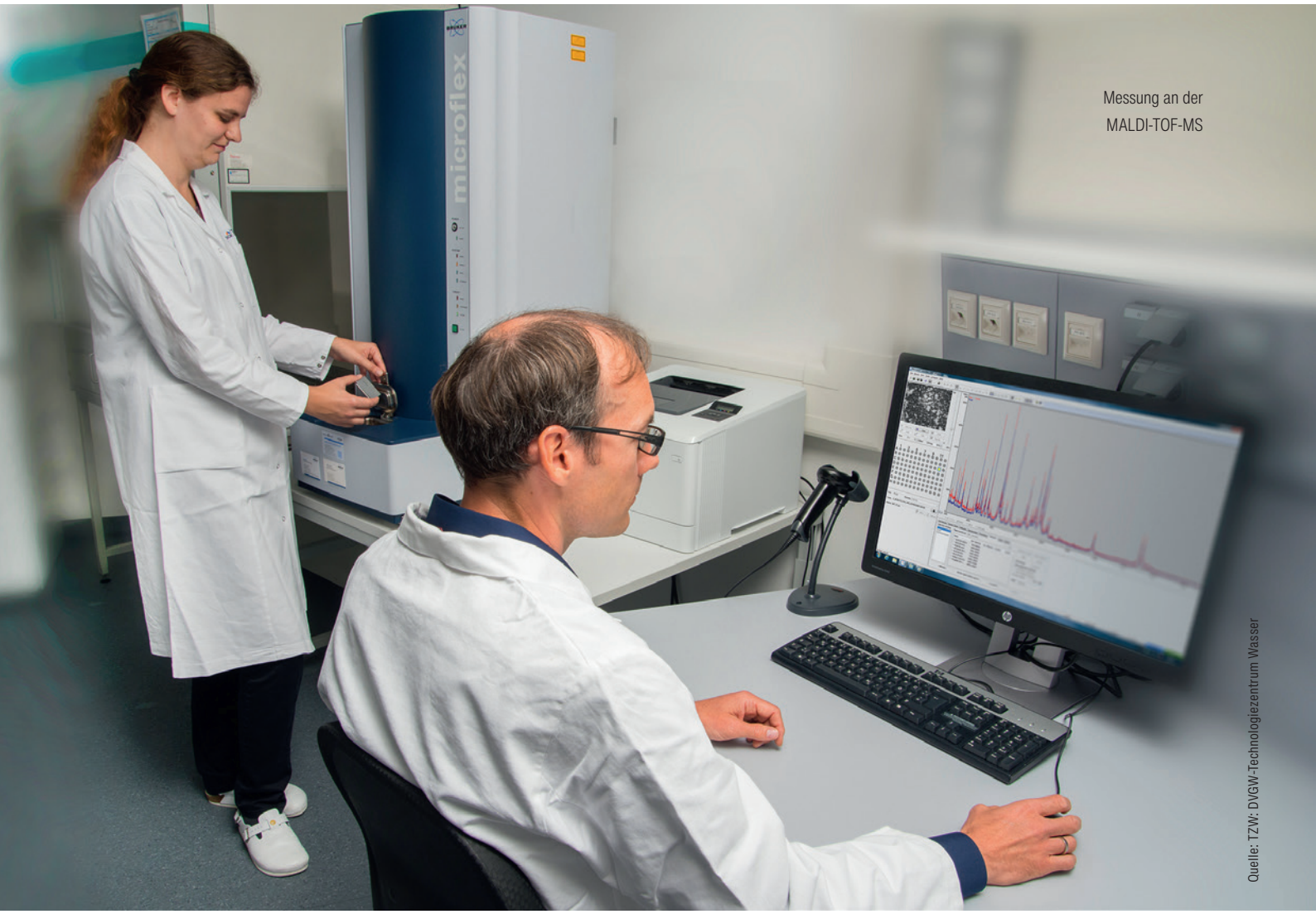


Messung an der MALDI-TOF-MS

Quelle: TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser

Neue Verfahren in der mikrobiologischen Wasseranalytik

Kultivierungsbasierte Methoden stellen zwar den Goldstandard der mikrobiologischen Wasserqualitätsanalytik dar, dennoch können viele weitergehende Fragestellungen im Wasserbereich durch die alleinige Anwendung dieser Standardmethoden nur unzureichend beantwortet werden. Neue Möglichkeiten in der kultivierungsunabhängigen und molekularbiologischen Analytik haben viele Fragestellungen in der mikrobiologischen Wasseranalytik zugänglich gemacht, die noch vor wenigen Jahren unlösbar waren. Der vorliegende Fachbeitrag stellt die entsprechenden neuartigen Methoden und Verfahren vor und beurteilt sie hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten für die deutschen Trinkwasserversorgungsunternehmen.

von: Dr. Claudia Stange, Dr. Michael Hügler, Dr. Johannes Ho, Prof. Dr. Andreas Tiehm
(alle: TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser) & Dr. Andreas Nocker (IWW Zentrum Wasser)

In den letzten Jahren hat im Bereich der Analytik von mikrobiologischen Indikatorparametern und Krankheitserregern eine rasante Entwicklung stattgefunden. Gleichzeitig basiert die routinemäßige und akkreditierte Überwachung der mikrobiologisch-hygienischen Wasserqualität von Trink-, Brauch- und Badewasser nahezu exklusiv auf den klassischen Kulturverfahren. Diese Methoden sind ein wesentlicher Bestandteil des bewährten Wasserqualitätsmanagements zum Schutz der menschlichen Gesundheit. Sie haben dennoch ihre Grenzen, wenn es um weitergehende Fragestellungen geht, wie z. B. bei der Ursachensuche von Verschmutzungen.

