

## 1. Einleitung

Mit dem Versuch Polioviren in Wasserproben nachzuweisen, verlagerte sich die Bedeutung der Virologie über die Diagnostik von menschlichen Probenmaterialien, hin zu anderen potentiellen Übertragungsmedien [5]. Seit dem Beginn der Untersuchungen in den fünfziger Jahren haben andere enterale Viren und ihre Variationen [13; 56; 36], die zu Gastroenteritis und Hepatitis Ausbrüchen führen können, die Enteroviren in ihrer Bedeutung als Indikatorgruppe im Umweltwasser ersetzt. Es ist als Tatsache zu sehen, daß Wasser ein Transportmedium für die Übertragung von Krankheiten ist [26]. Ein Ergebnis der verbesserten Wasseraufbereitungstechnologien und der Gebrauch von Wasserqualitätsindikatoren ist dafür verantwortlich, daß durch kontaminiertes Wasser verursachte Erkrankungen im Laufe der letzten Jahrzehnte deutlich abgenommen haben. Und doch besteht das Problem weiterhin, nicht nur in den Entwicklungsländern. In den Vereinigten Staaten konnten 10% der beobachteten Virusausbrüche auf virale Erreger zurückgeführt werden, doch die wirkliche Rate liegt wahrscheinlich deutlich höher [17].

Enterale Viren werden fäkal-oral übertragen und gelangen mit dem Fäzes in die Abwassersysteme. Dabei belegen Studien, daß in einem Gramm einer positiven Patientenstuhlprobe zwischen  $10^5$  und  $10^{11}$  Viruspartikel in der Regel detektiert werden können [5]. Untersuchungen von Lopez-Pila und Szewzyk [34] aber auch Dumke und Feuerpfeil [15] haben gezeigt, daß im Falle der Enteroviren zwischen 10 bis 50 Viruspartikel bereits ausreichen können, um zu einer Infektion der exponierten Personen mit dem Virus zu führen.

Zu den enteralen Viren gehören neben den Enteroviren unter anderem auch Noroviren, Astroviren, Adenoviren, Rotaviren und das Hepatitis A Virus, welche zu Erkrankungen mit Gastroenteritis, Meningitis, Myocarditis und Hepatitis führen können [6]. Diese Erreger wurden nicht nur im Abwasser detektiert [49; 41], sondern auch in Flußwasser [23], Oberflächenwasser [33; 10] und Meerwasser [14]. Auch Verunreinigungen von aufgearbeitetem Trinkwasser und Grundwasser [29; 51; 4] konnten beobachtet werden. So ist ein Fall aus Deutschland (Oschatz, Sachsen) bekannt, wo es zu einer Norovirus Epidemie kam, weil ein Trinkwasser führendes Rohr versehentlich mit Abwasser aus einer Sickergrube kontaminiert wurde. Ebenfalls aufsehenerregend war allerdings auch der Fund von noroviralen Sequenzen in Mineralwasser [3; 19] mittels RT-PCR, deren Herkunft jedoch nicht

erklärt werden konnte. Dies zeigt aber, wie wichtig die „Überwachung“ von Oberflächen- und Abwasser ist, da die Risiken bei einer intensiven Nutzung durch den Wassersport [52], anderen Freizeitaktivitäten [48] aber auch im Zusammenhang mit der Nahrungsmittelindustrie [38;37] potentiell vorhanden sind und nicht vernachlässigt werden dürfen.

Zur Beurteilung der Wasserqualität werden jedoch die Proben lediglich auf die Anwesenheit von fäkalen, bakteriellen Indikatororganismen untersucht. Als Indikatoren für eine Gewässerverunreinigung durch fäkale Kontaminationen werden z.B. Somatische Coliphagen, F-spezifische Bakteriophagen und *Bacteroides fragilis* Bakteriophagen detektiert aber auch *E. coli* und fäkale Streptokokken [18]. Das Auftreten dieser Organismen wird im allgemeinen gleichgesetzt mit dem gleichzeitigen Vorkommen von enteralen Viren [23]. Jedoch ist die Abwesenheit bzw. das nur in geringer Konzentration auftreten solcher Indikatoren keine Garantie für eine gleichzeitige Abwesenheit von enteralen Viren [49]. Dies bedeutet auch, daß über eine Neudefinition dieser Hygieneindikatoren nachgedacht werden sollte und, daß im Gegenzug die Bedeutung der Nachweisbarkeit bestimmter Viren stärker hervorgehoben werden muß. Als ein möglicher Vertreter für die enteralen Viren wäre der Nachweis von Enteroviren mittels RT-PCR aber auch durch eine Anzucht auf Zellen. Dies ist sicher vorteilhafter, da Viren im allgemeinen resistenter gegenüber den Inaktivierungsprozessen, anders als fäkale Mikroorganismen, im Klärwerk sind [2]. Jedoch ist der Nachweis von Enteroviren an spezielle Labortypen gebunden und auch die Anzucht von Enteroviren ist zwar in der Regel problemlos möglich, jedoch sehr zeitaufwendig. Es wird daher noch viel Diskussionsbedarf bestehen, bevor es zu weiteren Überlegungen und auch Entscheidungen bezüglich der enteralen Viren als Indikatoren für eine Gewässerverschmutzung kommt.

