zu bilden, aber trotzdem nicht tot ist. Bei einer „Verbesserung“ der Umweltbedingungen für das Bakterium ist es wieder in der Lage Kolonien zu bilden.

In den Labortests wurde das Bakterium in Leitungswasser überführt, in dem es sich vermutlich nicht vermehren konnte. Da die Versuche jedoch innerhalb weniger Stunden durchgeführt wurden, und *Vibrio vulnificus* ohnehin mit einem geringen Salzgehalt auskommt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Bakterien überleben konnten relativ hoch.

3.2.1 Verwendete Medien

Pepton aus Casein (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Trypton (Becton, Dickinson Company, Frankreich)

Fleischextrakt (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Agar Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

KCl (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

CaCl₂ x 2 H₂O (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

MgCl₂ x 6 H₂O (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

NaHCO₃ (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

MgSO₄ x 7 H₂O (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Brain-Heart-Infusion (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Chromocult-Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Cetrimid-Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Kanamycin-Äsculin Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Merckoplate Blut-Agar (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Thioglycolat-Bouillon (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Trypticase-Soy-Broth (Becton, Dickinson Company, Frankreich)

Pseudomonas-Agar F (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Lactose-TTC-Agar mit Tergitol 7 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Sea-Water-Agar

Für die Herstellung des Artificial-Sea-Water-Agar (ASW-Agar) wurde zunächst künstliches Seewasser hergestellt. Dafür wurden folgende Salze in einem Liter destilliertem Wasser gelöst:

28,13 g	NaCl
0,77 g	KCl
1,60 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
4,80 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
0,11 g	NaHCO ₃
3,50 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O

Nun wurden 5 g Fleischextrakt und 5 g Pepton in 250 ml Leitungswasser gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend 10 min auf einem Magnetrührer gekocht und der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt. Nach der Zugabe von 10 g Agar-Agar wurde das Medium für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden 375 ml des künstlichen Seewassers zugegeben. Das fertige Medium wurde abgekühlt und in Platten gegossen.

Zur Herstellung des Flüssigmediums wurde der Agar weggelassen.

Nutrient-Agar

Für die Herstellung des Nutrient-Agars wurden 2,5 g Pepton, 1,5 g Fleischextrakt und 7,5 g Agar-Agar in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt und das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Die Herstellung des Flüssigmediums erfolgte analog ohne die Zugabe von Agar.

Hefeextrakt-Agar

Das Hefeextrakt-Medium wurde nach ISO 6222 (Trinkwasserverordnung) hergestellt. Dafür wurden 6 g Trypton, 3 g Hefeextrakt und 7,5 g Agar-Agar in 500 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH auf 7,2 eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.2.2 Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wurden aus der internen Stammsammlung der Mikrobiologie-Abteilung des Instituts für Funktionelle Grenzflächen (IFG) zunächst auf den entsprechenden Nährböden (siehe Tabelle 3-1) ausplattiert und bei 37 °C (*Vibrio vulnificus* bei 30 °C) für 24 h inkubiert. *Campylobacter jejuni* wurde unter mikroaeroben Bedingungen für 72 h inkubiert, da nach 24 h noch kein Wachstum sichtbar war.

Im Anschluss wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Impföse von den Platten abgenommen, in 5 ml Flüssigmedium (siehe Tabelle 3-1) überführt und bei 37 °C (30 °C für *Vibrio vulnificus*) über Nacht bei leichten Schüttelbewegungen inkubiert. *Campylobacter jejuni*-Kolonien wurden in 9 Reaktionsgefäße mit je 5 ml Medium gegeben und für 7 Tage im 37 °C Brutschrank inkubiert.

Tabelle 3-1: verwendete Bakterienstämme mit zugehörigen Medien

Bakterienstamm	Nummer	Trockenmedium	Flüssigmedium
<i>Campylobacter jejuni</i>	DSM 4688	Merckoplate Blut-Agar	Thioglycolat-Bouillon
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 20477	Kanamycin-Äsculin-Agar	Brain-Heart-Infusion
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	Chromocult-Agar	Brain-Heart-Infusion
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Cetrimid-Agar	Brain-Heart-Infusion
<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	Nutrient-Agar	Nutrient Medium
<i>Vibrio vulnificus</i>	DSM 10143	ASW-Agar	ASW Medium

3.2.3 Zusammensetzung des Wassers für die Laborversuche

Trübungsmessgerät TURB 355 IR (WTW)

Heilerde 1 (Luvos[®] Friedrichsdorf)

Für die Versuche wurden die Übernachtskulturen der einzelnen Bakterienstämme 1:2000 verdünnt und 4 ml dieser Verdünnung in zwei Liter Leitungswasser gegeben. Dieser Ansatz wurde für die verschiedenen Verfahren und unterschiedlichen Parameter (Trübungsstufen, Chlorkonzentration, etc.) mehrfach hergestellt. Für die Versuche mit *Campylobacter jejuni* wurden von den Wochenkulturen pro Ansatz je 4,5 ml unverdünnt eingesetzt.

Durch Zugabe von sterilisierter Heilerde (7 h bei 105 °C) wurde eine künstliche Trübung des Wassers hergestellt, womit der Einfluss der Trübung von 2 bzw. 7 NTU auf die Desinfektionsleistung der Methode untersucht werden sollte. Die Trübung von circa 2 NTU wurde durch Zugabe von 23 mg Heilerde zu 2 l Wasser erreicht. Eine Zugabe von 79 mg zu 2 l Leitungswasser führte zu einer Trübung von etwa 7 NTU. Die Trübungswerte von 2 und 7 NTU wurden anhand der Daten ausgewählt, die bis zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente im Projektgebiet erhoben werden konnten (siehe Tabelle 9-5 bis Tabelle 9-9). Während der Trockenzeit stelle der Wert von 2 NTU den höchsten gemessenen Trübstoffgehalt dar. Zu Beginn der Regenzeit konnten teilweise 7 NTU gemessen werden.

3.2.4 Wasseranalyse

Die Überprüfung der Desinfektionsleistung der verschiedenen Prozesse und Parameter erfolgte mittels Kulturverfahren und spezies-spezifischer PCR.

3.2.4.1 Kulturverfahren

Filter Ø 25 mm, 0,2 µm Porenweite (Whatman, VWR)

Nucleopore, PC, 0,2 µM, 47 mm (Whatman, VWR)

Im Vorfeld der Versuche wurde das Leitungswasser ohne Zusatz von Bakterien, gemäß der Trinkwasserverordnung, analysiert. Dafür wurden je 100 ml Wasser filtriert und der Filter wurde auf Agarplatten gelegt und bebrütet. Eine dieser Platten enthielt Chromocult- Agar und diente dem Nachweis von *E.coli* und anderen coliformen Bakterien. Sie wurde bei 37 °C für 24 h bebrütet. Zwei weitere Platten enthielten Hefeextrakt- Agar und wurden bei 20 °C, bzw. bei 37 °C für 24 h bebrütet. Sie dienten der Bestimmung der Gesamtkeimzahl. Die Trinkwasserverordnung schreibt vor, dass in 100 ml Trinkwasser keine *E.coli* oder andere coliforme Keime enthalten sein dürfen. Die Koloniezahl bei 22 °C darf 100 KBE pro Milliliter nicht überschreiten und bei 36 °C dürfen 20 KBE pro Milliliter nicht überschritten werden (DVGW, Trinkwasserverordnung, 2001).

Für eine genaue Feststellung der Bakterienkonzentration wurden je 100 µl einer Verdünnungsreihe der Bakterienkulturen auf einer geeigneten Agarplatte (siehe Tabelle 3-1) ausgestrichen, bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und nach 24 h ausgezählt (Campylobacter nach 72 h).

Zur Wasseranalyse im Rahmen der Versuche wurden ebenfalls je 100 ml der Ansätze filtriert und die Filter auf eine, für den Organismus geeignete, Agarplatte gelegt und bei einer entsprechenden Temperatur bebrütet. Die Kolonien wurden nach 24 h ausgezählt (Campylobacter nach 72 h).

Die verbleibenden 1900 ml wurden ebenfalls filtriert. Der Filter wurde in 1 ml PCR-Wasser gegeben, bei –80 °C eingefroren und für die molekularbiologische Untersuchung verwendet.

3.2.4.2 Spezies-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion

Die molekularbiologische Untersuchung erfolgte analog der Proben aus Indonesien. Im Kapitel 2.4.4 und 2.4.5 sind die Methoden im Einzelnen aufgeführt. Die Filter wurden in Reaktionsgefäße mit 1 ml PCR-Wasser gegeben und mind. 24 h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Filter durch reverses Pipettieren gut „abgespült“ und entnommen. Nach einem Gefrier-Tau-Verfahren der Überstände wurden die Proben anschließend einer PCR (siehe Kapitel 2.4.5) mit den für diesen Bakterienstamm spezifischen Primerpaar und dem passenden Temperaturprofil unterzogen. Die Primer und Temperaturprofile werden im folgenden aufgeführt.

Tabelle 3-2: für die Chlorversuche verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Größe [bp]	Zielgruppe	Referenz
ECST784f ENC854r	AGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT	92	<i>Enterococcus faecium</i>	Frahm <i>et al.</i> , 1998
F1 R1	CACTTGTTGGGTATGCTGG CCGGCAAACAGATTAGAAA	782	<i>Shigella flexneri</i>	Li <i>et al.</i> , 2006
Cam1 Cam2 Cam3	GCTCAAAGTGGTTCTTATGCNATGG GCTGCGGAGTTCATTCTAAGACC AAGCAAGAAGTGTCCAAGTTT	1/2: 336 1/3: 180	<i>Campylobacter jejuni</i>	Waage <i>et al.</i> , 1999
Pa23f Pa23Rb	TCCAAGTTTAAGGTGGTAGGCTG ACCACTTCGTCATCTAAAAGACGAC	116	<i>P.aeruginosa</i>	Volkman <i>et al.</i> , 2007
517f 907r VibR	GCCAGCAGCCGCGGTAA CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT GTC	1/2: 1/3: 124	<i>Vibrio vulnificus</i>	Kilb <i>et al.</i> , 1998, verändert intern Cerdà-Cuéllar <i>et al.</i> , 1999
ECOuidAF ECOuidAR	GTGTGATATCTACCCGCTTCGC AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA	87	<i>E.coli</i>	Frahm & Obst, 2003

Primer ECOuidAF/ECOuidARPositivkontrolle: *Enterococcus faecium*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
30 Zyklen	54 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Primer ECST784/ENC854Positivkontrolle: *Enterococcus faecium*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	1 min	Denaturierung
35 Zyklen	60 °C	1,5 min	Annealing
	72 °C	1,5 min	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Primer Pa 23f/Pa 23RbPositivkontrolle: *Pseudomonas aeruginosa*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
30 Zyklen	54 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Primer Cam1/Cam2Positivkontrolle: *Campylobacter jejuni*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	95 °C	5 s	Denaturierung
40 Zyklen	53 °C	30 s	Annealing
	72 °C	40 s	Elongation
	72 °C	10 min	Abschließende Extension

Primer Cam1/Cam3Positivkontrolle: *Campylobacter jejuni*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	95 °C	5 s	Denaturierung
20 Zyklen	53 °C	30 s	Annealing
	72 °C	40 s	Elongation
	72 °C	10 min	Abschließende Extension

Primer 1F/1RPositivkontrolle: *Shigella flexneri*

Temperaturprofil:

	94 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
35 Zyklen	50 °C	1 min	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
	72 °C	5 min	Abschließende Extension

Primer 517F/907RPositivkontrolle: *Vibrio vulnificus* und Salmonellen

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	94 °C	30 s	Denaturierung
30 Zyklen	54 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Primer 517F/VibRPositivkontrolle: *Vibrio vulnificus*

Temperaturprofil:

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
	95 °C	30 s	Denaturierung
40 Zyklen	53 °C	30 s	Annealing
	72 °C	40 s	Elongation
	72 °C	10 min	Abschließende Extension

3.2.5 Chlorung

Heilerde 1 (Luvos Just)

Kaporit, 60 % aktives Chlor (tjiwi kimia, Indonesien)

DPD, freies Chlor Pulver Reagenz (VWR)

Aquamate water analysis Spectrophotometer (Thermo Spectronic)

Spectrophotometer DR 2800 (HachLange)

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1 erwähnt, wurden die Versuche mit Kaporit (=Calciumhypochlorit) durchgeführt, da in Indonesien fast ausschließlich Kaporit als Desinfektionsmittel eingesetzt wird.

Zunächst wurde eine Kaporitlösung hergestellt, die 3 g/l Kaporit enthielt. Dazu wurden 0,3 g Kaporit in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Da das Kaporit 60 % freies Chlor enthielt, waren in dieser Lösung 1,8 g/l freies Chlor verfügbar.

In acht Ansätzen wurden die verschiedenen Trübungen mit drei Chlorkonzentrationen kombiniert. Dabei diente ein Ansatz ohne zusätzliche Trübstoffe der Kontrolle und wurde nicht mit Chlor versetzt. Drei weitere Ansätze ohne Trübstoffe wurden mit 0,66 ml, mit 1,33 ml bzw. mit 20 ml der Kaporitlösung versetzt. Für die Trübungsstufen mit 2 NTU bzw. 7 NTU wurden je nur zwei Ansätze mit 1,33 ml und 20 ml Kaporitlösung hergestellt. Die Zugabe von 0,66 ml der Kaporitlösung zu 2 l Wasser ergab eine Kaporitkonzentration von 1 mg/l, was etwa 0,6 mg/l freiem Chlor entsprach.

Durch Zugabe von 1,33 ml der 3 g/l Kaporitlösung in 2 l des zu behandelnden Wassers entstand eine Lösung mit 2 mg/l Kaporit und damit 1,2 mg/l freies Chlor. Dies entsprach der nach Trinkwasserverordnung in Deutschland zulässigen Zugabe an freiem Chlor (Umweltbundesamt 2009, §11 Trinkwasserverordnung).

Schließlich ergaben 20 ml Kaporitlösung in 2 l Wasser eine Lösung mit 0,03 g/l Kaporit. In dem zu behandelnden Wasser standen somit 18 mg/l freies Chlor zur Verfügung. Diese Dosierung erfolgte nach einer Empfehlung der FAO für die Behandlung von Trinkwasser aus Brunnen in Indonesien (FAO-Indonesia, 2010).

Zusätzlich wurde bei den *E.coli*- und *Campylobacter jejuni*-Versuchen je ein Ansatz mit 0,03 g/l Kaporit und 30 NTU, die durch Zugabe von 0,2 g Heilerde zu 2 l Leitungswasser erreicht wurden, durchgeführt. Diese Versuche sollten zeigen, welche Auswirkungen eine hohe Trübstoffmenge auf den Desinfektionsprozess hat.

Nach der Trübungseinstellung und der Zugabe der jeweiligen Bakterien wurde die Kaporitlösung zudosiert und die Mischung gelegentlich geschüttelt. Der Gehalt an freiem Chlor wurde 30 min nach der Kaporitdosierung mit Hilfe einer DPD-Reagenz colorimetrisch bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte mithilfe eines Photometers von Thermo Spectronic und Vergleichsmessungen erfolgten mit einem Photometer von HachLange.

Anschließend erfolgten die in Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2 beschriebenen mikro- und molekularbiologischen Analysen.

3.2.6 UV- Desinfektion

Die Versuche zur UV-Desinfektion konnten während der Erstellung dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden, da die zunächst vorgesehene Anlage nicht den Anforderungen entsprach. Diese UV-Versuche sind Teil weiterer noch ausstehender Untersuchungen.

3.2.7 Langsamsandfiltration

Während der Erstellung dieser Arbeit erfolgten im Rahmen des IWRM-Projektes Versuche mit verschiedenen Trübstoffmengen, Filtermaterialien und Säulenaufteilungen. Sie wurden am Institut für Wasser- und Gewässerentwicklung im Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft durchgeführt. Anhand der Ergebnisse dieser Versuche sollen die geeignetsten Filtermaterialien und die optimale Zusammensetzung und Schichtung der Säulen ermittelt werden. Nach Abschluss dieser Arbeiten sollen an der optimalen Filtersäule Versuche mit Bakterien durchgeführt werden, um die Desinfektionsleistung zu überprüfen. Da die Entwicklung dieser Säulen jedoch noch nicht abgeschlossen war, konnten im Rahmen dieser Arbeit noch keine Versuche am Langsamsandfilter durchgeführt werden.

Abbildung 9-10 im Anhang zeigt die vom IWG entwickelten Testsäulen für die Versuche zur Langsandsandfiltration. Im Anhang sind außerdem einige Ergebnisse der bereits am IWG durchgeführten Versuche aufgeführt. Die Tabelle 9-11 bis Tabelle 9-13 zeigen Daten die zur Ermittlung der in Abbildung 9-11 bis Abbildung 9-13 aufgeführten Sieblinien erhoben wurden.

3.2.8 Keramikfiltration

Die Versuche zur Keramikfiltration wurden an einer Laboranlage der Firma Atech Innovations GmbH (siehe Abbildung 9-9 im Anhang) durchgeführt. Verwendet wurden zwei Membranfilter aus $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ bzw. Al_2O_3 mit einer Porengröße von 50 bzw. 200 nm in einem Edelstahl-Gehäuse. Beide Membranelemente waren aus 37 Kanälen mit je 2 mm Durchmesser aufgebaut (siehe Abbildung 3-2) und besaßen eine Länge von 1000 mm und damit eine Filterfläche von $0,23 \text{ m}^2$.

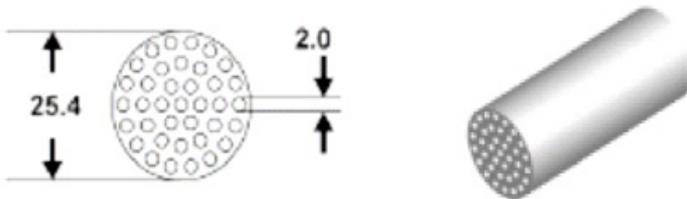


Abbildung 3-2: Design der Keramikfiltrationselemente

Die Anlage arbeitete nach dem Prinzip der Querstromfiltration (Crossflow), dabei förderte eine Kreiselpumpe das zu filtrierende Wasser durch das Filtrationsmodul, in dem die keramische Membran eingebaut war. Über einen Schwebekörper-Durchflussmesser wurde der Volumenstrom angezeigt, der zusammen mit den Differenzdrücken über ein Kugelventil hinter dem Modul eingestellt werden konnte. (Atech, 2010)

Die Keramikfiltrations-Versuche wurden mit einer Kombination aller 6 Bakterienstämme durchgeführt. Neben zwei 15 l Ansätzen für die Filtrationen wurde jeweils ein 2 l Ansatz als Kontrolle hergestellt. Von *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Vibrio vulnificus* und *Enterococcus faecium* wurden jeweils 6 ml einer 1:100 Verdünnung der

Übernachtskulturen zu 15 l Leitungswasser gegeben. Dem 2 l Kontrollansatz wurden 800 µl derselben Verdünnung zudosiert. Von der *Campylobacter jejuni*-Kultur wurden je 1 ml für den Kontrollansatz und 7,5 ml für den Versuchsansatz zugegeben.

3.2.8.1 200 nm Membranelement

Der Versuch mit dem 200 nm Membranelement erfolgte bei einem Druck von 0,8 bar vor dem Membranelement und einem Permeatfluss von 1300 l/h. Anfänglich betrug die Wassertemperatur 20 °C, stieg jedoch im Verlauf der Filtration auf 32 °C an. Die Probenahme erfolgte nach 1 h Laufzeit.

3.2.8.2 50 nm Membranelement

Bei der Filtration mit dem 50 nm Membranelement lag vor dem Membranelement ein Druck von 0,7 bar an. Der Permeatfluss betrug 1250 l/h und die anfängliche Wassertemperatur betrug 21 °C. Im Laufe der Filtration stieg sie auf 39 °C an. Zusätzlich zur Probenahme nach 1 h wurden auch Proben nach 10 min und 2 h Laufzeit genommen.

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Hygienische Untersuchung des Wasserleitungssystems

Im folgenden Kapitel werden hauptsächlich die Ergebnisse der Probenahme-Kampagne vom Oktober 2009 vorgestellt und diskutiert. Die Ergebnisse der Probenahme-Kampagne vom März 2010 werden in Tabelle 9-10 und in Abbildung 9-5 bis Abbildung 9-8 im Anhang dargestellt. Auch die Ergebnisse des monatlichen Monitorings werden im Anhang in Tabelle 9-7 bis Tabelle 9-9 aufgeführt.

Für eine Auswertung der Ergebnisse des Monitorings wären unter anderem meteorologische Daten hilfreich. Insbesondere würden Niederschlagsdaten einen Rückschluss auf Trübstoffeinträge und Einträge von Mikroorganismen liefern. Es war jedoch nicht möglich, genaue Daten für die Projektregion zu erhalten.

Die Trockenzeit dauert in der Regel von Mai bis Oktober an. Während die Luft in der Trockenzeit durch trockene Winde geprägt ist, bringt der Wind in der von November bis April andauernden Regenzeit feuchte Luft mit sich. In der Projektregion ist die Regenzeit durch relativ starke Regengüsse am Nachmittag oder Abend gekennzeichnet.

Die Lufttemperatur beträgt das ganze Jahr über etwa 27 bis 28 °C.