Die sichere Identifizierung von Mikroorganismen und Eintragsquellen ist ein essenzielles Werkzeug für die Ursachenforschung und Kontaminationsvermeidung und damit für das Risikomanagement und eine sichere Wasserversorgung. Es stellt sich daher die Frage, wie die mikrobiologische Überwachung des Trinkwassers zukünftig aussehen wird. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen des DVGW-geförderten Projektes MoVe (Erweiterte Verfahren für die Überwachung mikrobiologischer Parameter beim Trinkwassermonitoring) die aktuell verfügbaren Analysetechniken und -verfahren für mikrobiologische Parameter zusammengestellt [1]. Ziel des Projektes war es, Aussagen zur zukünftigen Entwicklung der Analytik mikrobiologischer Parameter zu machen, Handlungsempfehlungen für Wasserversorger zu geben und diese bei der Kommunikation mit den Gesundheitsämtern/-behörden und der Vermittlung von methodischem Fachwissen zu unterstützen. Als nützliche Methoden für besondere Fragestellungen konnten hier Verfahren, die auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basieren, die Durchflusszytomtrie, die MALDI-TOF-Massenspektroskopie sowie leistungsfähige Sequenzierungstechniken identifiziert werden. Diese Verfahren wurden hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten für die Trinkwasserversorger beurteilt.

Neue Verfahren und ihr Potenzial

Mit der rasanten Entwicklung der Life Sciences, der Bio- und Informationstechnologie sowie der Automatisierungstechnik sind innovative Möglichkeiten in der molekularen Wasseranalytik entstanden. Viele Fragestellungen, die noch vor wenigen Jahren in der mikrobiologischen Wasseranalytik unlösbar waren, sind durch diese modernen Verfahren einer Analyse zugänglich geworden. Die sich weiterentwickelnden molekularen Technologien bieten eine wachsende Anzahl von technischen Optionen für die qualitative und quantitative Erfassung von mikrobiologischen Schlüsselparametern, wie z. B. wasserbürtigen Krankheitserregern, Antibiotikaresistenzgenen und der Dynamik mikrobieller Gemeinschaften. Im Projekt MoVe wurden diese molekularen Diagnoseinstrumente zur Erfassung mikrobiologischer Parameter im Wasser hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und Aussagekraft betrachtet. Insgesamt gibt die Studie einen umfassenden Überblick über diese neuartigen Methoden.