### **Untersuchungsgebiet Werbelin See**

Durch die Stilllegung von Bergbaugruben Europa weit und speziell in Deutschland ist die Flutung von Tagebaurestlöchern mit Oberflächenwasser eine der Methoden zur Rekultivierung dieser Gelände. Die favorisierte Strategie in diesem Zusammenhang ist die Flutung dieser Löcher mit Oberflächenwasser, das von nahegelegenen Flüssen stammt. Die hygienischen Bedingungen des gefluteten Wassers und die

Qualität des Wassers im See ist von großem Interesse für eine spätere Verwendung, z.B. für die Nutzung als Badegewässer und Naherholungsgebiet.

Bei dem untersuchten Tagebaurestsee Werbelin See handelt es sich um ein Tagebaurestloch in der Übertagebergbauregion Delitzsch in Sachsen, der seit 1998 mit Wasser aus dem Fluß Neue Luppe geflutet wird. Pro Tag fließen etwa 17000 m<sup>3</sup>/d in den Werbelin See, der flußabwärts von der Kläranlage Leipzig-Rosenthal entfernt liegt.

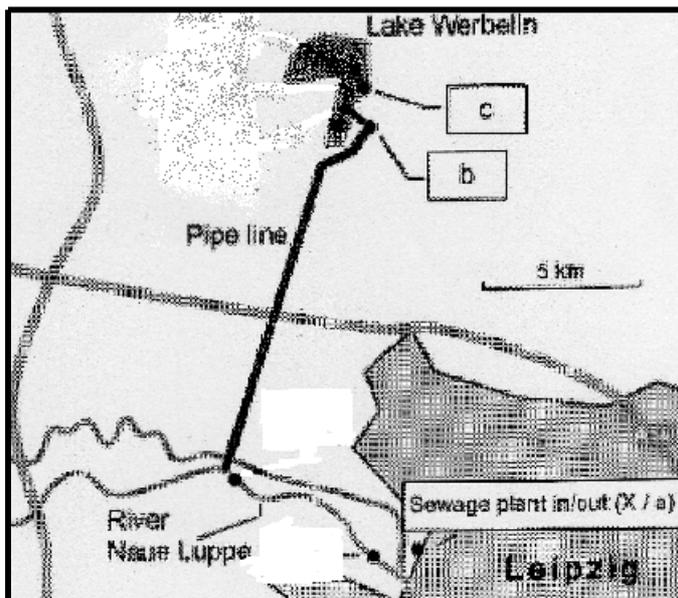


Abb. 1: Bereich des Werbelin Sees mit den Entnahmestellen. Abwasserproben wurden vor (Punkt X, 50 ml) und nach (Punkt A, 5l) der Kläranlage zweimal monatlich bzw. wöchentlich gesammelt. Das gereinigte Wasser wird in die Neue Luppe geleitet, von der Teile des Wassers mittels einer Pipeline zum See transportiert wird. Am Ende der Pipeline (Punkt B, 10l) und am Ostufer des Sees (Punkt C, 10l) wurden weitere Proben entnommen. Wie auch am Punkt A werden die Proben B und C wöchentlich gesammelt und auf enterale Viren untersucht.

Im Zuge der Promotionsarbeit soll ein Verfahren zur Isolierung von viralen Nukleinsäuren in Abwasser mit Hilfe von paramagnetischen Polystyrolkugeln der Sorte Dynabeads untersucht und optimiert werden. Betrachtet werden diese Bedingungen am Beispiel des Enterovirus Poliovirus Sabin 1, stellvertretend für die Enteroviren, in Bezug auf die Effizienz des direkten bzw. indirekten Einfangs, des Lysevermögens der intakten Viren, sowie der Konditionen für das Abkoppeln der isolierten Nukleinsäure von der Trägersubstanz für die 5' nicht codierende Region (5'NCR). Es soll außerdem untersucht werden, ob die Bedingungen auch für andere Genomabschnitte ihre Gültigkeit besitzen, sowie über die Anwendungsmöglichkeiten,

bezüglich anderer enterale Viren diskutiert werden. Nach einer Prüfung der PCR Bedingungen, soll eine Untersuchung von fünf Abwasserproben auf Enteroviren mit Hilfe Dynabeads bzw. mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit erfolgen, und die Vor- und Nachteile der zwei unterschiedlichen Isolierungssysteme herausgestellt werden. Das geeignetste Verfahren wird für den Nachweis von Ab- und Oberflächenwasserproben aus dem Raum Leipzig eingesetzt. Während des Untersuchungszeitraumes vom Oktober 2002 bis Dezember 2004 sollen 327 Proben auf das Vorkommen von gastroenteralen Viren (Adenoviren AdV, Astroviren AstV, Enteroviren EntV, Hepatitis A HAV, Noroviren NoV und Rotaviren A RoV) mittels PCR untersucht werden. Stichpunkte der in der PCR positiven Proben werden mittels Sequenzierung untersucht, gegebenenfalls für NoV, EntV und AstV positiven Proben zusätzlich durch real-time PCR die Viruslast der Proben bestimmt. Die mögliche Infektiösität der nachgewiesenen Viren erfolgt durch eine Anzucht von ausgewählten EntV haltigen Proben auf Zellen.