Der Regen setzte in der Projektregion im Jahr 2009 erst im Dezember ein. So erfolgte die Oktober-Probenahme während der Trockenzeit und zu einem Zeitpunkt, an dem es seit über 5 Monaten keinen nennenswerten Regenguss gegeben hatte.

4.1.1 Chemisch-physikalische Analyse

4.1.1.1 elektrische Leitfähigkeit, Temperatur und Sauerstoffgehalt

Elektrische Leitfähigkeit

Da die Leitfähigkeitselektrode im Labor der UII zur Zeit der Beprobung im Oktober 2009 defekt war, konnten für diesen Zeitraum keine Werte erhoben werden. In einer vorherigen Messkampagne im Juli/August 2009 konnten jedoch relativ konstante Leitfähigkeitsmessungen im Bereich von 480 bis 580 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessen werden (siehe Tabelle 9-5). Im Laufe des Leitungsnetzes gab es also keine großen Änderungen im

Salzgehalt des Wassers. Auch die beiden Höhlen waren mit 480 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Gua Seropan) und 499 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Gua Bribin) sehr ähnlich im Salzgehalt. Für das Wasser im Krankenhaus Wonosari lag der Wert mit 625 $\mu\text{S}/\text{cm}$ etwas höher.

Auch die Messkampagne im März 2010 (Tabelle 9-10) lieferte ähnliche Ergebnisse. Die Werte lagen zwischen 492 und 536 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Einzige Ausnahmen bildeten die Gua Seropan mit 598 $\mu\text{S}/\text{cm}$ und wiederum das Krankenhaus Wonosari mit 649 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Da die Gua Seropan ein anderes Einzugsgebiet hat als die Gua Bribin und sich das im Krankenhaus Wonosari getestete PDAM-Wasser in der Zusammensetzung ständig ändert und aus verschiedenen Quellen kommt, lässt sich nicht viel über die Ursachen sagen. Die elektrische Leitfähigkeit überschritt jedoch in keinem Fall die Grenze für Trinkwasser.

Temperatur

Die unten aufgeführte Abbildung 4-1 zeigt die Temperaturen des beprobten Wassers. Das Wasserleitungssystem Bribin sowie die Bezeichnungen der Pumpen und Speicherbehälter sind in Kapitel 2.1 näher erklärt.

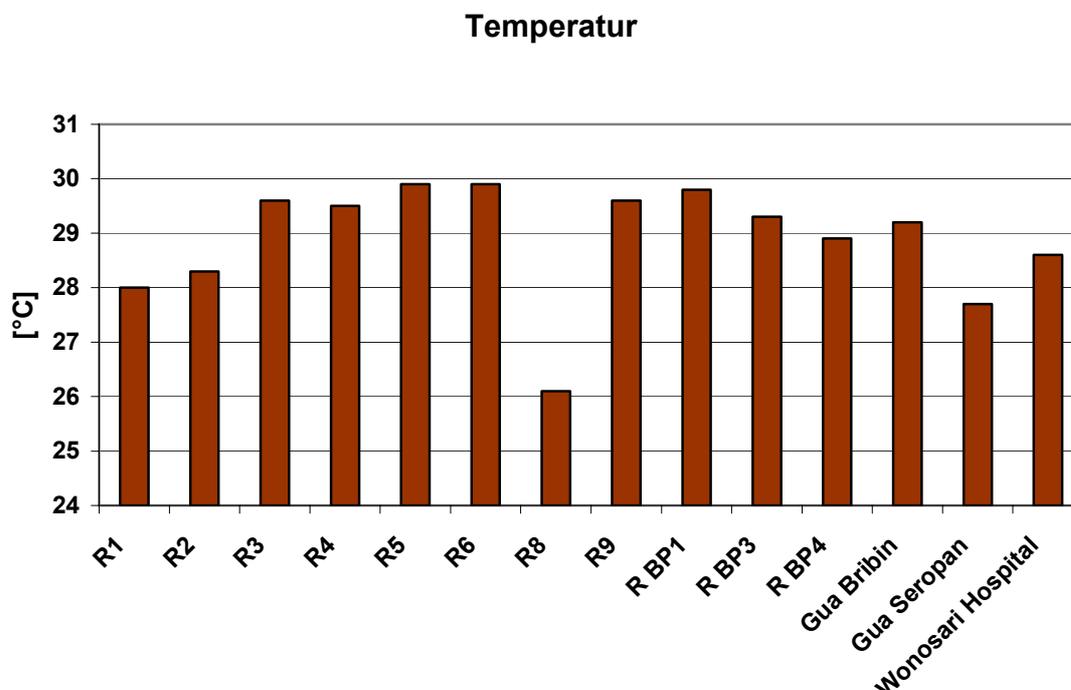


Abbildung 4-1: Temperaturen des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009

Mit Ausnahme des Behälters R8 mit 26,1 °C betrug die Temperaturen im Leitungssystem im Oktober zwischen 28 und 30 °C. Die Temperatur der Gua Seropan lag mit 27,5 °C deutlich unter der Temperatur der Gua Bribin (29,2 °C). Eventuell ist dies darauf zurückzuführen, dass die Beprobung des Wassers aus der Gua Seropan direkt in der Höhle erfolgte, während das Bribin-Wasser aus der Leitung entnommen wurde und die Leitung eventuell durch die Sonneneinstrahlung erwärmt war. Im Verlauf vom ersten Behälter R1 bis zum Behälter R3 stieg die Temperatur an, was wahrscheinlich an der Erwärmung in den, zum größten Teil oberirdisch verlaufenden, Rohrleitungen liegt. Danach blieb die Wassertemperatur relativ konstant und nur im Leitungsabschnitt vom Behälter R5 über die Pumpstation R BP4 zum Behälter R8 konnte ein Temperaturabfall vermerkt werden. Dabei könnte die niedrige Temperatur des Behälters R8 auch darauf zurückzuführen sein, dass in dem Behälter nur noch sehr wenig Wasser stand. Dadurch war das Wasser relativ weit von der durch die Sonne erwärmte Behälterdecke entfernt. Ein Messfehler ist unter Feldbedingungen jedoch auch nicht auszuschließen.

Die Ergebnisse der März-Probenahme (siehe Tabelle 9-10) zeigten ein sehr ähnliches Bild, mit der einzigen Ausnahme, dass die Temperatur im Abschnitt vom Behälter R5 zum Behälter R8 weiter anstieg. Auch dies ist auf eine Erwärmung in den der Sonne ausgesetzten Rohren und die unregelmäßige Beschickung dieses Abschnittes zurückzuführen.

Sauerstoffgehalt

Das folgende Diagramm (Abbildung 4-2) stellt den Sauerstoffgehalt des Wassers an der Probenahmestellen dar.

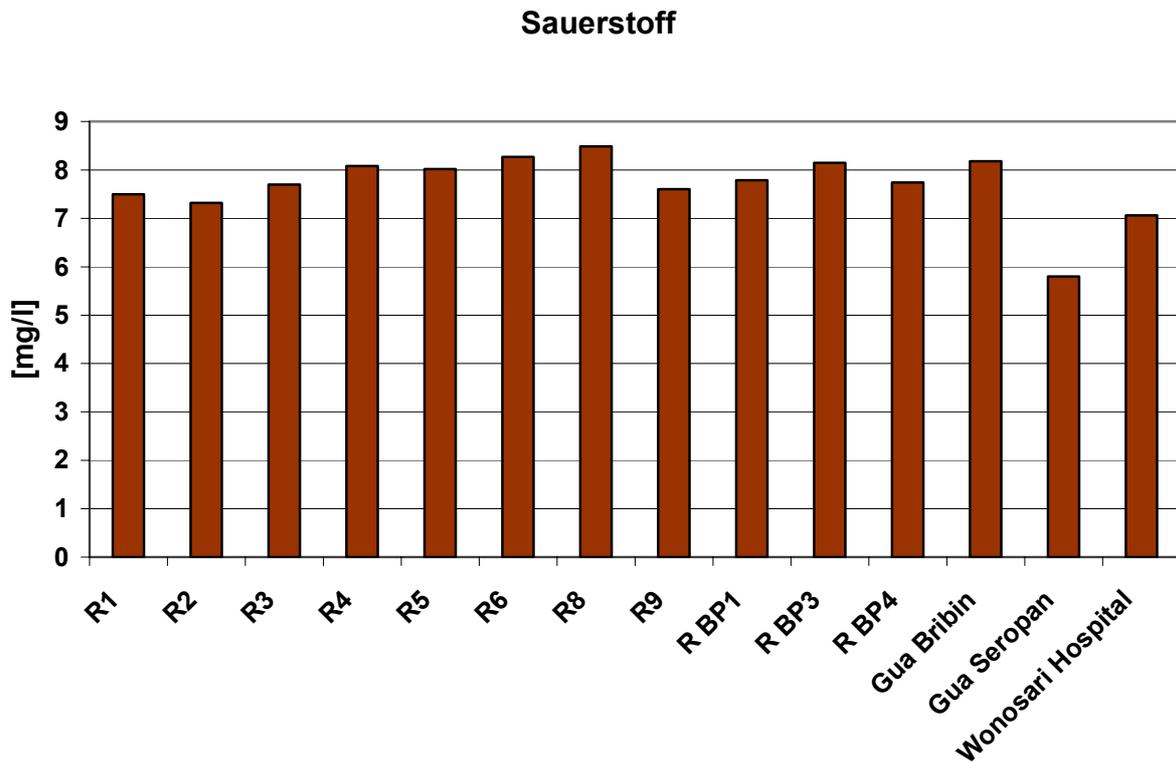


Abbildung 4-2: Sauerstoffgehalt des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009

Im Laufe des Leitungsnetzwerkes blieb der Sauerstoffgehalt relativ konstant. Der bemerkenswerte Unterschied zwischen dem Sauerstoffgehalt in der Gua Bribin und der Gua Seropan ließ sich dadurch erklären, dass das Wasser der Gua Bribin durch Leitungen gepumpt wurde und die Probenahme nicht direkt in der Höhle erfolgte. Ein Messfehler konnte ausgeschlossen werden, da die Werte denen der Messkampagne im Juli/August 2009 (Tabelle 9-5) und im März 2010 (siehe Tabelle 9-10) glichen.

4.1.1.2 pH- Wert

In der folgenden Graphik (Abbildung 4-3) ist der pH-Wert des Wassers in den einzelnen Behältern etc. dargestellt. Er befand sich mit Werten zwischen 7,4 bis 8,4 immer im neutralen bis leicht basischen Bereich.

Bei fünf Probenahmestellen war der pH-Wert größer als 8, so dass die Effektivität der Chlorung als Desinfektionsmethode hier beeinträchtigt werden könnte (siehe Kapitel 3.1.1.1), und eine höhere Dosis in Betracht gezogen werden muss.

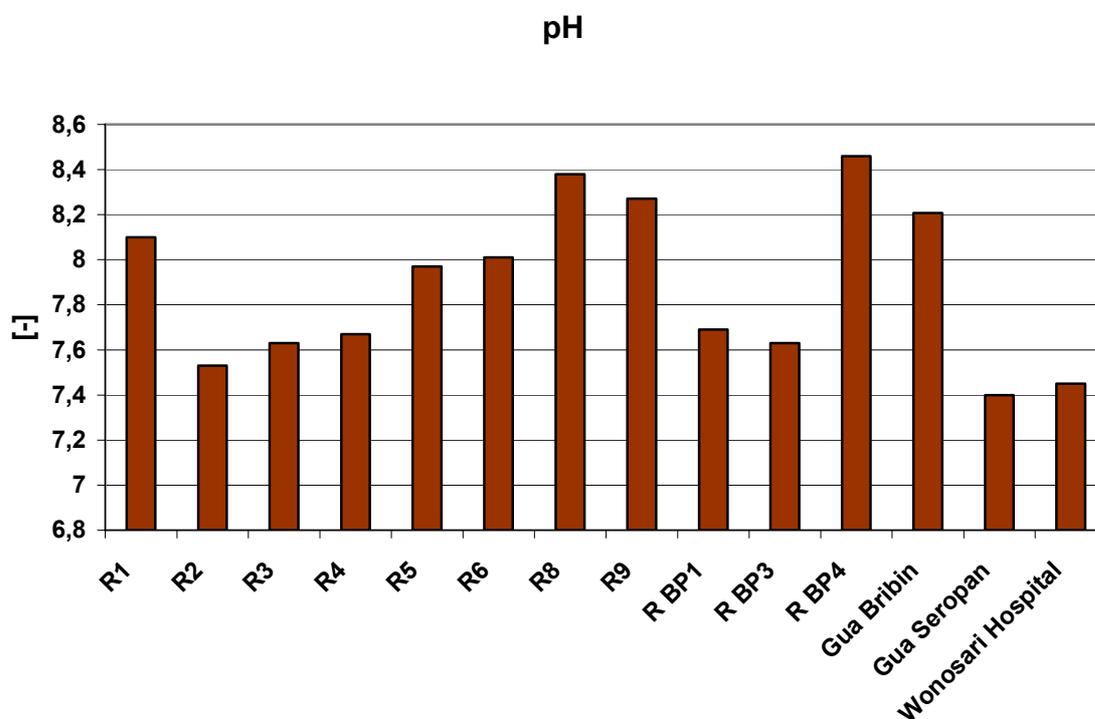


Abbildung 4-3: pH-Werte des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009

Mit Ausnahme des ersten Behälters stieg der pH-Wert im Laufe aller Leitungsabschnitte an. Der Abfall vom Behälter R4 zur Pumpstation R BP3 ist dabei vernachlässigbar gering. Lediglich der pH-Wert im Behälter R8 ist etwas geringer als in der Pumpstation R BP4. Aufgrund der Feldbedingungen unter denen die Messungen durchgeführt wurden, waren Messfehler nicht auszuschließen und eine Interpretation der Ergebnisse war nicht möglich. Auch in den Werten der Messkampagne vom März 2010 war kein bestimmtes Muster erkennbar.

Die Rohrleitungen im Projektgebiet bestehen aus Stahl und teilweise aus Gusseisen, die keinen Einfluss auf den pH-Wert haben. Möglich wäre aber, dass bei der Verarbeitung zusätzlich Zement verarbeitet wurde, das zu einem Anstieg des pH-Wertes innerhalb des Leitungssystems führen könnte.

4.1.1.3 Trübung

Die Trübung des im Oktober beprobten Wassers ist in der unten stehenden Abbildung 4-4 dargestellt. Mit Trübungswerten zwischen 0,35 NTU im Behälter R8 und 2,25 NTU im Behälter R9 enthielt das Wasser offensichtlich keine hohen Trübstoffanteile.

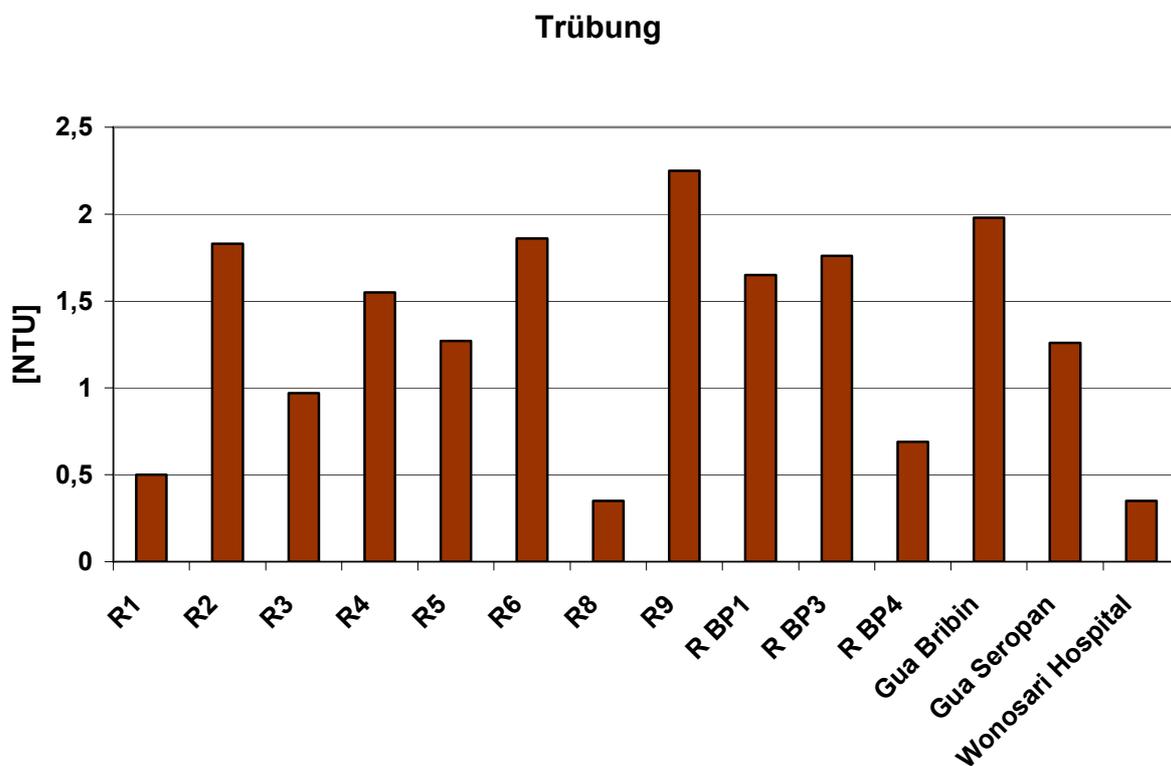


Abbildung 4-4: Trübung des Wassers im Leitungsnetz Bribin, Oktober 2009

Beim Vergleich dieser Trübungswerte mit den Werten für die coliforme Belastung des Wassers (siehe Abbildung 4-5) ließ sich kein genereller Zusammenhang zwischen Trübung und coliformer Belastung entdecken. Besonders auffällig waren hier die Behälter R1 und R8, sowie die Pumpstation R BP4, in denen die Trübung relativ gering war im Vergleich zu den anderen Messstellen, während die Werte für die coliforme

Belastung besonders hoch waren. Zur Zeit der Messungen waren sowohl die Pumpe am Behälter R1, als auch die Pumpstation R BP4 defekt. Dadurch stand das Wasser im Behälter R1, in der Pumpstation R BP4 und somit auch im Behälter R8 still. Dies könnte ein Absinken von Schwebstoffen bewirkt haben, wodurch der Trübungsgehalt reduziert wurde.

In anderen Fällen, wie beispielsweise dem Behälter R9, war die Trübung bei hoher coliformer Belastung ebenfalls hoch. Dies entsprach eher den Erwartungen, da ein hoher Trübstoffgehalt zu höheren Keimzahlen führt.

Die Chlorung und UV-Desinfektion werden erst ab 5 NTU maßgeblich beeinträchtigt, die Langsamsandfiltration sogar erst bei 30 NTU. Bei fünf Probenahmestellen lag der Wert während der Messungen in der Trockenzeit unter 1 NTU und damit im optimalen Bereich für die Chlorung. (siehe Kapitel 3.1) Lediglich die Keramikfiltration könnte aufgrund der sehr geringen Porenweiten nennenswert durch die gemessenen Trübungen beeinträchtigt werden. Die im Rahmen eines monatlichen Monitorings durchgeführten Messungen zeigen jedoch Trübungswerte von über 7 NTU für die Gua Seropan (Tabelle 9-8) im Dezember 2009 und für die Gua Bribin (Tabelle 9-7) im Februar 2010. Damit wäre nur noch die Langsamsandfiltration ohne eine vorherige Behandlung zur Trübungsentfernung durchführbar. Diese hohen Werte sind auf den Beginn der Regenzeit im Projektgebiet, und den mit ihr einhergehenden Eintrag von Trübstoffen in das Grundwasser, zurückzuführen.

4.1.2 Mikro- und molekularbiologische Analyse

4.1.2.1 Kulturverfahren

Quantitativer Nachweis coliformer Bakterien und E.coli

In Deutschland schreibt die Trinkwasserverordnung eine Analyse des Wassers auf coliforme Bakterien und *E.coli*, auf Enterokokken und auf *Pseudomonas aeruginosa* vor. Diese Analyse soll mit Hilfe von Kulturverfahren erfolgen (Trinkwasserverordnung, 2001). In Anlehnung an diese Vorschriften wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung des Wassers auf coliforme Bakterien und *E.coli* durchgeführt.