In der Praxis können je nach Fragestellung verschiedene Methoden synergistisch eingesetzt werden. Bislang werden diese neuen Methoden noch nicht umfangreich genutzt. Gründe hierfür sind u. a. die Kosten für die Anschaffung der Geräte und die Weiterbildung des Personals, die teilweise höheren Kosten der spezifischen Analysen sowie die noch fehlenden Erfahrungen der Wasserversorgungsunternehmen, der Gesundheitsbehörden und der Analyselaboratorien. Um aus den Daten richtige und aussagekräftige Schlüsse ziehen zu können, ist daher die Interpretation der Ergebnisse durch Personen mit guten methodischen Kenntnissen erforderlich.

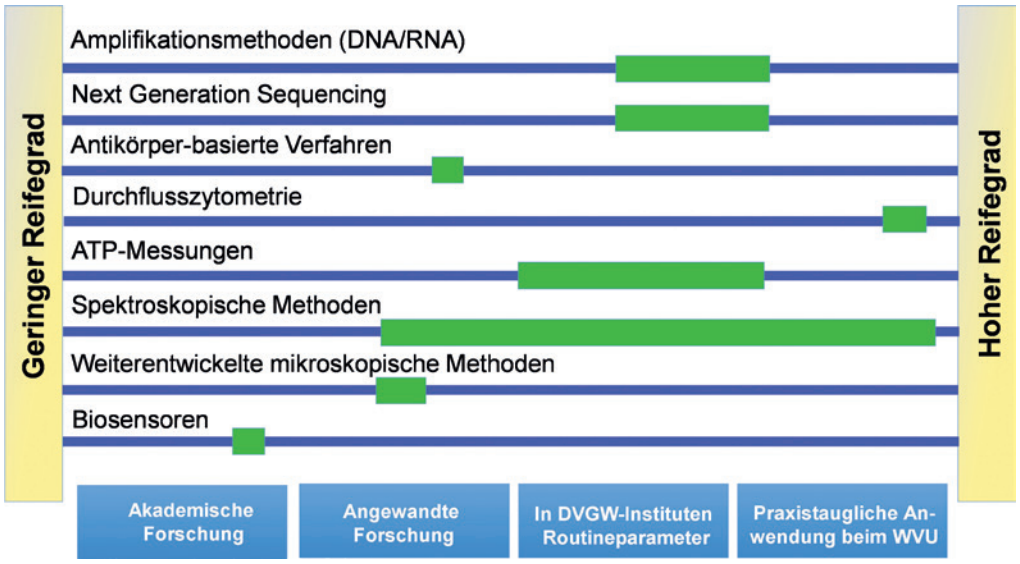
Die molekularen Methoden werden ständig weiterentwickelt, um den ▷

Die **SHT Sanitär- und Heizungstechnik, Ausgabe 1/25**, enthält Beiträge zu den Themen Sanitär-, Heizungs- sowie Lüftungstechnik und stellt Referenzobjekte sowie neue Produkte und Normen aus diesen Bereichen vor. Lesen Sie darüber hinaus u. a. mehr zu den Themen:

- **Sanitär**
  Gesundheit durch technischen Fortschritt
- **Heizung**
  Rendemix: Pilotprojekt aus Petting
- **Klima**
  Frischluftprojekt für eine gesunde Entwicklung

Weitere Nachrichten, Termine und Informationen unter **www.sht-online.de**.

Kostenloses Probeheft unter **vertrieb@krammerag.de**.



Quelle: die Autoren

Abb. 1: Reifegrad verschiedener Analyseverfahren

verschiedenen Anwendungen und Anforderungen gerecht zu werden. Zum jetzigen Zeitpunkt weisen die betrachteten Verfahren sehr unterschiedliche Reifegrade auf (**Abb. 1**): Während beispielsweise die Durchflusszytometrie bereits von Wasserversorgungsunternehmen zur Erfassung der Gesamtzellzahl eingesetzt wird, sind Biosensoren noch der akademischen Forschung zuzuordnen.