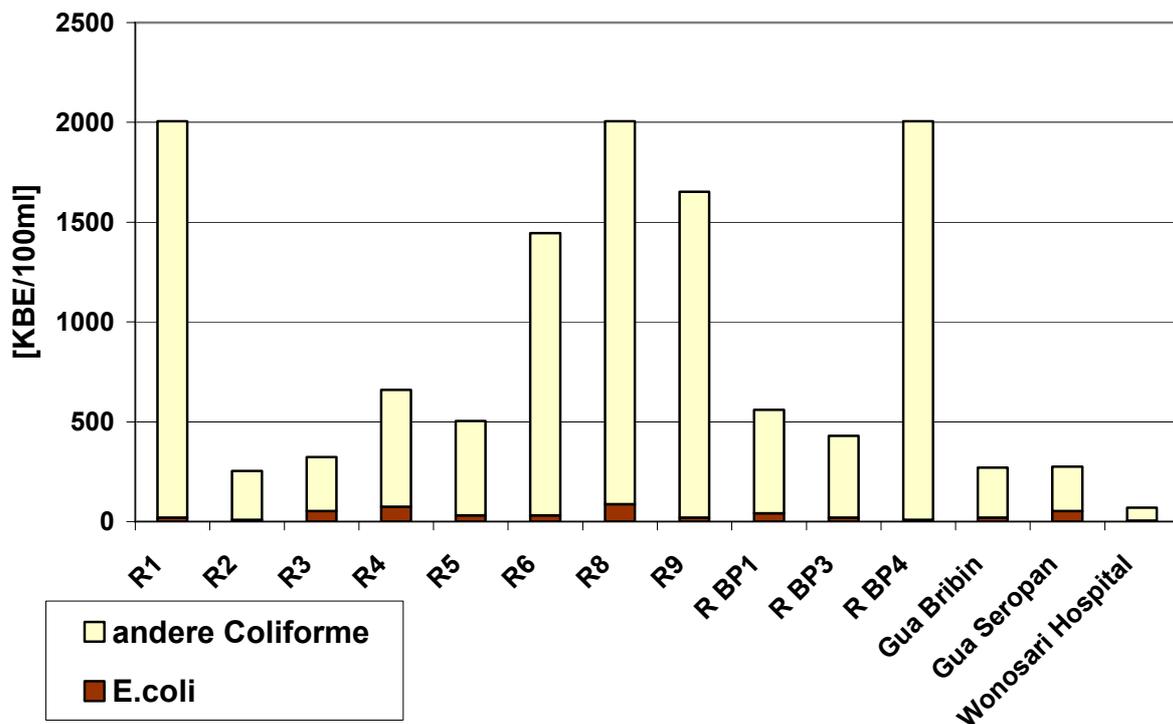


Abbildung 4-5: E.coli und Coliforme im Wasser des Leitungssystems Bribin, Oktober 2009

In Abbildung 4-5 wurden die Ergebnisse der ColiLert-Analyse der Wasserproben aufgetragen. *Escherichia coli* wurde dabei in braun gekennzeichnet, die anderen Coliformen in gelb. Generell waren alle Probenahmestellen mit coliformen Bakterien und *E.coli* belastet. Die Keimzahl für die Gesamtciliformen (*E.coli* + andere Coliforme)

reichte dabei von 69,7 KBE/100ml bis zur oberen Nachweisgrenze von 2005 KBE/100 ml. So konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch die coliforme Keimzahl der Behälter R1, R8 und der Pumpstation R BP4 tatsächlich war.

Bei einer Zuordnung der Werte zum Plan des Leitungsnetzwerkes (Abbildung 4-6) fiel auf, dass die coliforme Belastung im Verlauf der Leitungen anstieg. Eine Ausnahme bildete der Behälter R1, in dem die coliforme Belastung sehr hoch war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Pumpe an dem Behälter zur Zeit der Beprobung seit längerem ausgefallen war und das Wasser so schon länger still stand.

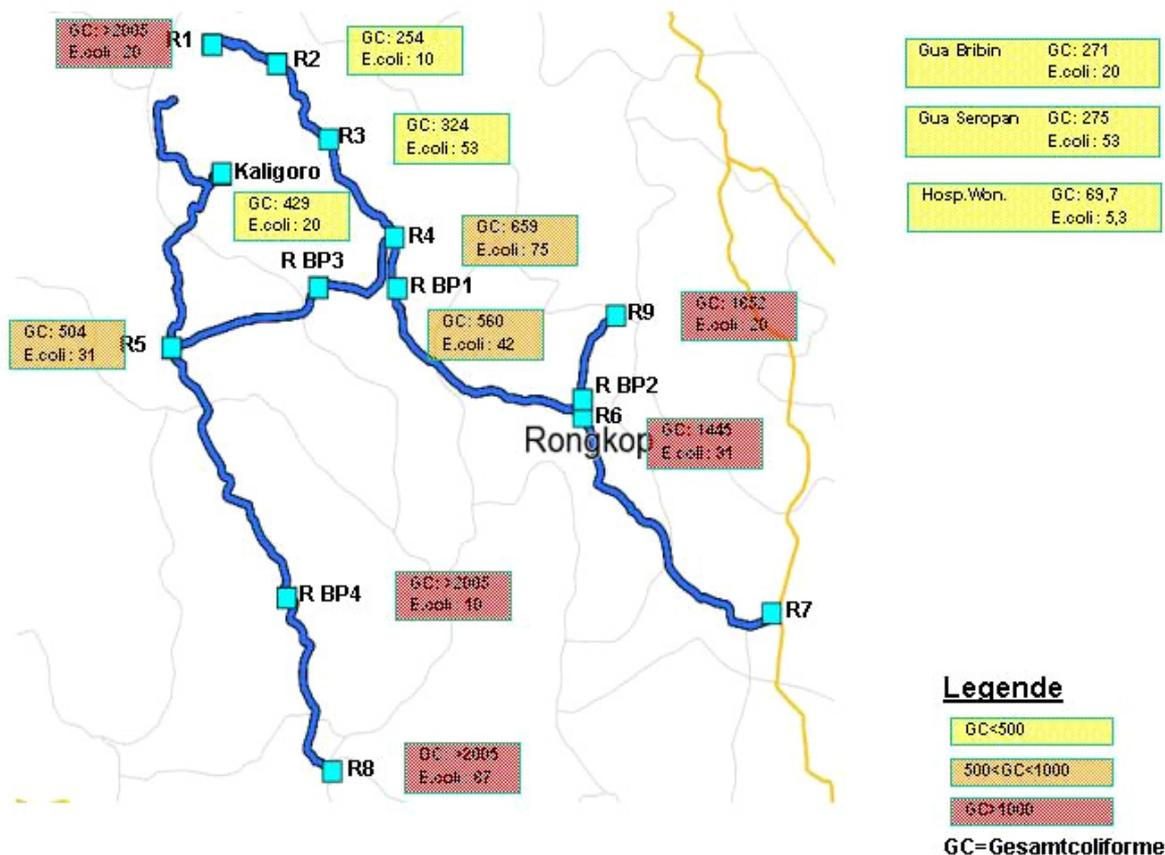


Abbildung 4-6: räumliche Verteilung der coliformen Keimzahlen, Oktober 2009

In der Abbildung 4-6 wurden den Behältern Kästchen mit den Keimzahlen für Gesamtcoliforme und *Escherichia coli* zugeordnet. Gelb unterlegt sind dabei Keimzahlen unter

500 KBE/100 ml, orange zwischen 500 und 1000 KBE/100 ml und rot unterlegt sind Keimzahlen über 1000 KBE/100 ml.

Der Übergang von gelb über orange zu rot an den Enden der Leitungen ist in Abbildung 4-6 deutlich erkennbar. Gründe für das Wachstum der coliformen Belastung innerhalb des Leitungsnetzwerkes sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die zum Teil maroden Leitungen und die hohe Temperatur in den zum größten Teil oberirdisch verlaufenden Rohrleitungen. Hinzu kommt, dass es im Gegensatz zu Deutschland keinen kontinuierlichen Durchfluss gibt und die Leitungsabschnitte im Anschluss an den Behälter R4 weniger oft beschickt wurden als der Abschnitt von der Höhle bis zum Behälter R4.

Die Belastung an der Pumpstation R BP4 und im Behälter R8 waren besonders hoch, da die Pumpe R BP4 zur Zeit der Beprobung defekt war und der Behälter R8 somit nicht beschickt werden konnte. Das stillstehende Wasser wurde somit nicht durch frisches verdünnt und die Keimzahl stieg ungehindert an.

Hervorzuheben ist jedoch, dass bereits das Wasser in den Höhlen *E.coli* und andere coliforme Bakterien enthielt und das Wasser somit schon vor der Passage der Leitung weder der deutschen noch der indonesischen Trinkwasserverordnung entsprach.

Die Probenahme im März 2010 zeigte deutlich höhere coliforme Keimzahlen und *E.coli*-Werte, was auf die hohen Einträge in der Regenzeit zurückzuführen ist. Eine Zuordnung der Werte zum Leitungssystem (siehe Abbildung 9-5 und Abbildung 9-6) veranschaulicht, dass die Keimzahlen im Gegensatz zu den Ergebnissen vom Oktober 2009 im Verlauf des Leitungssystems abnehmen. Das gleiche gilt für die zusätzlich bestimmte Enterokokken-Keimzahl (siehe Abbildung 9-7). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es in der Regenzeit eine Art „Spülung“ des Leitungssystems gab. Möglich wäre aber auch, dass durch die unregelmäßige Beschickung der Leitungszweige, das Wasser mit den sehr hohen Keimzahlen der ersten Behälter noch nicht in die hinteren Behälter vorgedrungen war. In jedem Fall war der Behälter R1, an dem die Pumpe häufig ausfiel, stets die mit Abstand am höchsten kontaminierte Probenahmestelle in allen Untersuchungen. Da das gesamte Wasser des Leitungssystems diesen Behälter durchlaufen musste, stellte er eine bedeutende Quelle für Kontaminationen dar.

Kultivierung und DNA-Isolierung

In Anlehnung an die deutsche Trinkwasserverordnung, die eine Bestimmung der Gesamtkeimzahl bei 20 °C und 37 °C vorschreibt (Trinkwasserverordnung, 2001), wurden einzelne Wasserproben auf R2A-Agar ausgestrichen und für 24 Stunden bei 20 und 37 °C bebrütet. Dies geschah jedoch erst nach der Ankunft in Deutschland, wodurch nur ein eingeschränkter Eindruck über die mikrobielle Belastung gegeben werden sollte.

Die Kultivierung bei 20 °C und 37 °C auf dem R2A-Agar ergab auf jeder Platte sehr viele Kolonien in verschiedenen Farben und Formen. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Keimzahlen überstiegen jedoch 10.000 KBE/ml.

Für den Nachweis der coliformen Bakterien wurden die mitgebrachten Flüssigproben auf Chromocult-Agar-Platten ausgestrichen. Von den 17 ausgestrichenen Proben waren 7 positiv für Coliforme und eine positiv für *E.coli*.

Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Coliformen und *E.coli* mit Hilfe von Coli ID-Agar-Platten. So konnten jedoch nur 2 coliforme Kolonien nachgewiesen werden.

Auf den CoccoSel-Agar-Platten, die das Vorhandensein von Enterokokken anzeigen sollten, wuchsen keine Kolonien. Somit konnten aus den Wasserproben keine Enterokokken kultiviert werden.

Durch die lange Lagerung der Proben und den Transport nach Deutschland vor der Analyse wurden die Ergebnisse maßgeblich beeinflusst. Vermutlich sind die Bakterien während dieser Zeit zum Teil abgestorben oder unkultivierbar geworden. Zwei Gründe hierfür könnten der Nährstoffmangel und die Temperaturschwankungen gewesen sein.

Aus zwei violetten Kolonien, bei denen es sich laut Hersteller um *E.coli* handeln sollte, konnten 115 ng/µl und 66 ng/µl DNA isoliert werden.

4.1.2.2 Spezies-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion

Neben den beschriebenen mikrobiologischen Kultivierungsverfahren wurden die Proben mittels molekularbiologischer Methoden auf Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen untersucht. Zunächst wurden mit Hilfe von Polymerasekettenreaktionen verschiedene spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, die im Anschluss in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt wurden.

Die PCR mit den Universalprimern 27f und 517r (siehe Abbildung 4-7) zeigte im Agarosegel Banden für alle Proben. Da die Zielsequenz dieser Primer die eubakterielle 16S rDNA war, kann man daraus schließen, dass in jeder Probe Eubakterien vorhanden waren.

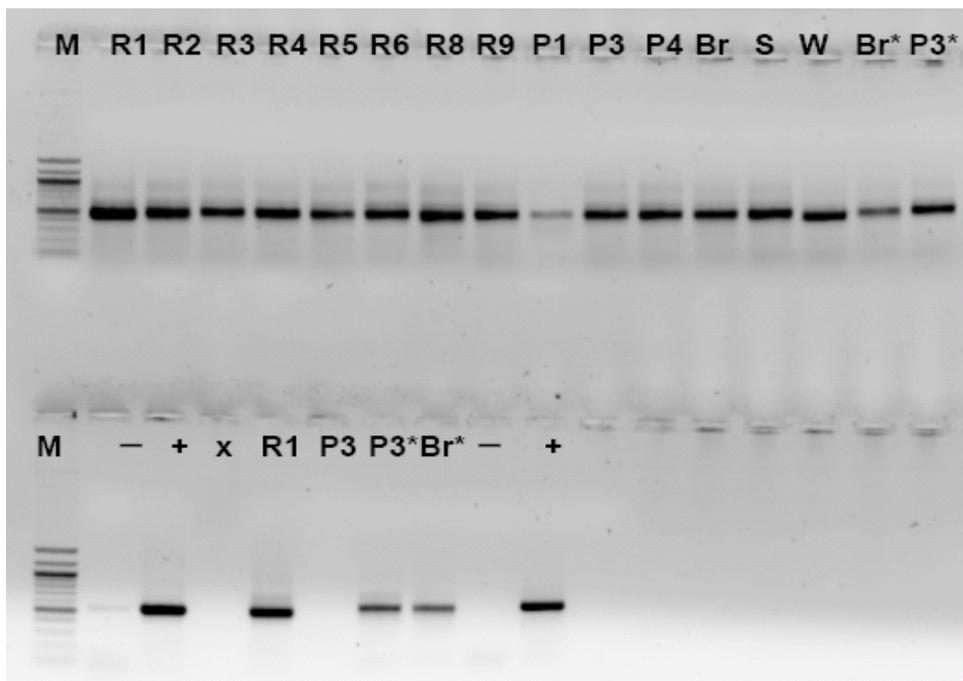


Abbildung 4-7: PCR mit Universalprimern

M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan, W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle, bei mit* gekennzeichneten Proben wurden 360 ml statt 100 ml filtriert

Wie in Abbildung 4-8 erkennbar, gab es mit dem *E.coli*-spezifischen Primerpaar ECOuidAF/ ECOuidAR keine Banden für die Filterproben. In den Filterproben konnte demzufolge mit dieser Methode kein *E.coli* nachgewiesen werden, obwohl mit Hilfe der

ColiLert-Analysen (siehe Kapitel 2.4.3.1) bereits *E.coli* und coliforme Bakterien gefunden wurden. Ein Grund dafür, dass keine *E.coli*-DNA amplifiziert wurde, könnte die sehr geringe Konzentration der Bakterien auf dem Filter sein. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es nicht gelungen ist, die *E.coli*-Bakterien vom Filter zu lösen. Eventuell konnten die *E.coli*-Zellen mit dem Gefrier-Tau-Verfahren gar nicht zerstört werden, so dass die DNA nicht frei vorlag. Des weiteren könnte die DNA am Filter gebunden sein, da der Filter erst nach dem Gefrier-Tau-Verfahren entfernt wurde.

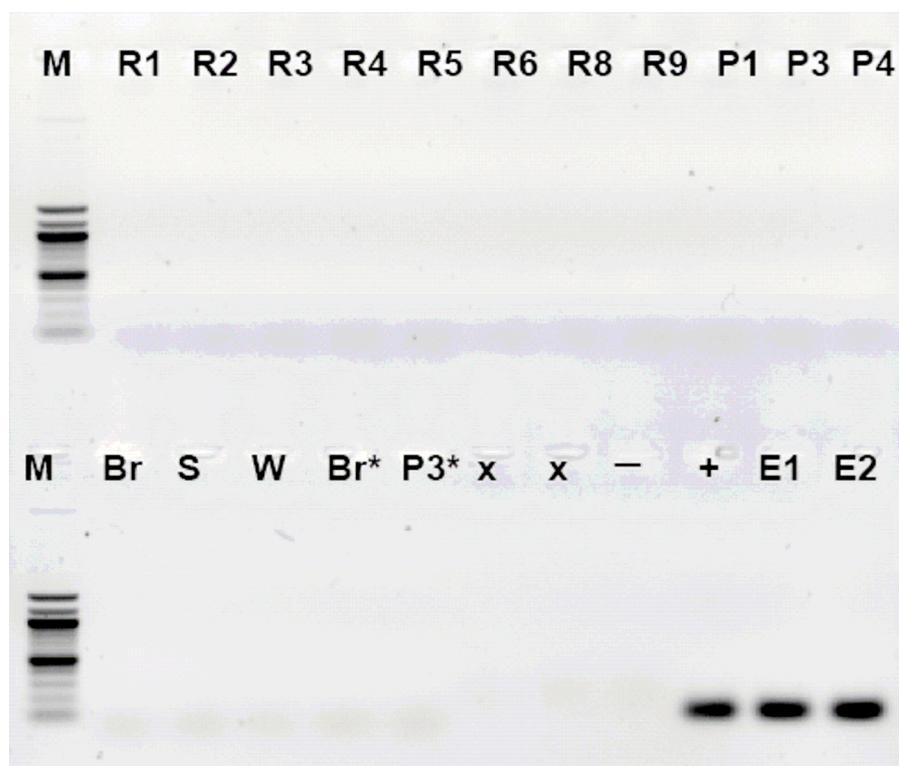


Abbildung 4-8: PCR mit *E.coli*-spezifischen Primern
M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan, W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle, E=isolierte DNA, bei mit gekennzeichneten Proben wurden 360 ml statt 100 ml filtriert

Hingegen zeigte die aus den Kolonien von den Chromocult-Platten isolierte DNA (siehe Kapitel 2.4.3.2) deutliche Banden. In der Abbildung 4-8 sind dies die beiden letzten Banden. Die Vermutung, dass es sich bei den violetten Kulturen, aus denen die DNA isoliert wurde um *E.coli* handelte, konnte somit bestätigt werden.

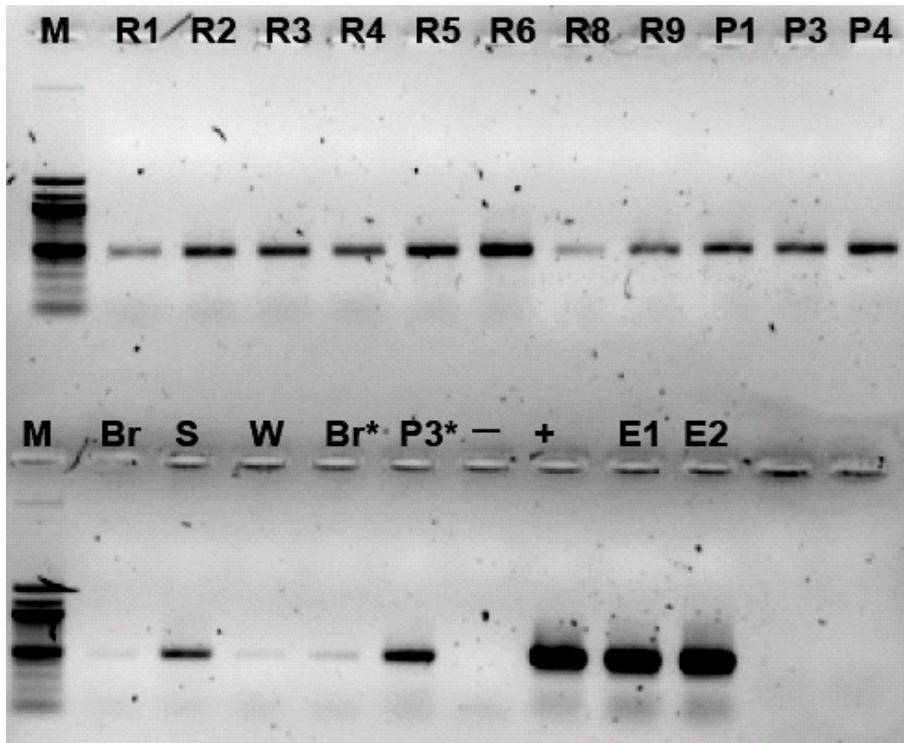


Abbildung 4-9: PCR mit Gamma-Proteobakterien-spezifischen Primern
M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan,
W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle, E=isolierte DNA, bei mit
gekennzeichneten Proben wurden 360 ml statt 100 ml filtriert

Mit Hilfe der Gamma-Proteobakterien-spezifischen PCR konnte in zwei Dritteln der Proben DNA amplifiziert werden (siehe Abbildung 4-9). *E.coli* gehört zu den Gamma-Proteobakterien und da mit der ColiLert-Analyse in allen Proben *E.coli* nachgewiesen werden konnte, wäre auch hier zu erwarten gewesen, dass in allen Proben DNA vorhanden ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass es Probleme bei der *E.coli*-DNA-Isolierung von den Filtern gab.

In vorangegangenen Analysen (Abbildung 9-2) im Rahmen des IWRM-Projekts wurden Proben vom Dezember 2008 und vom Sommer 2009 untersucht. Die Proben wurden analog zu den in dieser Arbeit aufgeführten Methoden aufgearbeitet. Neben den *E.coli*-spezifischen Primern wurden spezifische Primer für weitere Pathogene verwendet. Für keine Probe war mit den verwendeten Primern ein Nachweis der Bakterien möglich. Dies lässt darauf schließen, dass die oben beschriebenen Probleme nicht nur für *E.coli*, sondern auch für andere Pathogene Keime auftraten.

4.1.2.3 Populationsanalyse

Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese

Drei Proben, in denen besonders viele Bakterien erwartet wurden, wurden einer PCR mit den Universalprimern GC27f/517r unterzogen. Anschließend wurden diese PCR-Produkte zusammen mit ebenso ausgewählten Produkten der Gamma-Proteobakterien-PCR mit Hilfe einer DGGE aufgetrennt.

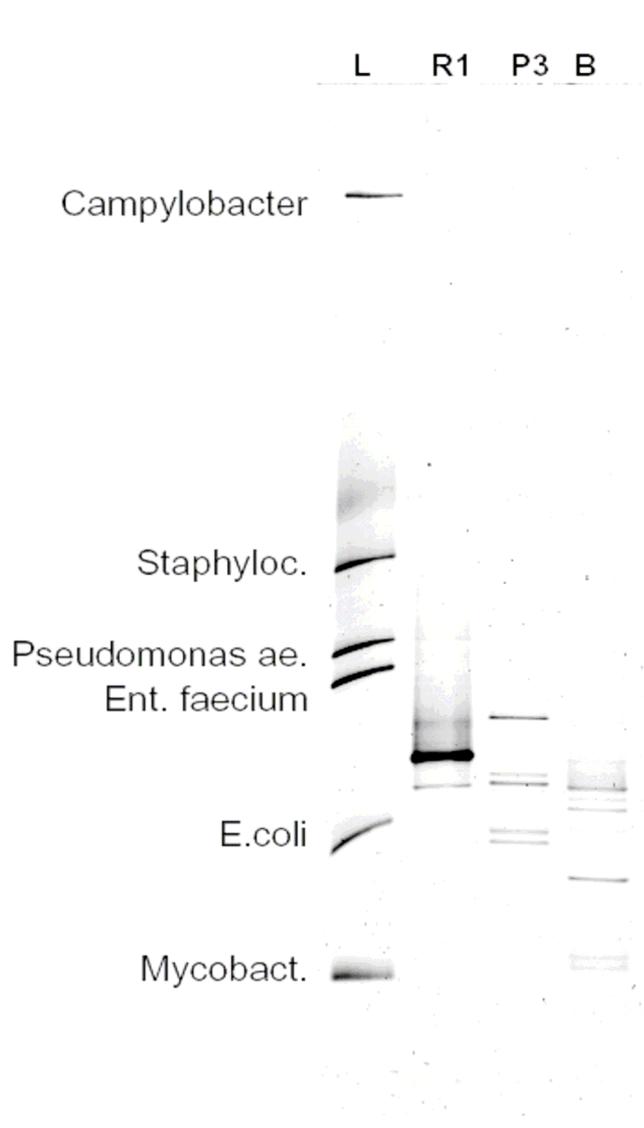


Abbildung 4-10: DGGE der PCR mit GC27f, 517r

In Abbildung 4-10 wurde links eine interne Referenz für verschiedene Bakterienstämme aufgetragen. Die oberste Bande entspricht *Campylobacter jejuni*, dann folgen

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* und *Escherichia coli*. Den Abschluss bildet *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*.

Rechts neben der Leiter wurden Proben aus dem Behälter R1, der Pumpstation R BP3 und der Gua Bribin aufgetragen. Von diesen Proben wurden insgesamt 17 Banden ausgeschnitten. Weitergearbeitet wurde jedoch nur mit vier ausgewählten Banden, die etwa auf der Höhe der *E.coli*-Position (interne Leiter) lagen. Nach einer Reamplifizierung und erneuten Auftragung auf eine DGGE wurden vier Banden geschnitten und sequenziert. Zusätzlich wurde eine entsprechende PCR mit der isolierten DNA durchgeführt. Von der DGGE wurden für dieses PCR- Produkt zwei Banden geschnitten und sequenziert.

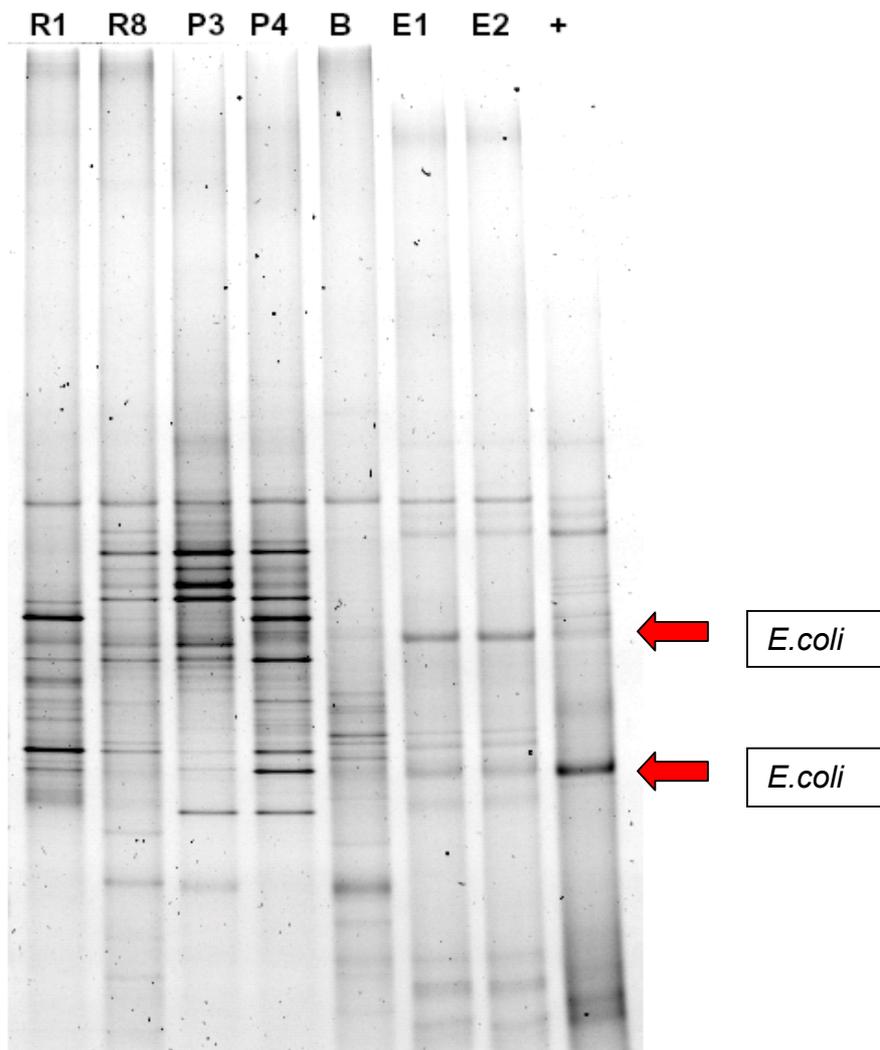


Abbildung 4-11: DGGE der PCR mit 518f, 785r

Das DGGE- Bild (Abbildung 4-11) zeigt die Auftrennung der Produkte der Gamma-Proteobakterien-PCR. Auf der DGGE wurden Proben aus den Behältern R1 und R8, aus den Pumpstationen R BP3 und R BP4 und von der Gua Bribin aufgetragen. Es folgten zwei Proben der isolierten DNA und *E.coli*-DNA als Kontrolle. Insgesamt wurden 35 Banden geschnitten, von denen 21 weiter untersucht wurden. Besonders interessant waren die Banden die sich auf einer Höhe mit den Banden der *E.coli*-DNA befanden (mit roten Pfeilen gekennzeichnet), da es sich hier eventuell um *E.coli* handeln könnte. Die ausgewählten Banden wurden wiederum einer Reamplifizierung und erneuter DGGE unterzogen. Aus dem entstandenen Gel wurden 18 Banden geschnitten und sequenziert, wobei vier Banden aus der isolierten DNA oder der *E.coli*-DNA stammten.

Sequenzierung

Die Sequenzierung der geschnittenen Banden der Wasserproben zeigte, dass es sich bei 8 von 18 sequenzierten Banden um Acinetobacter handelte. Sechs mal konnte Pseudomonas sequenziert werden und bei zwei Banden handelte es sich um Sphingomonas. Legionella und Pseudoxanthomonas konnten je ein Mal nachgewiesen werden. In der folgenden Tabelle sind die Bakterien nach Probenahmestellen aufgeschlüsselt.

Tabelle 4-1: Zuordnung der nachgewiesenen Mikroorganismen zu den Probenahmestellen

Probenahmestelle	Sequenzierte Mikroorganismen
R1	Acinetobacter, Sphingomonas, Pseudomonas
R8	Legionella
R BP3	Acinetobacter, Pseudomonas, Pseudoxanthomonas
R BP4	Acinetobacter, Pseudomonas

Bei den Banden der PCR mit den Universalprimern GC27f und 517r für die isolierte DNA handelte es sich um *E.coli* und Enterobacter. Mit den Gamma-Proteobakterienprimern wurden außerdem noch Klebsiellen, *Kluyvera ascorbata* und ein Endosymbiont des Nilaparvata Lugens (asiatischer Grashüpfer) nachgewiesen.

4.2 Laborversuche zur Konzeptionierung der Pilotanlage

4.2.1 Analyse des Leitungswassers

Die Analyse des Leitungswassers ohne Zusätze ergab nach 96 h kein Wachstum von Kolonien auf dem Lactose-TTC-Agar bei 37 °C. Somit waren im Leitungswasser keine *E.coli* oder andere coliformen Keime vorhanden. Auf den Hefeextrakt-Agar-Platten konnten nach 96 h bei 20 °C weniger als 30 Kolonien gezählt werden. Bei 37 °C waren es 20 Kolonien. Damit lag die Gesamtkeimzahl in beiden Fällen deutlich unter dem zugelassenen Grenzwert. Das Wasser entsprach den Anforderungen der deutschen Trinkwasserverordnung.

4.2.2 Chlorung

4.2.2.1 Versuche mit *Escherichia coli*

Die Auszählung der Platten ergab, dass die Ansätze jeweils 10^6 KBE/l *E.coli* enthielten.

In Abbildung 4-12 ist die Chlorzehrung über der Kaporitdosierung aufgetragen, die sich aus der Menge des zugegebenen freien Chlors und des nach 30 min vorhandenen freien Chlors ergab. Deutlich erkennbar ist, dass die Chlorzehrung mit steigender Zugabe an freiem Chlor höher wird. Bei einer Zugabe von 1 mg/l Kaporit war die Chlorzehrung kaum erkennbar, während bei einer Zugabe von 30 mg/l Kaporit auch eine hohe Chlorzehrung von circa 10 mg/l zu verzeichnen war. Bei einem Vergleich der Chlorzehrung bei unterschiedlichen Trübstoffgehalten war nur ein geringer Unterschied erkennbar, der jedoch aufgrund der Ungenauigkeit der Methode nicht interpretiert werden kann.

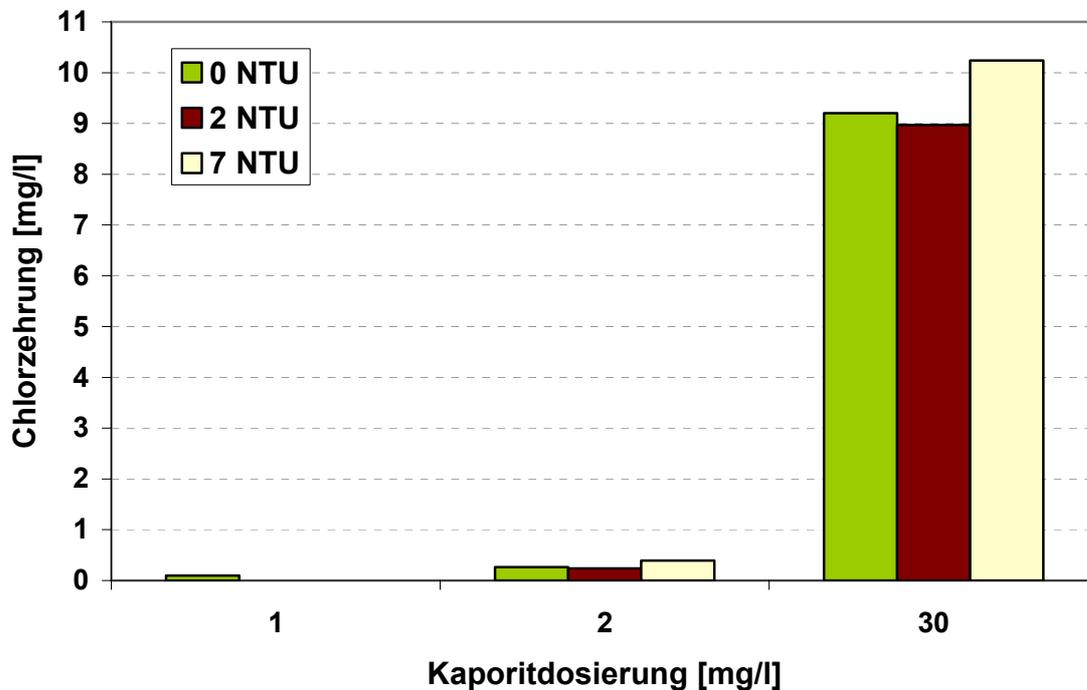


Abbildung 4-12: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit *Escherichia coli*

Nach der Behandlung mit Chlor konnte bei den Proben kein Wachstum auf Agar festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass schon die Desinfektionsleistung der geringen Chlordosierung von 1 mg/l ausreichend war.

Zusätzlich wurde eine PCR mit *E.coli*-spezifischen Primern durchgeführt. Diese war jedoch auch für den unbehandelten Kontrollansatz negativ und kann nicht ausgewertet werden. Vermutlich gab es hier dieselben Komplikationen wie bei der PCR der Monitoring-Proben (siehe Kapitel 4.1.2.2). Die Vermutung, dass die *E.coli*-Bakterien nicht vom Filter gelöst werden konnten, oder das Gefrier-Tau-Verfahren ungünstig für den Aufschluss der Zellen war, liegt nahe.

4.2.2.2 Versuche mit *Enterococcus faecium*

Die Ansätze für die Versuche mit *Enterococcus faecium* enthielten $2 \cdot 10^5$ KBE/l, also fast um eine Zehnerpotenz weniger als bei den *E. coli*- Versuchen. So war es nicht verwunderlich, dass die in Abbildung 4-13 dargestellte Chlorzehrung bei allen Ansätzen geringer war als bei den Versuchen mit *Escherichia coli*. Mit steigender Kaporitdosierung nahm auch hier die Chlorzehrung zu. Ebenso nahm die Chlorzehrung mit steigenden Trübstoffgehalten zu. Eine Ausnahme bildete hier der Ansatz mit 2 NTU und 30 mg/l Kaporit, der eine höhere Chlorzehrung aufwies als der Ansatz mit 7 NTU. Dies ist vermutlich auf einen Messfehler zurückzuführen.

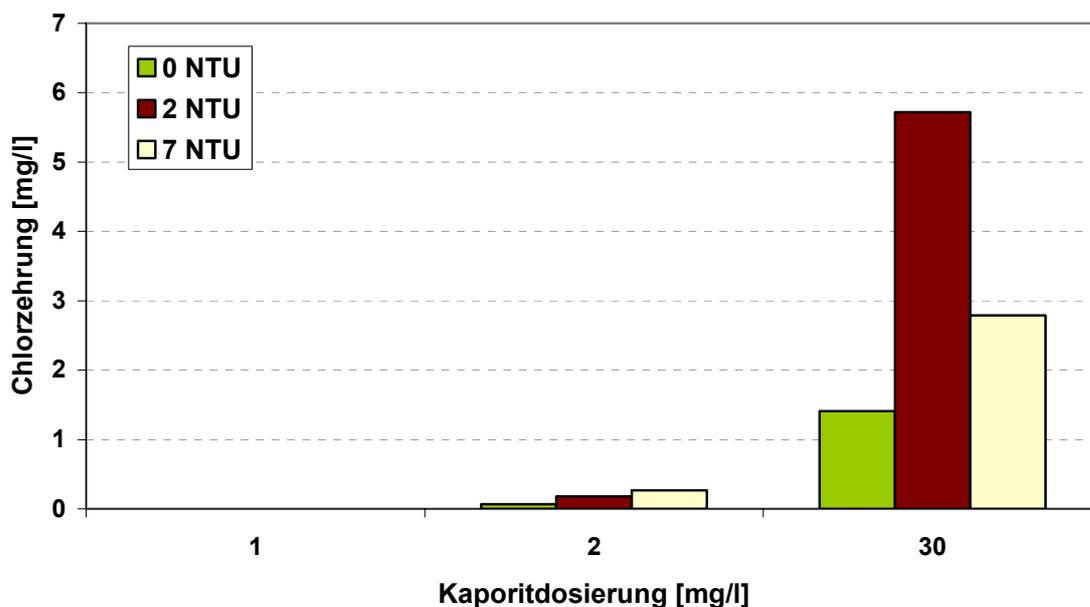


Abbildung 4-13: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit *Enterococcus faecium*

Bei Betrachtung der Agarplatten nach der Inkubationszeit, ließ sich auch nach 72 h nur auf der Kontrollplatte mit der unbehandelten Probe ein Wachstum feststellen. Die Kaporitdosierung von 2 mg/l schien somit ausreichend zu sein, um eine Abtötung der Bakterien zu erreichen.

Die zusätzlich durchgeführte PCR, war nur für die Kontrollprobe positiv. Die DNA der Enterokokken sollte nach der Chlorung jedoch eigentlich noch vorhanden sein, so dass

die Vermutung nahe liegt, dass bereits geringe Mengen an Chlor in der PCR stören. Eine Entfernung oder Neutralisierung des Chlors vor der Durchführung der PCR könnte diesem Effekt eventuell entgegen wirken, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4.2.2.3 Versuche mit *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Versuche mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden dem Leitungswasser jeweils $6 \cdot 10^5$ KBE/l zugesetzt. Abbildung 4-14 zeigt die Chlorzehrung der Versuche mit *Pseudomonas aeruginosa*. Sie stieg wiederum mit steigender Kaporitdosierung bei gleicher Trübung an. Zwischen den einzelnen Trübungsstufen ist bei gleicher Kaporitdosierung kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Eine Ausnahme bildet der Ansatz mit 2 NTU und 30 mg/l Kaporit. Bei diesem Ansatz war die Chlorzehrung im Vergleich zu den Proben mit gleicher Kaporitdosierung und anderen Trübstoffgehalten doppelt so hoch. Vermutlich handelt es sich hier um einen Messfehler oder einen Fehler in der Durchführung des Versuchs (höhere Bakterienkonzentration, geringere Chlordosierung, etc.).

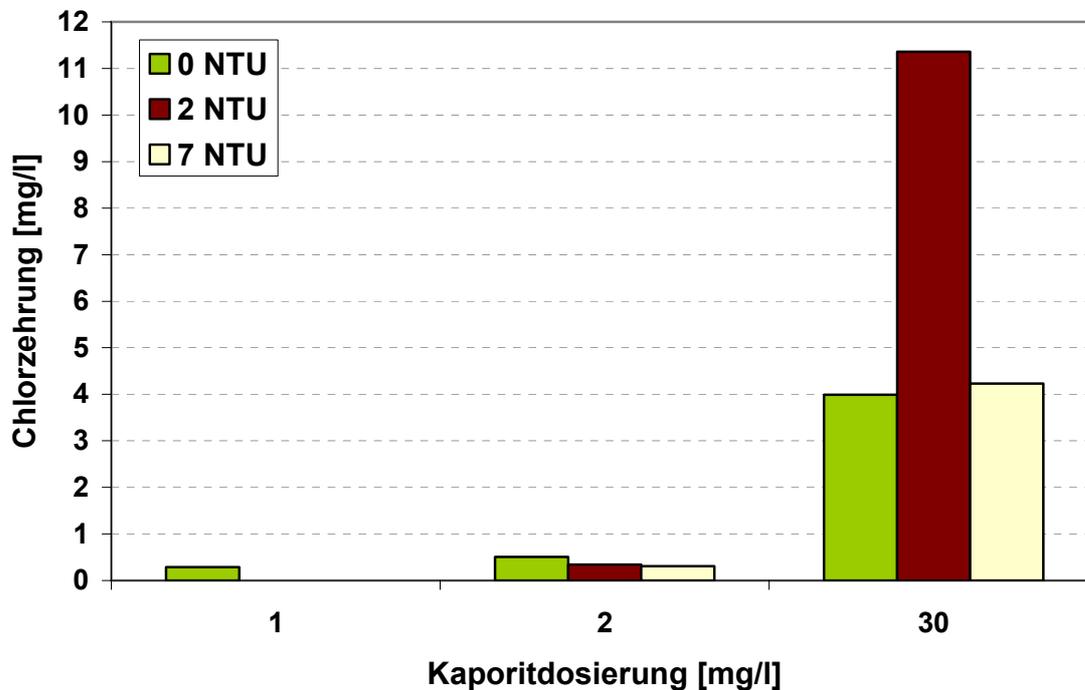


Abbildung 4-14: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit *Pseudomonas aeruginosa*

Die gechlorten Ansätze wiesen kein Wachstum auf. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesen Versuchen schon eine Kaporitdosierung von 1 mg/l ausreichend war, um eine vollständige Desinfektion zu erreichen.