Anwendungsfelder

Auf der Grundlage eigener Erfahrungen und der verfügbaren Literatur werden im Folgenden molekularbiologische Verfahren vorgestellt, die für verschiedene Anwendungsbereiche bereits heute einen deutlichen Mehrwert darstellen:

- Die quantitative real-time PCR (qPCR) ermöglicht den quantitativen spezifischen Nachweis von Mikroorganismen (wie z. B. von wasserbürtigen Krankheitserregern) in Wasserproben. Dies betrifft u. a. pathogene Viren, deren kultureller Nachweis sehr aufwendig ist oder für die kein kultureller Nachweis zur Verfügung steht [2]. Sind Bakterien nicht kultivierbar oder haben stressbedingt ihre Kultivierbarkeit zeitweilig verloren (viable but not culturable, kurz: VBNC), stellen molekularbiologische Verfahren zurzeit die einzige Möglichkeit dar, diese Bakterien zu erfassen. Die Kombination einer Probenvorbehandlung mit einem „Lebendfarbstoff“ (z. B. Propidiummonoazid (PMA)) vor der Extraktion von Nukleinsäuren und der eigentlichen PCR kann eine Unterscheidung zwischen intakten und nicht intakten Bakterien oder Viren ermöglichen [3]. Stoffwechsel-aktive Bakterien können auch über ihre Messenger-RNA mithilfe der Reverse Transkriptase-qPCR nachgewiesen werden [4]. Beim Einsatz der qPCR in der Wasseranalytik ist zu beachten, dass die Bakterien oder Viren in einem ersten Schritt immer konzentriert bzw. angereichert und die Nukleinsäuren extrahiert und aufgereinigt werden müssen. Diese Vorbehandlung hat einen großen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit. Die PCR-basierten Verfahren finden langsam Eingang in die Routineanalytik, ein Beispiel hierfür ist der Nachweis von Legionellen. Die Kulturmethode nach ISO 11731 ist derzeit das offizielle Verfahren für den Nachweis von Legionellen in Wasser. Bekannte Nachteile dieses Tests sind u. a., dass die Ergebnisse erst nach zehn bis 14 Tage vorliegen und eine zusätzlich Serotypisierung der Kolonien notwendig ist. Mit dem PCR-Nachweis von Legionellen in Wasserproben können diese Nachteile umgangen werden; eine entsprechende Vornorm (ISO/TS 12869:2019) ist verfügbar. Das Verfahren lässt sich darüber hinaus auch für die Bestätigung von Legionella-Kolonien nach ISO 11731 einsetzen. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist der Nachweis von Viren zur Durchführung einer quantitativen mikrobiellen Risikobewertung. Diese Bewertung beruht darauf, das Risiko für das Vorkommen von Krankheitserregern in einem Trinkwasser zu berechnen, indem modellhafte Krankheitserreger im Rohwasser quantitativ bestimmt und deren Rückhalt durch eine Aufbereitungsstufe durch den

Rückhalt der zugehörigen Indikatoren modelliert werden [5]. Für die Modellierung werden entsprechende Daten zu den viralen Erregern benötigt.