Zusätzlich zu den Kultivierungsversuchen wurde eine PCR mit *Pseudomonas aeruginosa*-spezifischen Primern durchgeführt, die jedoch auch für die unbehandelten Kontrollproben negativ war, so dass keine Aussage über das Vorhandensein von *Pseudomonas*-DNA getroffen werden konnte. Neben den Proben und einer Positivkontrolle wurde auch eine Positivkontrolle untersucht, die mit unbehandelter Probe versetzt wurde. Die Mengen der eingesetzten DNA der Positivkontrolle waren hierbei gleich groß, so dass die Banden gleich stark sein sollten. Die Bande der Positivkontrolle mit Probenzusatz war jedoch schwächer, so dass möglicherweise eine PCR-Inhibition vorlag. Weitere Ansätze mit verschiedenen Verdünnungen der Proben waren jedoch auch negativ. Weitere Versuche zur Optimierung der PCR waren im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

4.2.2.4 Versuche mit *Campylobacter jejuni*

Die *Campylobacter*- Ansätze enthielten $2 \cdot 10^6$ KBE/l. Wie in Abbildung 4-15 erkennbar ist, war die Chlorzehrung bei den Versuchen mit *Campylobacter jejuni* relativ hoch. Bei Zugabe von 2 mg/l Kaporit, wurde das freie Chlor (1,2 mg/l) zu circa 90 % „verbraucht“. Wenn 30 mg/l Kaporit zugegeben wurden, was 18 mg/l freiem Chlor entspricht, konnte eine Chlorzehrung von durchschnittlich 87 % verzeichnet werden. Ein Unterschied im Vergleich der Ansätze mit verschiedenen Trübungen bei gleicher Chlordosierung war praktisch nicht existent. So lag die Chlorzehrung bei einer Zusatzmessung mit 30 NTU und 30 mg/l Kaporit (nicht in Abbildung 4-15 aufgeführt) ebenfalls bei 87,6 % (10,1 mg/l).

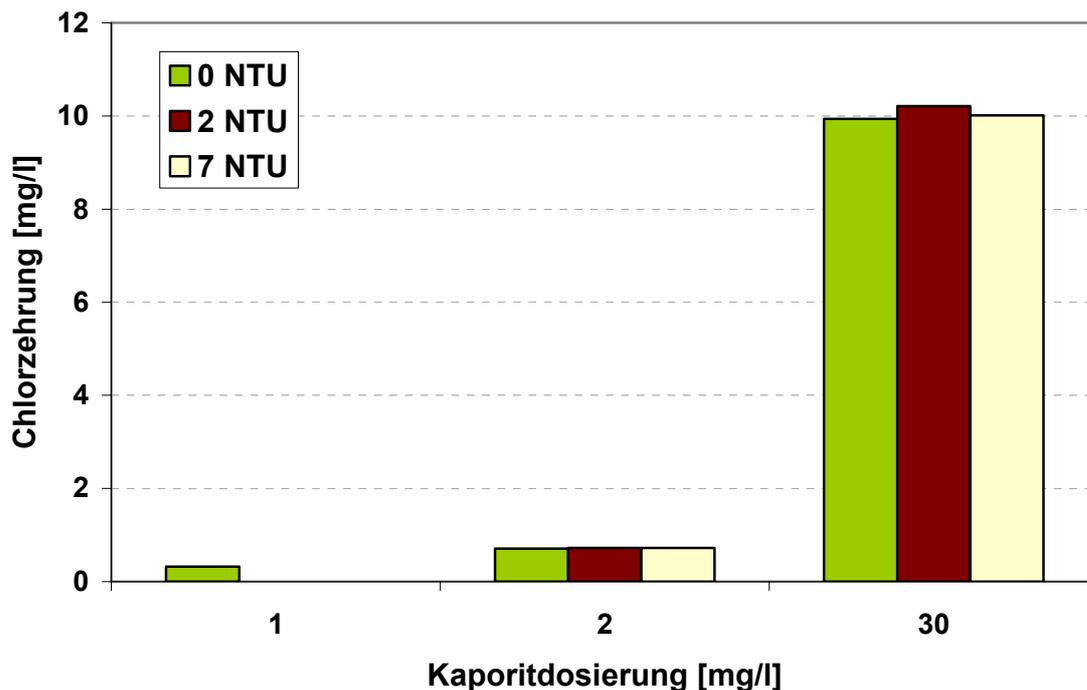


Abbildung 4-15: Chlorzehrung der Versuche mit *Campylobacter jejuni*

Neben der unbehandelten Kontrollprobe konnte auch bei den Proben der Ansätze mit einer Zudosierung von 1 und 2 mg/l freiem Chlor bei einer Trübung von 0 NTU ein Wachstum festgestellt werden. Die Kaporitdosierung von 1 bzw. 2 mg/l war anscheinend nicht ausreichend, um die Bakterien vollständig abzutöten.



Abbildung 4-16: PCR mit *Campylobacter jejuni*- spezifischen Primern

Eine zusätzlich durchgeführte PCR mit *Campylobacter jejuni*-spezifischen Primern war für jede Probe, mit Ausnahme der Ansätze mit einer Kaporitdosierung von 30 mg/l bei Trübungen von 2 NTU, 7 NTU und 30 NTU positiv. Bemerkenswert war hier das Auftreten der Bande bei 0 NTU und 30 mg/l, also gleicher Kaporitdosierung, aber ohne Trübstoffzusätze.

Bei Betrachtung der Banden der PCR fällt außerdem auf, dass die Bandendicke bei einer Dosierung von 2 mg/l Kaporit sichtlich dünner erscheinen als die Kontrolle oder die Probe mit 1 mg/l Kaporit. Dagegen ist kein Unterschied in der Bandendicke zwischen der Kontrolle und dem Ansatz mit 1 mg/l Kaporit erkennbar.

Für eine Interpretation dieser Ergebnisse sei noch einmal erwähnt, dass eine Filtration der Ansätze kaum möglich war und deshalb nur 100 ml im Gegensatz zu 1900 ml bei den anderen Versuchen filtriert wurden. Bei den Ansätzen mit 0 NTU und 30 mg/l Kaporit, 2 NTU und 30 mg/l Kaporit und 7 NTU und 30 mg/l Kaporit wurden je 500 ml filtriert. Der Vergleich der PCR-Ergebnisse dieser drei Proben zeigt, dass bei gleicher Kaporitdosierung offenbar auch die Trübstoffzusätze die PCR hemmen, da nur die Probe ohne Trübstoffzusatz ein PCR-Produkt besaß.

Bei einer Zudosierung von 30 mg/l Kaporit und einer Trübung von 30 NTU gab es auch bei 100 ml filtriertem Wasser kein PCR- Produkt. Die PCR-Hemmung schien hier sehr stark zu sein. Der Vergleich der Ansätze mit 2 mg/l Kaporit und 2 bzw. 7 NTU zeigte keinen Unterschied, während die Bande für 1 mg/l Kaporit bei 0 NTU sehr viel stärker war als die Bande für 2 mg/l Kaporit bei gleicher Trübung. Der PCR-hemmende Einfluss der Kaporitdosierung scheint somit höher zu sein als der Einfluss der Trübstoffmenge.

Die Tatsache, dass nur bei den Versuchen mit *Campylobacter jejuni* PCR-Produkte für die gechlorten Proben auftraten, ist durch die viel geringere Menge an filtrierten Wasser zu erklären. Durch die geringere Wassermenge war auch die Kaporitkonzentration geringer und damit die Störung bei der PCR.

4.2.2.5 Versuche mit *Shigella flexneri*

Shigella flexneri wurde den Leitungswasseransätzen in einer Menge von $5,5 \cdot 10^5$ KBE/l zudosiert. Abbildung 4-17 zeigt die Chlorzehrung der Versuchsansätze mit diesem Bakterium. Allgemein betrachtet war die Chlorzehrung bei diesen Versuchen relativ gering. Wieder ist deutlich erkennbar, dass die Zehrung mit Zugabe von höheren Kaporitkonzentrationen zunahm. Bei dieser Versuchsreihe ist außerdem deutlich, dass dieser „Chlorverbrauch“ auch mit steigender Trübung zunahm. Dies ist dadurch zu erklären, dass das freie Chlor sehr reaktiv ist und auch mit Trübstoffen reagiert und so nicht mehr zur Desinfektion beitragen kann.

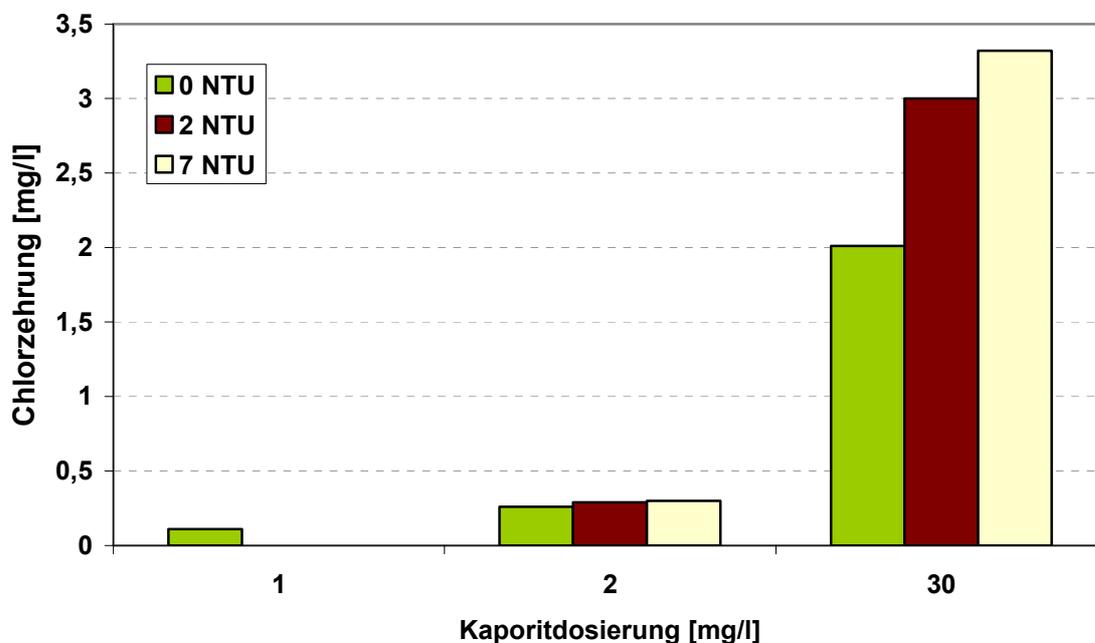


Abbildung 4-17: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit *Shigella flexneri*

Bei Betrachtung der Agarplatten nach der Inkubation ist bei den Proben der gechlorten Ansätze dennoch kein Wachstum zu beobachten. Die Dosierung von 1 mg/l bei 0 NTU schien hier schon ausreichend, um eine Desinfektion zu erreichen.

Die PCR mit *Shigella flexneri*-spezifischen Primern war mit Ausnahme der unbehandelte Kontrollprobe für alle Proben negativ. Dies bestätigt die Vermutung, dass das Kaporit schon bei der PCR stört.

4.2.2.6 Versuche mit *Vibrio vulnificus*

Die Ansätze für die Versuche mit *Vibrio vulnificus* enthielten $7 \cdot 10^6$ KBE/l. Obwohl in dieser Versuchsreihe die höchsten Keimzahlen zugesetzt wurden, war die in Abbildung 4-18 dargestellte Chlorzehrung im Vergleich zu den Versuchsreihen mit anderen Bakterien am geringsten. Ein Unterschied in der Chlorzehrung zwischen 1 mg/l und 2 mg/l Kaporitdosierung bei gleicher Trübung konnte nicht festgestellt werden. Auch die Schwankungen der Chlorzehrung zwischen den Ansätzen mit unterschiedlichen Trübungen und 2 mg/l Kaporit waren nicht nennenswert. Dieser Unterschied war bei einer Dosierung von 30 mg/l Kaporit deutlicher sichtbar. Hier nahm die Chlorzehrung bei steigendem Trübstoffgehalt zu. Bei der hohen Kaporitdosierung von 30 mg/l wurde mit Ausnahme des Ansatzes mit 0 NTU mehr Chlor „verbraucht“ als bei 2 mg/l Kaporitdosierung. Bei der niedrigen Chlorzehrung des Ansatzes mit 0 NTU und 30 mg/L Kaporit könnte es sich auch um einen Messfehler handeln.

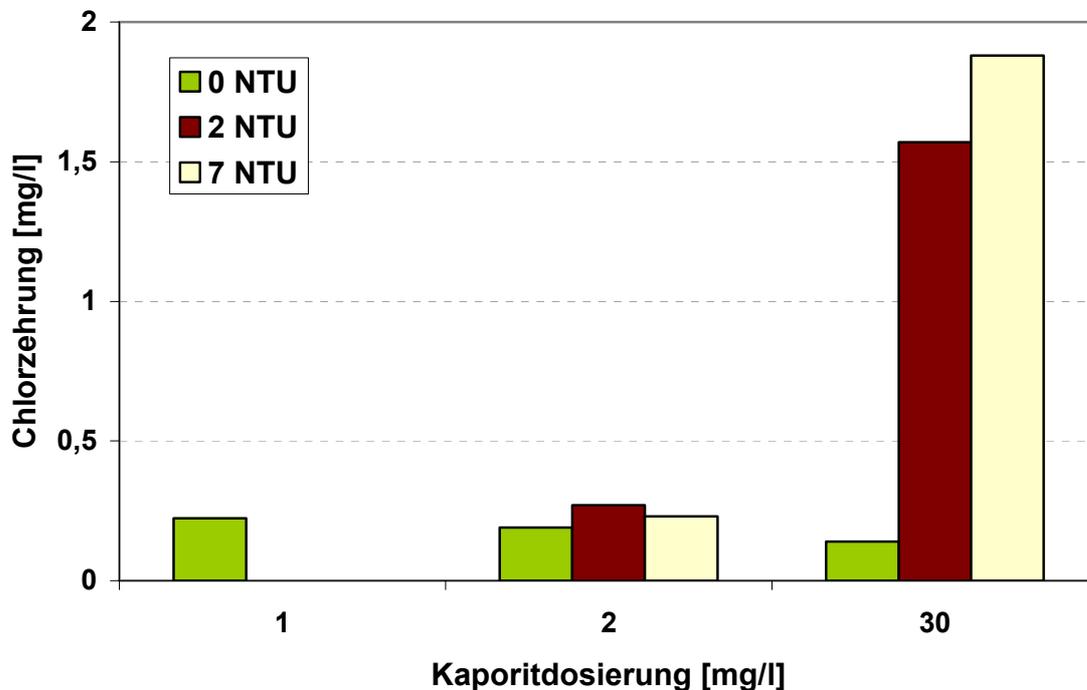


Abbildung 4-18: Chlorzehrung der Versuchsansätze mit *Vibrio vulnificus*

Bei einer Zudosierung von 1 mg/l freiem Chlor war auf der ASW-Agar-Platte ein Wachstum zu beobachten. Andere gechlorte Proben wiesen kein Wachstum auf. Somit schien eine Kaporitdosierung von mindestens 2 mg/l erforderlich zu sein, um die Bakterien vollständig abzutöten.

Die PCR für *Vibrio vulnificus* bedarf noch einer Optimierung. Wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben, wurde zunächst eine PCR mit Universalprimern durchgeführt. Diese war nur für die unbehandelte Probe und die Probe des Ansatzes mit 0 NTU und 1 mg/l Kaporit positiv. Die anschließende PCR, die mit einem *Vibrio vulnificus*-spezifischen Primer ein kleineres Stück des PCR-Produktes aus der ersten PCR amplifizieren sollte, war nicht erfolgreich. Dies lag vermutlich daran, dass die Annealing- Temperatur oder die eingesetzten Mengen noch nicht optimal sind. Im Rahmen dieser Arbeit war eine weitere Optimierung dieser PCR jedoch nicht möglich. Für den Nachweis der DNA in den Versuchsansätzen ist die erste PCR jedoch ausreichend. Mit Ausnahme des Ansatzes mit 0 NTU und 1 mg/l Kaporit war diese PCR für alle Proben negativ. Somit kam es vermutlich ab einer Kaporitdosierung von 2 mg/l zu einer Hemmung der PCR.

4.2.3 Keramikfiltration

Zum Zeitpunkt der Probenahme bei der Filtration mit dem 200 nm Membranelement betrug der Filtratfluss 50 l/h und die Wassertemperatur hatte sich auf 32 °C erhöht.

Bei dem Versuch mit der 50 nm Membran wurden Proben nach 10 min, 1 h und 2 h genommen. Nach 10 min Laufzeit betrug die Wassertemperatur 23°C, nach 1 h 34°C und nach 2 h hatte sich die Wassertemperatur auf 39°C erhöht. Während des gesamten Versuchs konnte keine Änderung des Filtratflusses von etwa 50 l/h festgestellt werden.

Mithilfe der Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten der einzelnen Bakterienstämme konnte festgestellt werden, wie viele Bakterien tatsächlich zudosiert wurden. In Tabelle 4-2 wurden diese Zahlen aufgeführt. *Campylobacter jejuni* und *Vibrio vulnificus* wurden nur in relativ geringer Anzahl zudosiert, da sie sich nicht ausreichend schnell vermehrt hatten.

Tabelle 4-2: Anzahl der zudosierten Bakterien

Bakterienstamm	Zudosierte Anzahl [KBE/l]	
	200 nm	50 nm
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,0 x 10 ²	15
<i>Enterococcus faecium</i>	3,2 x 10 ⁴	6,4 x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	1,1 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,6 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁶
<i>Shigella flexneri</i>	2,7 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁶
<i>Vibrio vulnificus</i>	2,8 x 10 ²	5,6 x 10 ²

Kulturverfahren

In Tabelle 4-3 wurden die Ergebnisse des Kulturverfahrens der unbehandelten Kontrollen und der filtrierten Proben aufgeführt.

Tabelle 4-3: Wachstum der Kolonien vor und nach Filtration

Medium	LW	LW mit Zusatz der Bakterien		
		unbehandelt	200 nm	50 nm
Chromocult-Agar	-/+	++	+	-/+
Kanamycin-Äsculin-Agar	-/+	++	-/+	-/+
Cetrimid-Agar	-/+	++	-/+	-/+
Nutrient-Agar	++	++	++	++
Blut-Agar	++	++	+	+
ASW-Agar	++	++	+	+

++=Wachstum (viele KBE); +=Wachstum (weniger KBE) und Spezies-spezifische Färbung auf Cetrimid, Chromocult und KAA; -/+ = Wachstum aber keine Spezies-spezifisch gefärbten Kolonien; -= kein Wachstum

Der Kontrollansatz (Leitungswasser ohne Zusatz von Bakterien) zeigte ein Wachstum auf den verschiedenen Agarplatten. Die Kolonien wiesen auf Cetrimid, Chromocult und Kanamycin-Äsculin jedoch keine Färbung auf, so dass es sich bei diesen Bakterien nicht um *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* und *Enterococcus faecium* handelte.

Die Inkubation der Filter des Kontrollansatzes mit Zusatz von Bakterien führten auf jeder Agarplatte zu einem Koloniewachstum. Des weiteren wiesen die Kolonien auf Chromocult, Kanamycin-Äsculin und Cetrimid eine Spezies-spezifische Färbung auf. *Pseudomonas aeruginosa* auf Cetrimid zeigte gelbe Kolonien, *E.coli* auf Chromocult zeigte violette Kolonien und bei *Enterococcus faecium* auf Kanamycin-Äsculin bildete

sich ein schwarzer Hof um die Kolonien. Demzufolge waren die zugesetzten Bakterien in allen Ansätzen vorhanden und kultivierbar.

Nach der Keramikfiltration konnte ebenfalls ein Wachstum auf den einzelnen Platten festgestellt werden. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wachstum nach der Filtration mit dem 200 nm und dem 50 nm Membranelement festgestellt werden. Die einzige Ausnahme bildete *E.coli* auf Chromocult-Agar. Bei Verwendung des 50 nm Membranelements konnte im Anschluss an die Filtration kein Wachstum der für *E.coli* typischen violetten Kolonien beobachtet werden, während nach der Filtration mit der 200 nm Membran violette Kolonien wuchsen. Das Wachstum nahm nach der Keramikfiltration jedoch deutlich ab.

Die gewachsenen Kulturen auf Ceftrimid und Kanamycin-Äsculin-Agar waren weißlich und wiesen nicht die für den jeweiligen Organismus typische Färbung auf. So kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gewachsenen Kulturen nicht um *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* handelte (siehe Tabelle 3-1).

Da es sich bei Blutagar, ASW-Agar und Nutrient-Agar nicht um Selektivmedien handelte, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, um welche Bakterien es sich bei den Kolonien handelte. Auffällig war, dass die Anzahl der Kolonien nach der Keramikfiltration niedriger war im Vergleich zur Kontrolle. Eine Ausnahme bildete hier der Nutrient-Agar, auf dem kein Unterschied zwischen unbehandelter und behandelter Probe festgestellt werden konnte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Enterococcus faecium* und *Pseudomonas aeruginosa* bereits durch die Keramikfiltration mit 200 nm Porenweite erfolgreich zurückgehalten wurden. *E.coli* schien hingegen zu einem geringen Prozentsatz die Membran passieren zu können. Bei Verwendung einer 50 nm Membran konnte neben *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus faecium* auch *E.coli* erfolgreich zurückgehalten werden

Über *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* und *Vibrio vulnificus* konnte mangels Selektivmedium keine Aussage getroffen werden. In jedem Fall gab es Bakterien, die die Membran passieren konnten. Bei ihnen handelt es sich jedoch vermutlich auch um die Bakterien aus dem verwendeten Leitungswasser, da auch bei einer Kontrolle mit Leitungswasser ohne Zusatz von Bakterien ein Wachstum zu verzeichnen war.

Bei einem Vergleich der Kultivierung der Proben die nach 10 min, 1 h und 2 h Laufzeit der Anlage mit der 50 nm Membran genommen wurden, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Anlage keine Anlaufzeit benötigt und bereits nach 10 min ihre volle Filterkraft erreicht hat.

Spezies-spezifische PCR

Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, ob die Versuchsbakterien die Membran passieren konnten, wurde zusätzlich zum Kulturverfahren eine Spezies-spezifische PCR für jeden Organismus durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Ergebnisse der Spezies-spezifischen PCR vor und nach der Keramikfiltration

Bakterium	LW	LW mit Zusatz der Bakterien		
		unbehandelt	200 nm	50 nm
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+	-	?
<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	?
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	+	+	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	?	?	?

+=PCR-Produkt; -= kein PCR-Produkt; ?=PCR nicht erfolgreich

Für den mit der 200 nm Membran filtrierte Ansatz wies diese PCR bei *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* und *E.coli* lediglich für die unbehandelten Kontrollproben ein PCR-Produkt auf. Bei der *Shigella flexneri*-spezifischen PCR konnte auch für die filtrierte Probe ein PCR-Produkt nachgewiesen

werden. Dies war jedoch deutlich schwächer als das Produkt der unbehandelten Kontrolle. Durch die 50 nm Membran konnte *Shigella flexneri* hingegen vollständig zurückgehalten werden, da hier keine DNA nachgewiesen werden konnte.

Die Spezies-spezifische PCR lieferte bei den Versuchen mit der 50 nm Keramikmembran kein Ergebnis für *Campylobacter jejuni* und *Enterococcus faecium*. Bei *Campylobacter jejuni* könnte dies an der sehr geringen Anzahl zudosierter Bakterien liegen. Dies ist bei *Enterococcus faecium* nicht der Fall. Da die Proben der beiden Keramikfiltrationsversuche zusammen aufbereitet wurden, sind Unterschiede in der Durchführung auszuschließen. Für eine Interpretation dieses Ergebnisses wären weitere Versuche notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

Da sowohl *Campylobacter jejuni*, als auch *Enterococcus faecium* bereits durch die Membran mit einem Porendurchmesser von 200 nm zurückgehalten wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es den Bakterien nicht möglich war, die Membran mit dem kleineren Durchmesser von 50 nm zu durchdringen.

Die Probleme bei der *Vibrio vulnificus*-spezifischen PCR wurden bereits unter 4.2.2.6 erläutert. Das Ergebnis der Filtration mit dem Porendurchmesser von 50 nm entsprach weitestgehend den Ergebnissen der Filtration mit der 200 nm Membran.

Die PCR für *Vibrio vulnificus* war aus einer universellen PCR, gefolgt von einer PCR mit einem *Vibrio vulnificus*-spezifischen Primer, aufgebaut (siehe Kapitel 3.2.4.2). Wie jedoch schon in Kapitel 4.2.2.6 beschrieben, lieferte diese PCR noch keine optimalen Ergebnisse. So war die PCR mit den universellen Primern für die unbehandelte Probe und die filtrierte Proben positiv. Die Banden waren jedoch für die filtrierte Proben deutlich schwächer, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein Großteil der Bakterien von den Filtern zurückgehalten werden konnte. Die *Vibrio vulnificus*-spezifische PCR konnte leider nicht eindeutig interpretiert werden, so dass nicht eindeutig gesagt werden konnte, ob *Vibrio vulnificus* die Membranen passieren konnte.

Die im Rahmen der *Vibrio Vulnificus*-spezifischen PCR durchgeführte universelle PCR bestätigte, dass es Bakterien gab, die die Keramikmembranen passieren konnten. Diese konnten jedoch aus Zeitgründen noch nicht sequenziert werden.

Mit den Spezies-spezifischen PCRs konnte hingegen nachgewiesen werden, dass die meisten zugesetzten Bakterien tatsächlich bereits durch den 200 nm Keramikfilter zurückgehalten wurden. Lediglich ein Anteil der *Shigella flexneri*-Kultur konnte nachweislich diese Membran passieren. Bei der Verwendung der 50 nm Membran konnte jedoch auch *Shigella flexneri* zurückgehalten werden.

Verwunderlich ist das Ergebnis der *E.coli*- und *Pseudomonas aeruginosa*-spezifischen PCR. In vorigen Versuchen im Rahmen des Monitorings und der Chlorversuche (siehe 4.1.2.2 und 4.2.2.1) waren diese PCRs nicht erfolgreich. Selbst die unbehandelte Kontrolle der Chlorversuche wies kein PCR-Produkt auf. In diesem Versuch hingegen konnte mit der gleichen Methode DNA sowohl von *E.coli* als auch von *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden. Da es keine signifikanten Unterschiede in der Probenaufbreitung oder in der Durchführung der PCR im Vergleich zu den Chlorversuchen gab, war eine Interpretation dieser Tatsache ohne weiterführende Untersuchungen nicht möglich.

Bemerkenswert war außerdem, dass mittels Kulturverfahren eine kleine Anzahl an *E.coli*-Bakterien in der, durch die 200 nm Membran filtrierte, Probe nachgewiesen werden konnte, mithilfe der PCR jedoch keine *E.coli*-DNA gefunden werden konnte. Dies könnte auf die sehr geringe Bakterienanzahl nach der Filtration zurückzuführen sein. Eine Kontamination der Probe für die Kultivierung (z.B. durch eine nicht ausreichend desinfizierte Pinzette) ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen.

Ein Unterschied zwischen der Anlagen-Laufzeit von 10 min, 1 h und 2 h auf die Rückhaltung der Bakterien konnte nicht festgestellt werden, da sich die PCR-Produkte dieser Proben nicht unterschieden.

Versuche mit verschiedenen Trübungen konnten aufgrund von Problemen bei der Lieferung der Anlage und der knappen Zeit zwischen Lieferung der Anlage und Abgabetermin der Arbeit nicht durchgeführt werden. Sie sind Teil weiterer, noch ausstehender, Experimente.

5 Diskussion

Mikrobiologische Trinkwasseranalysen erfolgen nach der deutschen Trinkwasserverordnung mittels Kulturverfahren, bei dem die Gesamtkeimzahl bei 22 und 36 °C, die Keimzahl der coliformen Bakterien, *Escherichia coli*, Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, sowie *Clostridium perfringens* (inklusive Sporen) bestimmt werden (TrinkwV, 2001). Entsprechende Vorschriften existieren in der indonesischen Trinkwasserverordnung (indon. TrinkwV, 2002), werden jedoch im Projektgebiet nicht umgesetzt. So war eine Aufgabe dieser Arbeit die Entwicklung und Einführung eines Monitoringprogramms, da die Erhebung dieser hygienischen Daten, unter anderem für die Auswahl und Entwicklung eines Aufbereitungsverfahrens, von essentieller Bedeutung waren. Die Durchführung der Trinkwasseranalyse musste den herrschenden Bedingungen angepasst werden. Dazu gehörte das tropische Klima, die langen Transportwege, die Ausstattung des indonesischen Labors und die mangelnde Hygiene im Labor. So wurde zur Bestimmung der coliformen Keimzahl und *Escherichia coli* ein ColiLert-System eingeführt, das relativ unkompliziert in der Durchführung ist und sehr zuverlässige Ergebnisse liefert. Zusätzlich wurde ein Verfahren verwendet, bei dem 100 ml Wasser durch einen Filter gepresst wurde, der dann zur DNA-Analyse in ein deutsches Labor transportiert wurde. Die DNA-Analyse kann im Gegensatz zum Kulturverfahren auch eine Aussage über die nichtkultivierbaren Mikroorganismen ermöglichen, die im Wasser vorkommen, sich aber nicht auf einer Agarplatte kultivieren lassen. Wie die Ergebnisse zeigten, muss das verwendete Verfahren für den DNA-Transport von Indonesien nach Deutschland und die Aufbereitung überarbeitet werden. Da die *E.coli*-DNA trotz positivem ColiLert-Ergebnis nicht nachgewiesen werden konnte, war es vermutlich nicht möglich die DNA vom Filter zu lösen oder die Umweltprobe enthielt andere PCR-inhibierende Stoffe, die zunächst entfernt werden müssten.

Die Ergebnisse des eingeführten Monitorings zeigten deutlich, dass das Wasser in keinem Fall den Anforderungen der deutschen oder indonesischen Trinkwasserverordnungen entsprach. Die coliforme Belastung und auch die Belastung durch *E.coli* waren teilweise sehr hoch. Dies stand in engem Zusammenhang mit der mangelhaften

Abwasserentsorgung und dem Karstgestein, dessen schlechte Filterkapazität es den Bakterien ermöglichte, leicht in das Grundwasser zu gelangen. Außerdem trugen die schlechte Verfassung des Wasserleitungssystems, das tropische Klima und die mangelnde Wasseraufbereitung zur schlechten Wasserqualität bei. Bemerkenswert war weiterhin, dass die Belastung durch coliforme Keime im Verlauf des Wasserleitungssystems zunahm. Dieser Umstand war neben dem maroden Leitungssystem vor allem darauf zurückzuführen, dass es in dem Leitungssystem keinen kontinuierlichen Durchfluss gab. Viele Zweige des Systems wurden nur unregelmäßig beschickt, so dass die Bakterien, die sich durch die tropischen Temperaturen besonders gut vermehren konnten, nicht abtransportiert wurden.

Die Populationsanalyse ergab, dass sich die Bakterienpopulation im untersuchten Wasser, neben coliformen Keimen vor allem aus Acinetobacter und Pseudomonaden zusammensetzte. Die Pseudomonaden gehören zu den opportunistischen Pathogenen und können, wie auch einige Spezies der coliformen Bakterien, zu Krankheiten führen.

Wie die Ergebnisse des Monitorings belegten, war eine Aufbereitung des Wassers unbedingt notwendig, um Krankheiten vorzubeugen. In Kapitel 3.1 wurden verschiedene Hygienisierungsmethoden erörtert und auf ihren Einsatz im Projektgebiet hin diskutiert. Die Chlorung, die UV-Desinfektion, die Langsamsand- und die Keramikfiltration wurden unter anderem aufgrund ihrer Effektivität, der relativ geringen Kosten und der unkomplizierten Anwendung ausgewählt, um in einem Feldlabor (siehe Kapitel 3) weiteren Untersuchungen unterzogen zu werden.

Für die Konzeptionierung dieser Pilotanlage sollten zunächst Versuche im Labormaßstab durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Versuche bereits für die Chlorung und die Keramikfiltration durchgeführt.

Die Chlorversuche erfolgten unter Verwendung eines DPD-Tests für den Nachweis von freiem Chlor, einem Kulturverfahren zum Nachweis der zugesetzten Bakterien und einer DNA-Analyse. Mit Hilfe des verwendeten DPD-Tests konnte bei entsprechender Probenverdünnung relativ genau der Gehalt an freiem Chlor angegeben werden. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte jedoch, dass bei zusätzlicher Verwendung eines

entsprechenden Tests zur Angabe des Gesamtchlorgehalts ein genaueres Ergebnis möglich gewesen wäre, da die berechnete zudosierte Menge an freiem Chlor leicht zu schwanken schien.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse wies darauf hin, dass das in der Probe vorhandene Chlor die PCR zu stören schien, so dass eine vorherige Entfernung oder Neutralisation des Chlors nötig gewesen wäre. Da bei Zugabe von Chlor die Bakterien zwar abgetötet werden, die DNA jedoch noch vorhanden sein sollte, wäre eine DNA-Analyse jedoch auch bei erfolgreicher PCR nur unter Einbeziehung eines lebend/tot-Nachweises hilfreich für die Auswertung des Desinfektionserfolges gewesen.

Die Auswertung des Desinfektionsverfahrens erfolgte mittels Kulturverfahren in Anlehnung an die Trinkwasserverordnung. Bei den meisten Proben, die auch verschiedenen Trübstoffkonzentrationen enthielten, war bereits eine Menge von 2 mg/l Kaporit ausreichend, um die Bakterien abzutöten.

Versuche mit zwei Keramikmembranen wurden ebenfalls mittels Kulturverfahren und DNA-Analyse ausgewertet. Da die Bakterien durch die Keramikmembran zurückgehalten werden sollten und somit auch keine Bakterien-DNA in der filtrierten Probe zu finden sein sollte, war eine DNA-Analyse sinnvoll. Bemerkenswert ist, dass der Nachweis von *E.coli* mittels PCR bei diesem Versuch im Vergleich zu den Monitoringversuchen und Chlorversuchen erfolgreich war. Da die Aufbereitung der Filter sich bei diesen Analysen jedoch kaum unterschied, ist eine Interpretation dieses Umstandes nicht ohne weitere Experimente möglich. Die Probleme bei der Spezies-spezifischen PCR für *Vibrio vulnificus* waren darauf zurückzuführen, dass diese PCR noch nicht optimiert werden konnte.

Die Ergebnisse des Kulturverfahrens und der DNA-Analyse zeigten, dass die meisten zugesetzten Bakterien bereits mit Hilfe des 200 nm Membranelements zurückgehalten werden konnten. Die 50 nm Membran erwies sich als etwas effektiver für den Rückhalt von *Shigella flexneri*.

Sowohl die Chlorung als auch die Keramikfiltration erwiesen sich als effektive Hygienisierungsmethoden. Bei den Versuchen zur Chlorung und Keramikfiltration handelte es sich um Versuche mit Leitungswasser und definierten Zusätzen. Weitere

Versuche im indonesischen Klima und mit dem dortigen Wasser sind jedoch unbedingt notwendig, um Aussagen über die Effektivität der Verfahren bei den dort herrschenden Bedingungen treffen zu können. Dasselbe gilt für die noch zu untersuchende UV-Desinfektion und die Langsamsandfiltration.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen eines IWRM-Projektes sollen in der Region Gunung Kidul im Süden der indonesischen Insel Java nachhaltige und angepasste Verfahren entwickelt werden, um die Bevölkerung mit Wasser in ausreichender Menge und Qualität zu versorgen. Zu diesem Zweck wurde in der Karsthöhle Gua Bribin Wasser angestaut, und mit Hilfe von mit Wasserkraft betriebenen Pumpen in das Leitungsnetzwerk eingespeist. Diese Diplomarbeit entstand im Rahmen der im Projekt geplanten Wasseraufbereitung, die der hohen mikrobiellen Belastung des Wassers entgegenwirken soll.

Als unser wichtigstes Lebensmittel sollte Trinkwasser klar, farblos, geruchlos und appetitlich sein. Des Weiteren sollte es keimarm und frei von pathogenen Bakterien, Viren oder Wurmeiern sein (Röske & Uhlmann, 2005).

Im indonesischen Gunung Kidul entspricht das Wasser nicht annähernd diesen Kriterien. Wie die Ergebnisse des Monitorings belegen, weist das Wasser nicht nur eine hohe Keimzahl, sondern auch eine hohe Kontamination an fäkalen Bakterien auf, die zu Krankheiten, insbesondere Durchfallerkrankungen führen können.

Für die dringend benötigte Wasseraufbereitung kommen die Chlorung, die UV-Desinfektion, die Langsamsand- und die Keramikfiltration in Frage, da sie relativ kostengünstig, unkompliziert in der Handhabung und dennoch effektiv sind.

Die Chlorversuche zeigten, dass in fast allen Fällen schon eine Menge von 2 mg/l KapazitÄt ausreichend waren, um die untersuchten Bakterien erfolgreich abzutöten.

Keramikfilter erwiesen sich ebenfalls als sehr effektiv für die Elimination der untersuchten Bakterien. Dabei konnten schon mit Hilfe des 200 nm Membranelements die meisten untersuchten Bakterien zurückgehalten werden. Bei Verwendung der 50 nm Membran war es keinem der zugesetzten Bakterien nachweislich möglich, die Membran zu durchdringen. Lediglich einige noch nicht näher untersuchte Bakterien aus dem Leitungswasser konnten die Membran passieren. Da diese jedoch nicht schädlich sind und eine vollkommene Sterilisation des Wassers weder gewünscht noch durchführbar ist, stellt die Keramikfiltration eine gute Hygienisierungsmaßnahme dar.

Versuche mit einer UV-Anlage und einer Langsamsandfiltrations-Anlage konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Dennoch scheinen alle vier Aufbereitungsverfahren für den Einsatz im Projektgebiet geeignet und sollten in einer Pilotanlage weiteren Experimenten unterzogen werden.

7 Ausblick

Im Jahr 2013 soll das IWRM-Projekt „Integriertes Wasserressourcen-Management in Gunung Kidul, Java, Indonesien“ abgeschlossen werden. Bis dahin wird ein regelmäßiges Monitoring der Höhlen Bribin und Seropan, des Leitungsnetzes im Anschluss an die Höhle Bribin und des PDAM-Wassers im Krankenhaus von Wonosari erfolgen.

Aus den Problemen bei der DNA-Analyse der Proben folgte die Aufgabenstellung der Optimierung der bestehenden Methoden. So sollen die Haftung der Bakterien auf den Filtern und verschiedene DNA-Extraktionsmethoden untersucht werden.

Zur Entwicklung der Pilotanlage im Überseecontainer müssen noch verschiedene Laborversuche durchgeführt werden. Neben den noch ausstehenden Trübungsversuchen an den Keramikfiltern müssen Laborversuche zur UV-Desinfektion und zur Langsamsandfiltration durchgeführt werden. Zunächst wird am Institut für Wasser und Gewässerentwicklung (Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft) des Karlsruher Instituts für Technologie die optimale Zusammensetzung des Langsamsandfilters ermittelt. Anschließend werden an diesem Filter Versuche mit unterschiedlichen Trübstoffgehalten und Bakterienzusätzen erfolgen, um seine Eignung zur Hygienisierung des Wassers zu überprüfen. Parallel sollen entsprechende Versuche an einer UV-Anlage durchgeführt werden.

Nach der Fertigstellung des Überseecontainers für die Hygienisierungsversuche (nähere Erläuterung im Kapitel 3) folgen Versuche an der Jagesquelle im Schwarzwald, die in ihrer bakteriellen Belastung etwa dem aufzubereitenden PDAM-Wasser im Krankenhaus Wonosari entspricht. Anschließend soll der Container nach Indonesien verschifft werden, um dort für Versuche am Krankenhaus in Wonosari genutzt zu werden (Kapitel 3).

Mit Hilfe der Ergebnisse des Monitorings und der Versuche an der Pilotanlage soll bis zum Abschluss des Projektes ein angepasstes und nachhaltiges Aufbereitungsverfahren entwickelt und empfohlen werden können. Diese Ergebnisse werden an die indonesischen Partner und Behörden übergeben, so dass eine geeignete Aufbereitung des Wassers im gesamten Projektgebiet implementiert werden kann. Das Projekt soll als Pilotprojekt dienen und eine Übertragung der Techniken in Gebiete mit ähnlichen Voraussetzungen ermöglichen.