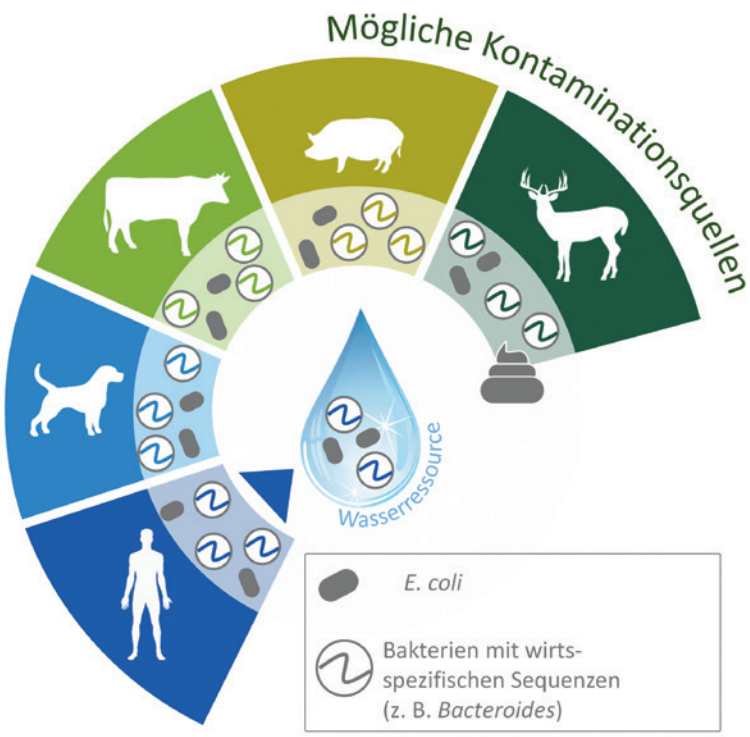
- Als Alternative zur qPCR kann die digitale PCR (dPCR) zum Nachweis von Krankheitserregern eingesetzt werden [6]. Grundsätzlich können mit der dPCR zwar die gleichen Parameter wie mit der qPCR erfasst werden, sie hat gegenüber der qPCR aber einige Vorteile: So ermöglicht sie eine genaue Quantifizierung ohne Kalibrierung des Systems und eine höhere Sensitivität, Präzision und Reproduzierbarkeit. Außerdem ist die Quantifizierung mittels dPCR in der Regel unempfindlicher gegenüber Inhibitionseffekten.
- Die qPCR und dPCR werden seit einigen Jahren auch zur Bestimmung der Prävalenz ausgewählter Antibiotikaresistenzgene in verschiedenen Umweltreservoiren eingesetzt [7, 8]. Es handelt sich dabei um Verfahren, die das Screening spezifischer Gene ermöglichen. Hierfür werden spezifische Oligonukleotide als Primer verwendet. Die qPCR bzw. dPCR ist ein geeigneter Ansatz für spezifische Überwachungsprogramme. Für die Betreiber vor Ort kann die Quantifizierung mittels PCR von Vorteil sein, da sie schnell durchführbar ist. Um zuverlässige Daten für eine Risikobewertung zu erhalten, kann der Nachweis vollständiger Antibiotikaresistenzgene mittels Long Amplicon-PCR anstelle kurzer Genfragmente wichtige zusätzliche Informationen liefern [9].
- Im Rahmen der Wasseraufbereitung oder auch bei Sanierungsmaßnahmen in Grundwasserleitern ist die Kenntnis über das Vorkommen und die Aktivität bestimmter Bakteriengruppen essenziell, um die gewünschte biologische Aufbereitung zu erreichen. Für diese Gruppen stehen jedoch oft keine geeigneten oder schnell anwendbaren kulturellen Nachweisverfahren zur Verfügung. Hier kann ein qualitativer oder quantitativer PCR-Nachweis von funktionellen Genen für spezifische Stoffwechselleistungen wichtige Informationen liefern. Beispiele für solche Stoffwechselleistungen sind: Abbau organischer Schadstoffe (Rohwasserschutz), Nitrifikation (Ammoniumoxidation) und Denitrifikation (Nitratreduktion) [4] oder die Bildung von Algentoxinen. Durch den Nachweis spezifischer Messenger-RNA ist auch ein direkter Aktivitätsnachweis möglich.
- Neben der qPCR sind die Next Generation Sequencing (NGS)-Technologien weit verbreitete kulturunabhängige Ansätze zur Erfassung von Bakterien und deren Gene (wie z. B. Antibiotikaresistenzen). NGS ist eine Methode, die die gesamte bakterielle Gemeinschaft und ihrer Gene abdeckt und damit einen breiten Überblick ermöglicht. Dies wird durch die Verknüpfung von DNA-Sequenzanalysen mit Datenbanken erreicht. Es ist hervorzuheben, dass die qPCR-Methode empfindlicher und für die absolute Quantifizierung von Zielgenen geeignet ist, während NGS das Potenzial hat, einen Überblick über die Gene und ihre jeweilige relative Häufigkeit zu liefern [10]. Durch den Einsatz von NGS-basierten Hochdurchsatzverfahren kann die mikrobielle Gemeinschaft von Wasserproben entschlüsselt werden. Das Verfahren erleichtert die Bewertung der mikrobiellen Wasserqualität und kann zur Klärung spezieller Fragestellungen (wie z. B. der Identifizierung der wichtigsten anthropogenen oder umweltbedingten Faktoren, die für Schwankungen im Ökosystem verantwortlich sind) eingesetzt werden.
- Die Durchflusszytometrie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen diagnostischen Werkzeug entwickelt und findet zunehmend routinemäßige Anwendung in der Praxis. In Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Methode eine schnelle Erfassung von Bakterienzahlen und charakteristischen Populationsmustern [11]. Obwohl der unspezifische Charakter der Fluoreszenz-Farbstoffe keine Aussagen über hygienisch relevante Bakterien zulässt, können Veränderungen der Bakterienkonzentrationen, mikrobiologische Fingerabdrücke und das Aufkeimungspotenzial wichtige Hinweise auf Veränderungen und technische Einflussfaktoren liefern [12]. Der Nutzen liegt in der Möglichkeit einer schnellen Prozesskontrolle.
- Generell besteht ein großer Bedarf an mikrobiologischen Online-Analyseverfahren. Für Online-Verfahren kommen verschiedene Messprinzipien infrage. Dies sind die ▷