8 Literaturverzeichnis

- Atech Innovations GmbH, *Bedienungsanleitung AtechLAB Laboranlage*, 2010
- Baier, A., GeoZentrum Nordbayern, Uni Erlangen, www.angewandte-geologie.geol.uni-erlangen.de/hem_09.htm, Stand 21.01.2010
- Brikké, François & Bredero, Maarten, WHO, *Linking technology choice with operation and maintenance*, 2003
- Cerdà-Cuéllar, M., Jofre, J. & Blanch, A.R., *A Selective Medium and a Specific Probe for Detection of Vibrio vulnificus*, 1999
- Cook, K. & Britt, J., *Optimization of methods for detecting Mycobacterium avium subsp Paratuberculosis in environmental samples using quantitative, real-time PCR*, In: Journal of Microbiological Methods 69, 2007
- DVGW, *Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung*, 2001
- eawag, www.sodis.ch, Stand 10.11.2009
- Edberg, S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, and the National Collaborative Study, *National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method*, In: Applied Environmental Microbiology 54, 1988
- FAO, *Knowledge of Sanitation and its Application in Daily life to create Healthy Environment for the SPFS Farmers* <http://database.deptan.go.id/saims-indonesia/index.php?files=DetailTechnologies&id=50>, Stand 28.01.2010
- Favero, M.S., Carson, L.A., Bond, W.W. & Petersen, N.J., *Pseudomonas aeruginosa: Growth in Distilled Water from Hospitals*, 1971
- Frahm, E. & Obst, U., *Application of the flourogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples*, In: Journal of Microbiological Methods 52, 2003
- Frahm, E., Heiber, I., Hoffman, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K. & Obst, U., *Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control*, In: Systematic and Applied Microbiology 21, 1998

- Heber, Gabriele, *Simple Methods for the Treatment of Drinking Water*, GATE in GTZ, 1989
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M. & Wagner, M., *Real-Time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project*, In: Journal of Microbiological Methods 66, 2006
- Hötzl, Heinz, *Nutzung von Karstwasservorkommen für die Trinkwasserversorgung – Gefährdungspotenziale und Schutz*, In: WasserWirtschaft 99, 2009, Heft 7-8
- Indonesische Trinkwasserverordnung (Menteri Kesehatan Republik Indonesia), 2002
- Informationszentrum Technische Keramik, <http://www.keramverband.de/keramik>, Stand 2010
- Joshua, G.W., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V. & Wren, B.W., *Biofilm formation in Campylobacter jejuni*, 2006
- Jungfer, Christina, *Einfluss der UV- Desinfektion auf molekulare Reparaturmechanismen bei Bakterien im Trinkwasser*, 2007
- Kilb, B., Kuhlmann B., Eschweiler, B., Preuß, G., Ziemann, E., Schöttler, U., *Community structures of different groundwater habitats investigated using methods of molecular biology*, In: Acta Hydrochim Hydrobiol, 1998
- Kölle, Walter, *Wasseranalysen – richtig beurteilt*, 2001
- Li, Y., Liu, D., Cao, B., Han, W., Liu, Y., Liu, F., Guo, X., Bastin, D., Feng, L. & Wang, L., *Development of a Serotype-specific DNA Microarray for Identification of some Shigella and pathogenic Escherichia coli Strains*, 2006
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J., *Brock Mikrobiologie*, 2001
- Malorny, B., Bunge, C. & Helmuth, R., *Evaluation of Salmonella spp.-specific primer sets for the validation within the Food PCR Project*, Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, National Reference Laboratory for Salmonella, Berlin, Deutschland, 2001
- Mark W LeChevallier & Kwok-Keung Au, WHO, *Water Treatment and Pathogen Control, Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*, 2004
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. & Joint, J., *Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities*, In: The ISME Journal 2, 2008

- Nestmann, F., Oberle, P., Ikhwan, M., Lux, T. und Scholz, U., *Bewirtschaftung unterirdischer Fließgewässer in Karstgebieten – Pilotstudie auf Java, Indonesien*, In: WasserWirtschaft 99 (2009), Heft 7-8
- Nur Muhammad, Rajib Sinha, E. Radha Krishnan Craig L. Patterson, *Ceramic Filter for Small System Drinking Water Treatment: Evaluation of Membrane Pore Size and Importance of Integrity Monitoring*, 2009
- Paludan-Müller, C., Weichart, D., McDougald, D. & Kjelleberg, S., *Analysis of starvation conditions that allow for prolonged culturability of Vibrio vulnificus at low temperature*, 1996
- Parodi, Orlando, *Trinkwasserdesinfektion in infrastrukturschwachen Regionen unter Berücksichtigung dezentraler Energieversorgung*, Dissertation, 2003
- Petry-Hansen, Heike, *Bakterielle Diversität von Biofilmen in Langsandsfiltern*, Dissertation, 2005
- Pokorný, J., *Überleben von Campylobacter jejuni im Trinkwasser*, 1988
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scotti, M., Esteve, T., Vásquez-Boland, J. & Pla, M., *Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor Technology*, In: Applied and Environmental Microbiology 70, 2004
- Röske, Isolde & Uhlmann, Dietrich, *Biologie der Wasser- und Abwasserbehandlung*, 2005
- Sanger, F., Nicklen, S., Levy, S.B., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, 1977
- Solsona, Felipe & Méndez, Juan Pablo, WHO, *Water disinfection*, 2003
- Stevik, Tor Kristian, Ausland, Kari Aa & Hanssen, Jon Fredrik, *Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review*, 2003
- Technische Regel*, Arbeitsblatt W 290, DVGW, 2005
- Trinkwasserverordnung*, 1990
- Uhlig, H., *Man and Tropical Karst in Southeast Asia*, in GeoJournal 4.1, 31-44/1980
- Umweltbundesamt 2009, Liste der Aufbereitungsstoffe und Desinfektionsverfahren gemäß §11 der Trinkwasserverordnung 2001
- Voet, D., Voet J.G. & Pratt, C.W., *Biochemie*, VCH, Weinheim, Deutschland, 2002

- Volkman, H., Schwartz, T., Kirchen, S., Stofer, S. & Obst, U., *Evaluation of inhibition and cross-reaction effects on real-time PCR applied to the total DNA of wastewater samples for the quantification of bacterial antibiotic resistance genes and taxon-specific targets*, In: Molecular and Cellular Probes 21, 2007
- Waage A.S., Varund, T., Lund, V. and Kapperud, G., *Detection of small numbers of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli cells in environmental water, sewage and food samples by a seminested PCR-Assay*, In: Applied and Environmental Microbiology. 65, 1999
- Wiegand-Rosinus, Maria & Obst, Ursula, *Practical Experience with Rapid Methods for Controlling the Microbiological Quality of Drinking Water and Disinfection Efficiency*, 1999
- WHO, *Guidelines for drinking-water quality*, 2006
- WHO, *Water Supply for Rural Areas and Small Communities*, 1963
- WHO, *World Health Report*, 2000
- Zychlinsky, A., *Molekulare Grundlagen der Pathogenese von Shigella-Infektionen*, Jahresbericht des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie, 2003
- Website des IWRM-Projektes: <http://www.iwrm-indonesien.de/>, Stand 4.5.2010

9 Anhang

Tabelle 9-1: in vorherigen Untersuchungen zusätzlich verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Größe [bp]	Zielgruppe	Referenz
InvA 139f InvA 141r	GTGAAATAATCGCCACGTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	248	Salmonellen	Malorny <i>et al.</i> , 2001 and Hein <i>et al.</i> , 2006
F2 R2	AATGACGGTTACGGAGGTGGT GCAGTAATGGTCGGCCTTACC	76	<i>Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis</i>	Cook & Britt, 2007
InlA-1-For InlA-r Rew	CCTAGCAGGTCTAACCGCAC TCGCTAATTTGGTTATGCC	255	<i>Listeria monocytogenes</i>	Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004

Tabelle 9-2: Temperaturprofil der Primer InvA139F/ InvA141R (Salmonellen)

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
35 Zyklen	95 °C	30 s	Denaturierung
	64 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Tabelle 9-3: Temperaturprofil der Primer InlA-1-F/ InlA-2-R (*Listeria monocytogenes*)

	95 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
36 Zyklen	95 °C	1 min	Denaturierung
	50 °C	1 min	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
	72 °C	6 min	Abschließende Extension

Tabelle 9-4: Temperaturprofil der Primer F2/ R2 (*Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*)

	94 °C	30 s	Einleitende Aktivierung der Polymerase
35 Zyklen	94 °C	30 s	Denaturierung
	54 °C	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	Elongation
	72 °C	7 min	Abschließende Extension

Abbildung 9-1: Schema zur geplanten Wasseraufbereitung

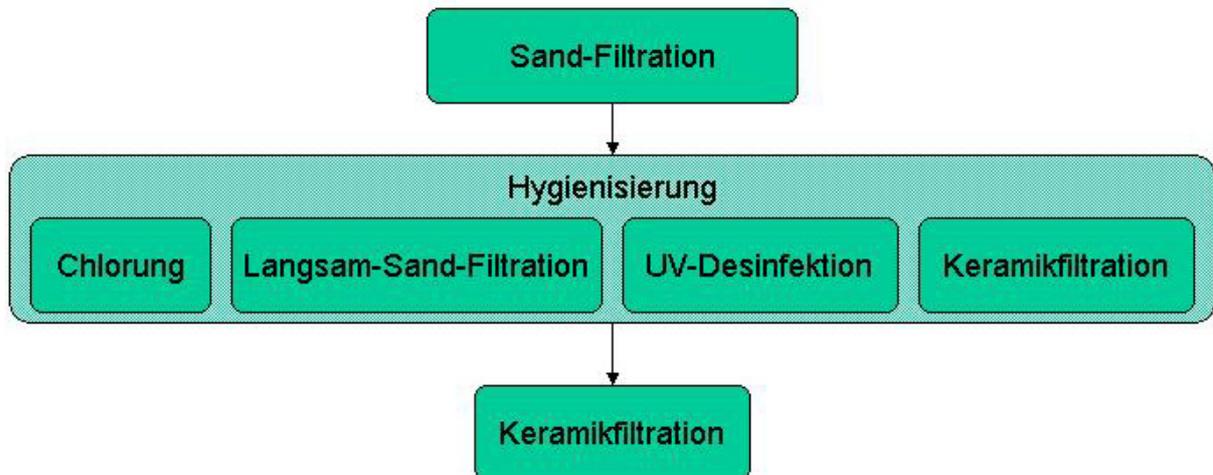


Tabelle 9-5: Ergebnisse der Messkampagne Juli/August 2009, chem. Analyse

Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
R1	?	7,1	498	7,24	2,69
R2	28,2	7,4	499	7,37	2,24
R3	27	7,1	498	7,75	2,09
R4	28,6	7,4	503	7,79	2,13
R5	29,5	8,04	499	7,61	1,97
R6	28,9	7,4	582	7,96	1,99
R8	28,4	8,4	488	8,1	1,34
R9	27,2	7,86	489	7,8	1,53
R BP1	28,2	7,6	501	7,7	1,97
R BP3	29,5	7,97	501	8,25	--
R BP4	29,1	8,43	494	7,96	2,47
Gua Bribin	26,2	7,6	499	8,06	1,73
Gua Seropan	27,5	7,23	480	5,63	1,07
Krankenhaus Wonosari	28,9	7,23	625	5,18	0,16

Tabelle 9-6: Ergebnisse der Messkampagne Oktober 2009, chem. Analyse

Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
R1	28	8,1	--	7,5	0,5
R2	28,3	7,53	--	7,32	1,83
R3	29,6	7,63	--	7,7	0,97
R4	29,5	7,67	--	8,08	1,55
R5	29,9	7,97	--	8,02	1,27
R6	29,9	8,01	--	8,27	1,86
R8	26,1	8,38	--	8,49	0,35
R9	29,6	8,27	--	7,6	2,25
R BP1	29,8	7,69	--	7,79	1,65
R BP3	29,3	7,63	--	8,15	1,76
R BP4	28,9	8,46	--	7,74	0,69
Gua Bribin	29,2	8,21	--	8,18	1,98
Gua Seropan	27,7	7,4	--	5,8	1,26
Krankenhaus Wonosari	28,6	7,45	--	7,06	0,35

Tabelle 9-7: Chemische Daten der Gua Bribin von Juli 2009 bis März 2010

Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
Juli 2009	26,2	7,6	499	8,06	1,73
August	27,5	7,4	458	6,73	2,27
September	--	--	--	--	--
Anfang Oktober	29,2	8,2	--	8,18	1,98
Ende Oktober	30,2	7,0	--	0,52	1,39
November	--	--	--	--	--
Dezember	28,7	6,9	--	7,42	1,35
Januar 2010	26,6	7,1	516	7,13	3,81
Februar	27,7	7,1	508	7,3	7,3
März	29,2	7,3	527	7,9	3,9

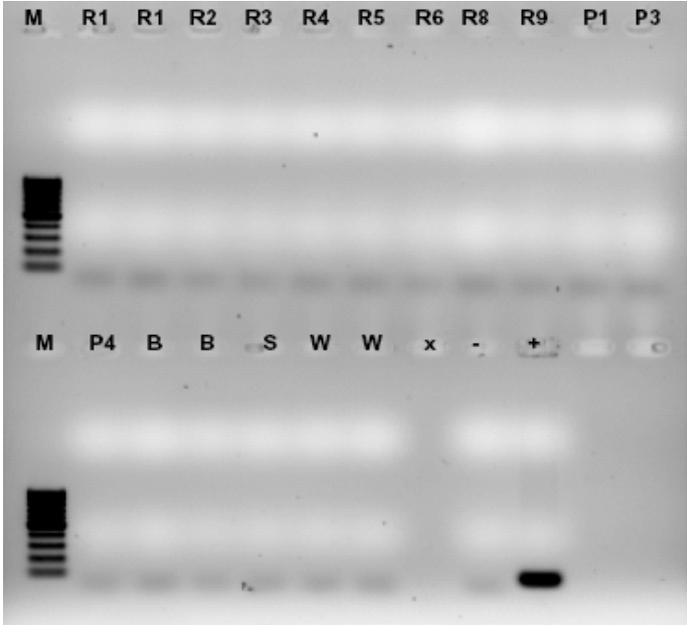
Tabelle 9-8: Chemische Daten der Gua Seropan von Juli 2009 bis März 2010

Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
Juli 2009	27,5	7,2	480	5,63	1,07
August	27,5	7,3	448	3,76	2,10
September	28,4	6,9	--	5,55	2,40
Anfang Oktober	27,7	7,4	--	5,80	1,26
Ende Oktober	28,0	6,9	--	5,63	0,83
November	27,9	7,0	--	5,72	1,06
Dezember	27,5	6,8	--	5,75	7,31
Januar 2010	27,3	7,0	579	5,72	3,69
Februar	27,5	6,9	491	5,80	2,24
März	27,5	6,9	598	5,71	1,36

Tabelle 9-9: Chemische Daten des Leitungswassers im Krankenhaus Wonosari von Juli 2009 bis Dezember 2010

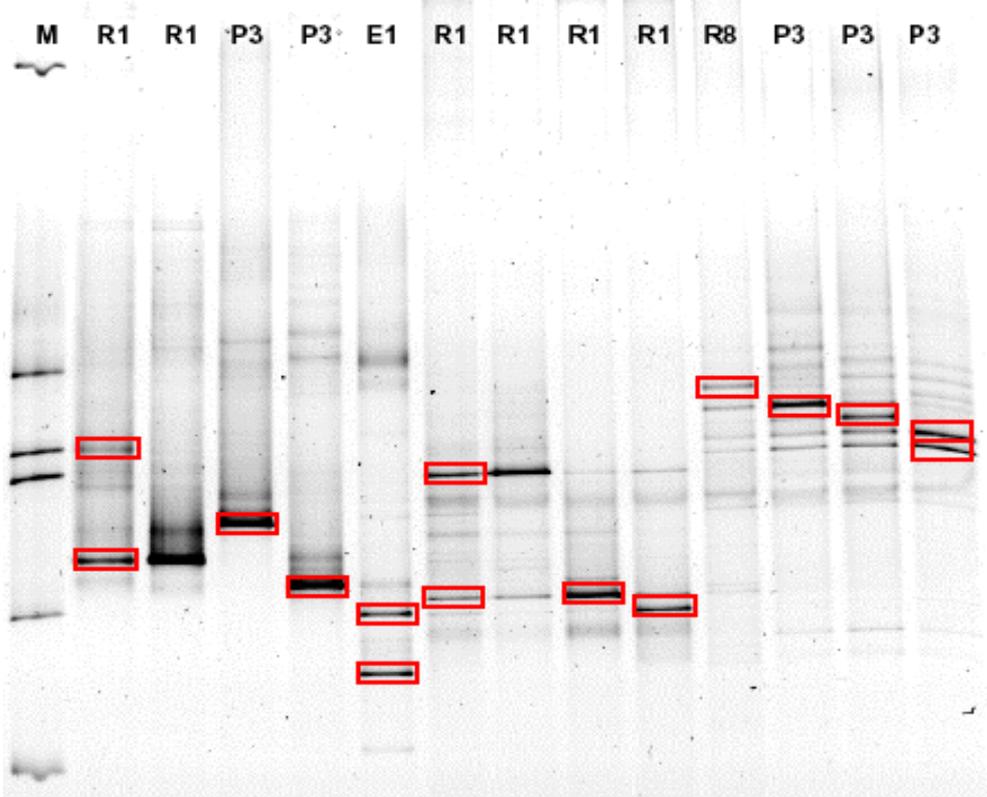
Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
Juli 2009	28,9	7,2	625	5,18	0,16
August	--	--	--	--	--
September	29,7	6,8	--	4,63	0,35
Anfang Oktober	28,6	7,5	--	7,06	0,35
Ende Oktober	29,6	6,9	--	5,22	1,15
November	27,4	7,1	--	8,10	1,32
Dezember	28,6	7,0	--	6,90	0,49
Januar 2010	27,8	7,0	561	7,87	0,23
Februar	29,0	7,0	659	8,24	0,32
März	29,2	7,0	649	7,86	1,4

Abbildung 9-2: PCR der Proben vom Sommer 2009 mit *E.coli*- spezifischen Primern



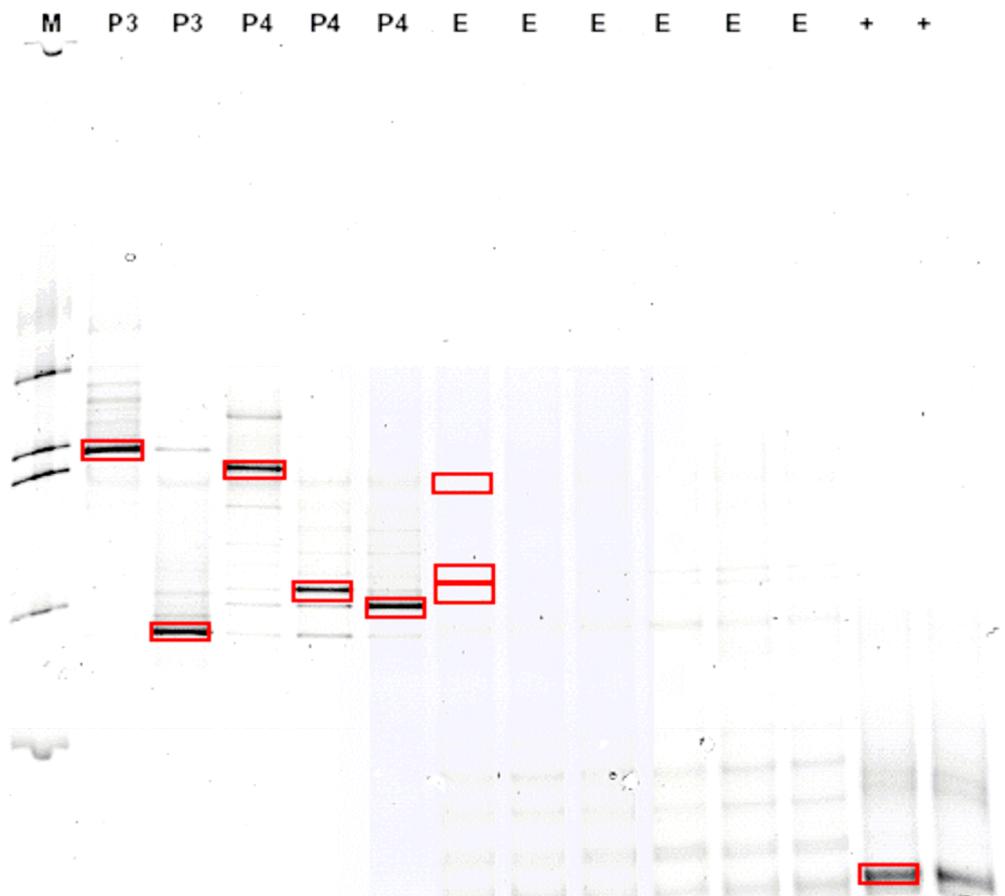
M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan, W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle

Abbildung 9-3: 1. Teil der 2. DGGE, rot gekennzeichnet die geschnittenen Banden



M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan, W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle, E=isolierte DNA

Abbildung 9-4: 2. Teil der 2. DGGE, rot gekennzeichnet die geschnittenen Banden



M=Marker, R1-R9=Behälter, P1-P4=Pumpstationen, Br=Gua Bribin, S=Gua Seropan, W=Krankenhaus Wonosari, -=Negativkontrolle, +=Positivkontrolle, E=isolierte DNA

Abbildung 9-5: räumliche Verteilung der coliformen Keimzahlen, März 2010

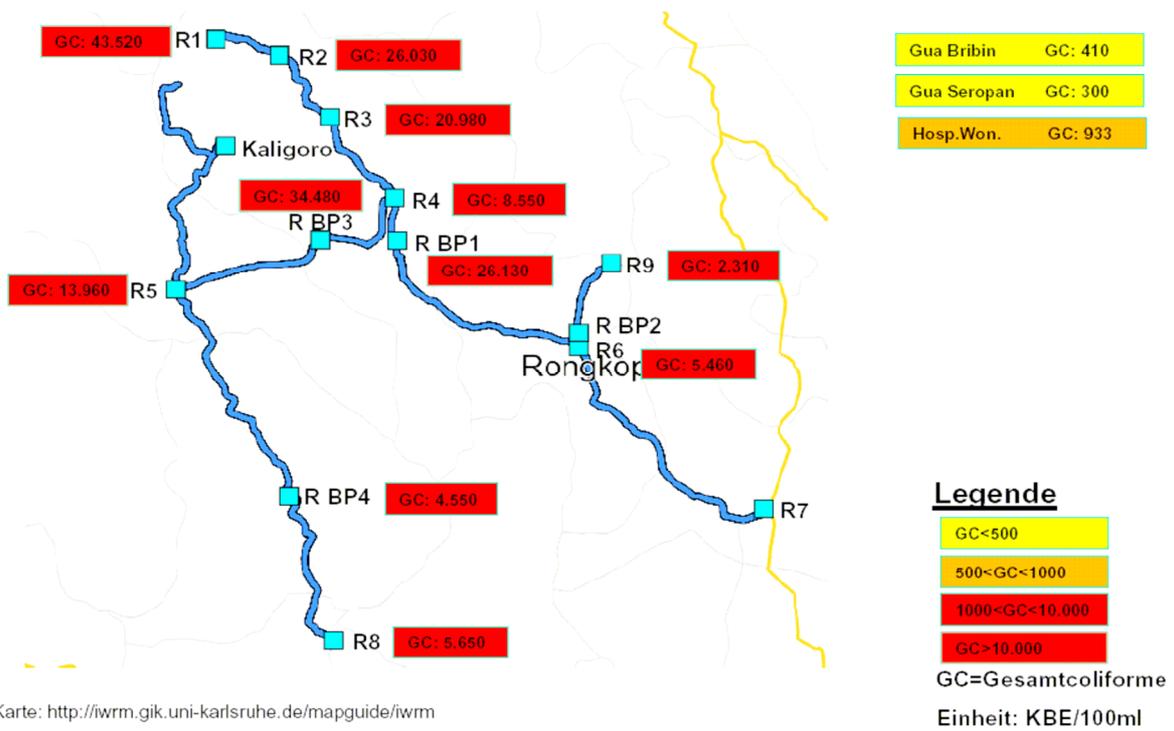


Abbildung 9-6: räumliche Verteilung der *E.coli*-Keimzahlen, März 2010

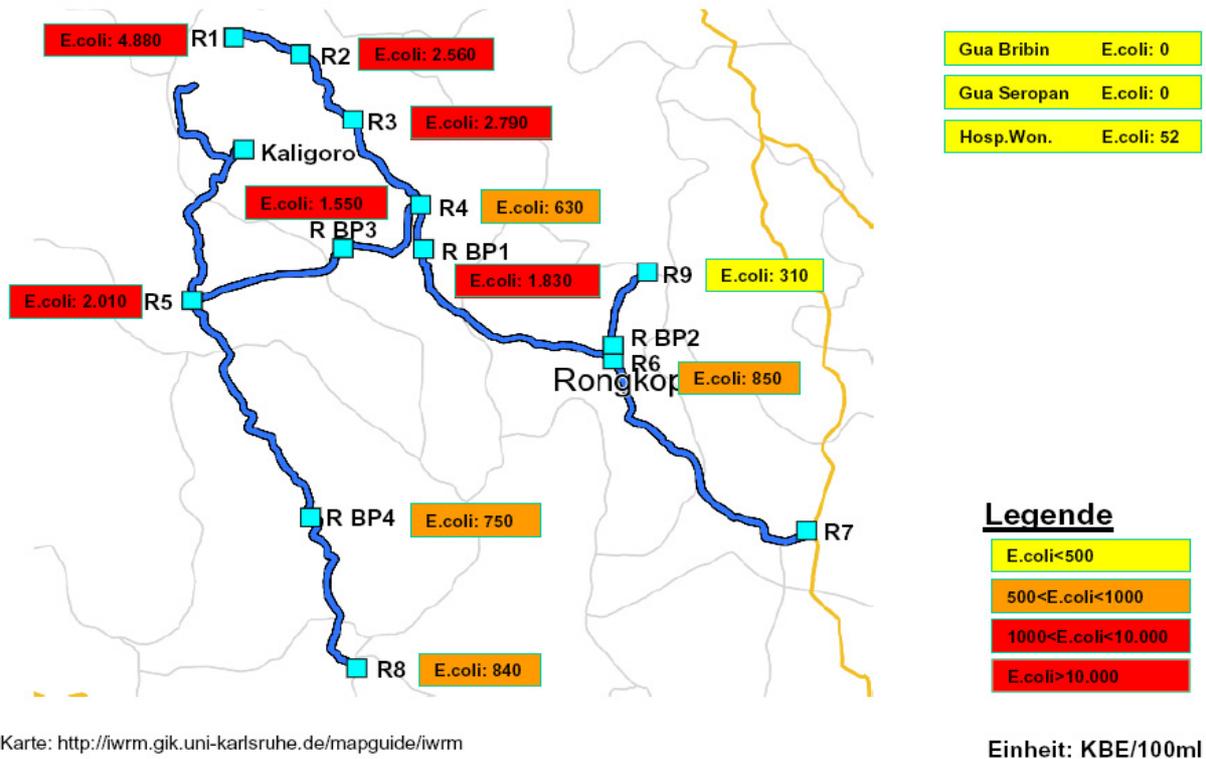


Abbildung 9-7: räumliche Verteilung der Enterokokken-Keimzahlen, März 2010

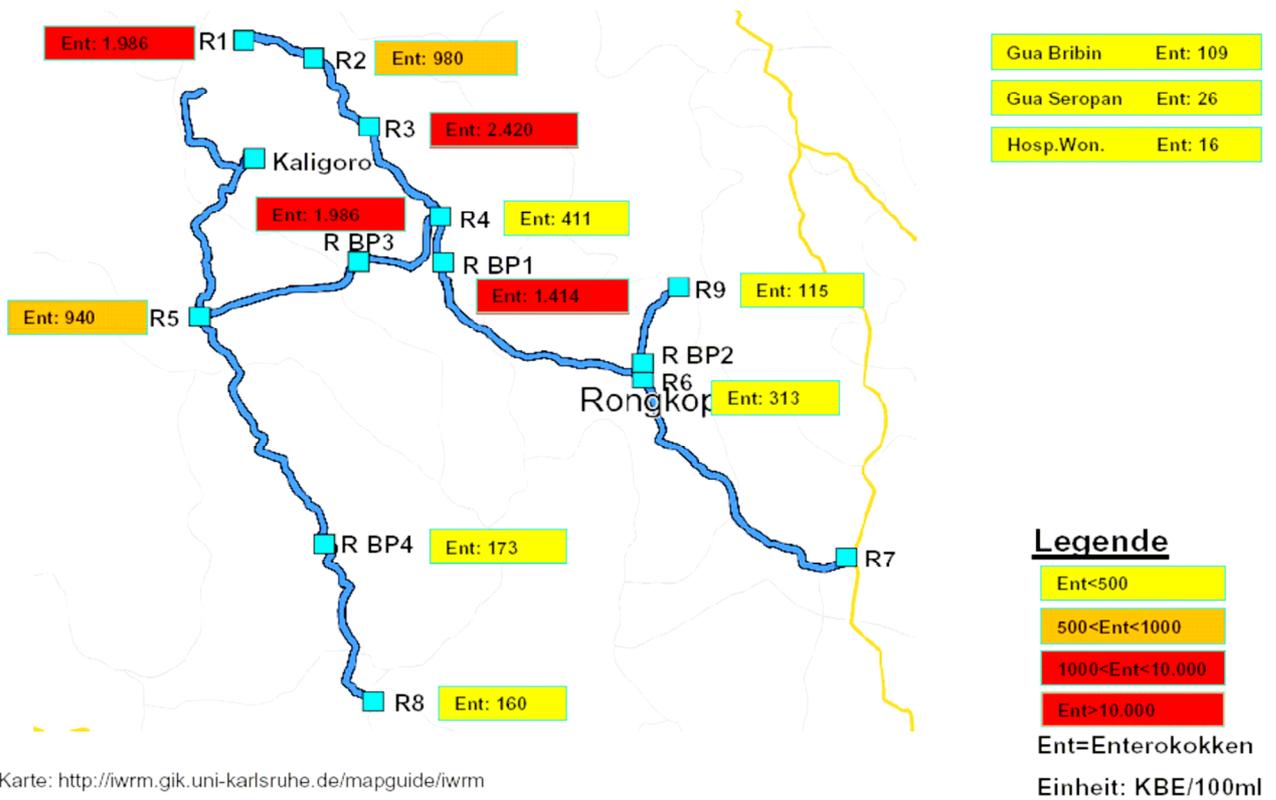
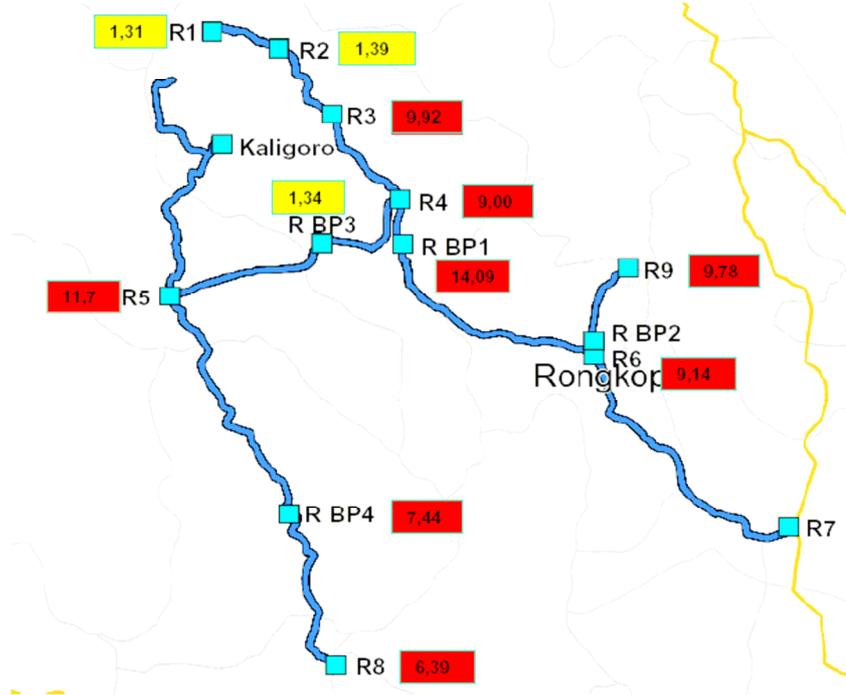


Tabelle 9-10: Ergebnisse der Messkampagne März 2010, chem Analyse

Behälter	Temperatur [°C]	pH [-]	Leitfähigkeit [µS/cm]	Sauerstoff [mg/l]	Trübung [NTU]
R1	28,3	7,14	527	7,27	1,31
R2	28,4	7,41	529	7,65	1,39
R3	28,9	7,31	525	7,67	9,92
R4	29,4	7,44	532	7,98	9,00
R5	28,8	7,68	522	7,06	11,71
R6	28,6	7,40	536	7,92	9,14
R8	30,0	7,65	522	8,14	6,39
R9	28,9	7,28	492	8,16	9,78
R BP1	29,7	7,56	527	7,70	14,09
R BP3	29,5	7,08	526	7,32	1,34
R BP4	29,7	7,71	533	8,65	7,44
Gua Bribin	29,2	7,34	527	7,86	3,94
Gua Seropan	27,5	6,88	598	5,71	1,36
Krankenhaus Wonosari	29,2	7,01	649	7,86	1,40

Abbildung 9-8: räumliche Verteilung der Trübungswerte, März 2010-05-06



Gua Bribin	3,94
Gua Seropan	1,36
Hosp.Won.	1,40

Legende

1 < T < 2
2 < T < 5
5 < T < 10
T > 10

GC=Gesamtcoliforme

Einheit: FNU

Karte: <http://iwrm.gik.uni-karlsruhe.de/mapguide/iwrm>

Abbildung 9-9: Laboranlage für die Keramikfiltration (Quelle: Firma Atech)



Abbildung 9-10: Testsäulen für die Langsandsandfiltration am IWG

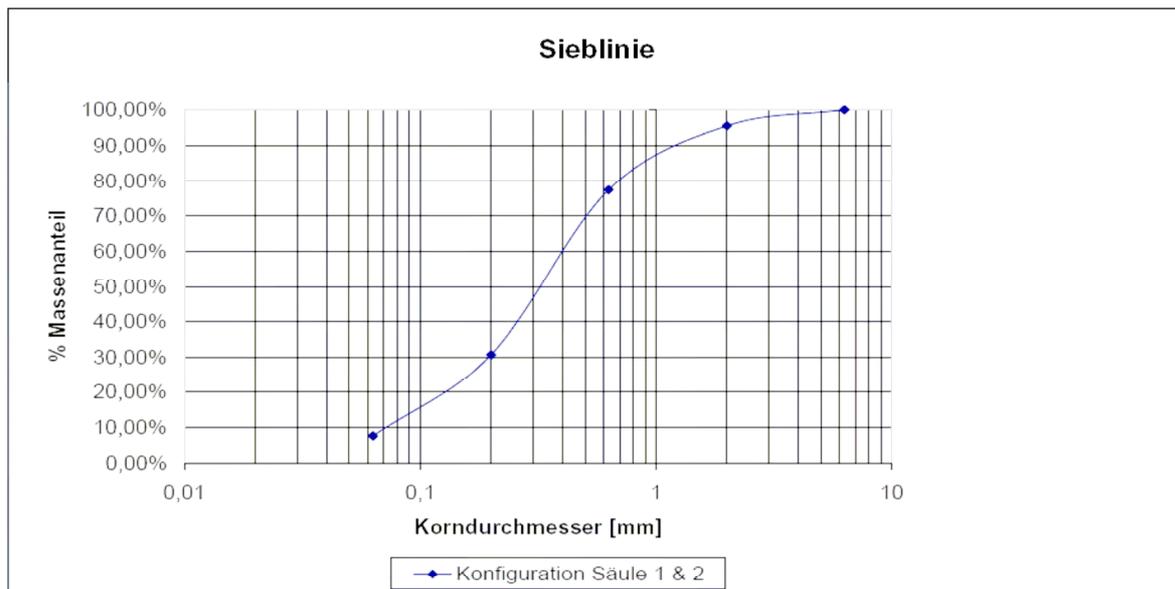


Tabelle 9-11: Ermittlung der Sieblinie für die Filtersäulen 1 & 2

Material Rheinsand und Lavasand

Kornfraktionen	Sorten Durchmesse	Massanteil [%]
Feinkies fG	2 - 6,3	4,5
Grobsand gS	0,63 - 2	18,1
Mittelsand mS	0,2 - 0,63	46,7
Feinsand fS	0,063 - 0,2	23
Ton + Schluff T+S	< 0,063	7,7

Probe	Rheifeinsand und Lavasand			
Gesamtgewicht m_t [g]	100			
Maschenweite [mm]	Rückstand			Summe % Durchgang je Sieb
	m_R [g]	$(m_R/\Sigma m_R)*100$	Summe % m_R je Sieb	
6,3	0	0,00%	0,00%	100,00%
2	4,5	4,50%	4,50%	95,50%
0,63	18,1	18,10%	22,60%	77,40%
0,2	46,7	46,70%	69,30%	30,70%
0,063	23	23,00%	92,30%	7,70%
0	7,7	7,70%	100,00%	0,00%
Summe Σm_R [g]	100	100,00%		
Verlust = $(m_t - \Sigma m_R)$ [g]	0,00	0%		

Abbildung 9-11: Sieblinie für die Filtersäulen 1 & 2

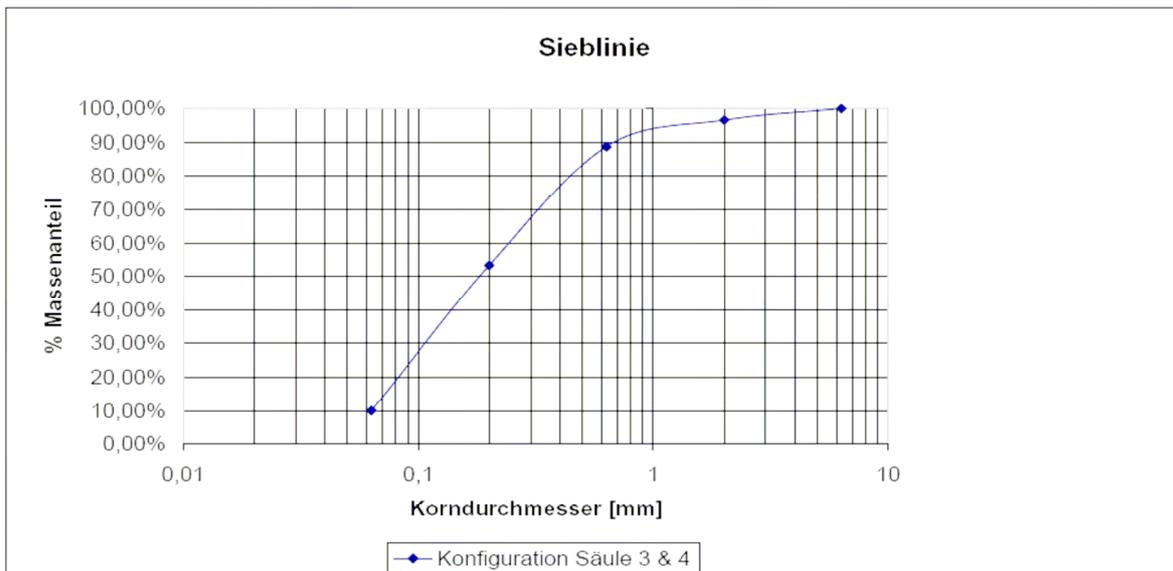
	Konfiguration Sandsäule 1 & 2
Effektiver Durchmesser d_{10} [mm]	0,071
Korndurchmesser d_{60} [mm]	0,4
Ungleichförmigkeitsgrad $U = d_{60}/d_{10}$	5,63

Tabelle 9-12: Ermittlung der Sieblinie für die Filtersäulen 3 & 4

Material Rheinsand und Lavasand

Kornfraktionen	Nenn-Durchmesser	Massanteil [%]
Feinkies fG	2 - 6,3	3,4
Grobsand gS	0,63 - 2	7,8
Mittelsand mS	0,2 - 0,63	35,5
Feinsand fS	0,063 - 0,2	43,3
Ton + Schluff T+S	< 0,063	10
		100

Probe	Rheinsand und Lavasand			
Gesamtgewicht m_t [g]	100			
Maschenweite [mm]	Rückstand			Summe % Durchgang je Sieb
	m_R [g]	$(m_R/\Sigma m_R)*100$	Summe % m_R je Sieb	
6,3	0	0,00%	0,00%	100,00%
2	3,4	3,40%	3,40%	96,60%
0,63	7,8	7,80%	11,20%	88,80%
0,2	35,5	35,50%	46,70%	53,30%
0,063	43,3	43,30%	90,00%	10,00%
0	10	10,00%	100,00%	0,00%
Summe Σm_R [g]	100	100,00%		
Verlust = $(m_t - \Sigma m_R)$ [g]	0,00	0%		

Abbildung 9-12: Sieblinie für die Filtersäulen 3 & 4

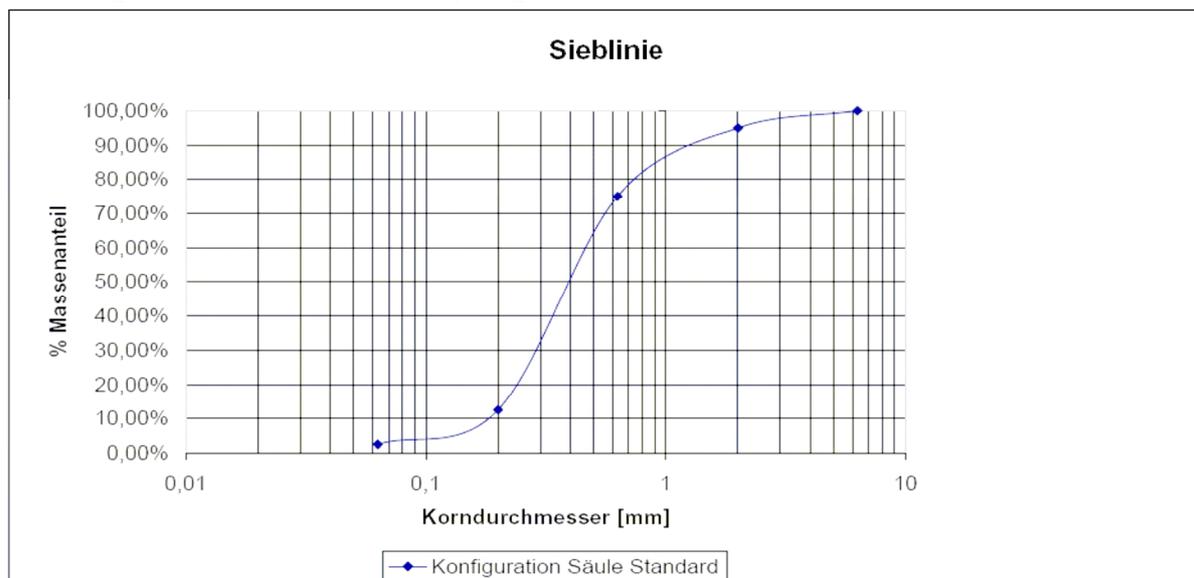
Konfiguration Sandsäule 3 & 4	
Effektiver Durchmesser d_{10} [mm]	0,063
Korndurchmesser d_{60} [mm]	0,25
Ungleichförmigkeitsgrad $U = d_{60}/d_{10}$	3,97

Tabelle 9-13: Ermittlung der Sieblinie für den ursprünglichen Rheinsand

Material ursprüngliche Rheinsand

Kornfraktionen	Äquivalent Durchmesser [mm]	Massanteil [%]
Feinkies fG	2 - 6,3	5
Grobsand gS	0,63 - 2	20
Mittelsand mS	0,2 - 0,63	62,5
Feinsand fS	0,063 - 0,2	10
Ton + Schluff T+S	< 0,063	2,5

Probe	Rheifeinsand und Lavasand			
Gesamtgewicht m_t [g]	100			
Maschenweite [mm]	Rückstand			Summe % Durchgang je Sieb
	m_R [g]	$(m_R/\Sigma m_R)*100$	Summe % m_R je Sieb	
6,3	0	0,00%	0,00%	100,00%
2	5	5,00%	5,00%	95,00%
0,63	20	20,00%	25,00%	75,00%
0,2	62,5	62,50%	87,50%	12,50%
0,063	10	10,00%	97,50%	2,50%
0	2,5	2,50%	100,00%	0,00%
Summe Σm_R [g]	100	100,00%		
Verlust = $(m_t - \Sigma m_R)$ [g]	0,00	0%		

Abbildung 9-13: Sieblinie für den ursprünglichen Rheinsand

	ursprüngliche Rheinsand
Effektiver Durchmesser d_{10} [mm]	0,18
Korndurchmesser d_{60} [mm]	0,46
Ungleichförmigkeitsgrad $U = d_{60}/d_{10}$	2,56