INFORMATION

Am 2. April 2025 wird am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe ein Workshop zu den neuen Verfahren, ihren Einsatzgebieten und Vorteilen stattfinden. Alle Interessentinnen und Interessenten sind herzlich eingeladen, an diesem Workshop teilzunehmen; weitere Informationen und Anmeldemöglichkeiten sind online über den nebenstehenden QR-Code möglich. Darüber hinaus werden sich die DVGW-Institute auch in Zukunft der Weiterentwicklung mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden widmen.

Durchflusszytometrie, die eine Quantifizierung der Gesamtzellzahl im Wasser erlaubt, sowie Methoden, die die mikrobielle Aktivität über die Messung der Enzymaktivität oder die Messung von ATP, dem universellen Energieträger aller Lebewesen, erfassen. Erfahrungen mit entsprechenden Messsystemen werden derzeit im Rahmen des DVGW-Forschungsprojektes TRINKcontrol gesammelt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese mikrobiellen Parameter eine sinnvolle und schnell messbare Ergänzung zu den bisher vorgeschriebenen Indikatorparametern darstellen können.

- Die derzeit in der Qualitätskontrolle eingesetzten mikrobiologischen Methoden sind geeignet, eine Beeinträchtigung durch fäkale Verschmutzungen nachzuweisen, geben aber keine Auskunft über die Herkunft der Kontamination. Diese Information ist jedoch für gezielte Schutzmaßnahmen unerlässlich. Mithilfe sogenannter Microbial Source Tracking (MST)-Methoden ist es möglich, die Herkunft solcher Verunreinigungen zu ermitteln [8, 13]. Dabei werden in den Wasserproben definierte DNA-Abschnitte, die spezifisch für menschliche oder tierische Exkremente sind, mittels PCR-basierter Verfahren erfasst (**Abb. 2**).
- Mit der MALDI-TOF-Massenspektroskopie wurde in den letzten Jahren eine neue Methode zur schnellen Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt. Diese im klinischen Bereich fest etablierte Methode besitzt auch für den Trinkwasserbereich ein erhebliches Potenzial [4] und wird derzeit schon häufig eingesetzt. Der große Vorteil liegt in der Schnelligkeit der Methode: Liegen Bakterienisolate vor, so ist die Identifizierung vieler Isolate in kurzer Zeit (Stunden) möglich. Bei Nachweis von Indikatorbakterien kann die schnelle Speziesbestimmung noch am Tag des Befundes wichtige Hinweise auf die Eintragsquelle und die hygienische Bewertung liefern (**Abb. 3**) [14–17]. So können Abkochgebote und damit eine negative Außenwirkung vermieden und das Vertrauen der Verbraucherinnen und Verbraucher in die Trinkwasserqualität gestärkt werden. Die Bewertung der Ergebnisse muss jedoch immer im fachlichen Kontext erfolgen, da Isolate aus Trinkwasserproben in der Regel anders zu bewerten sind als z. B. Isolate aus medizinischen Proben.



Quelle: die Autoren

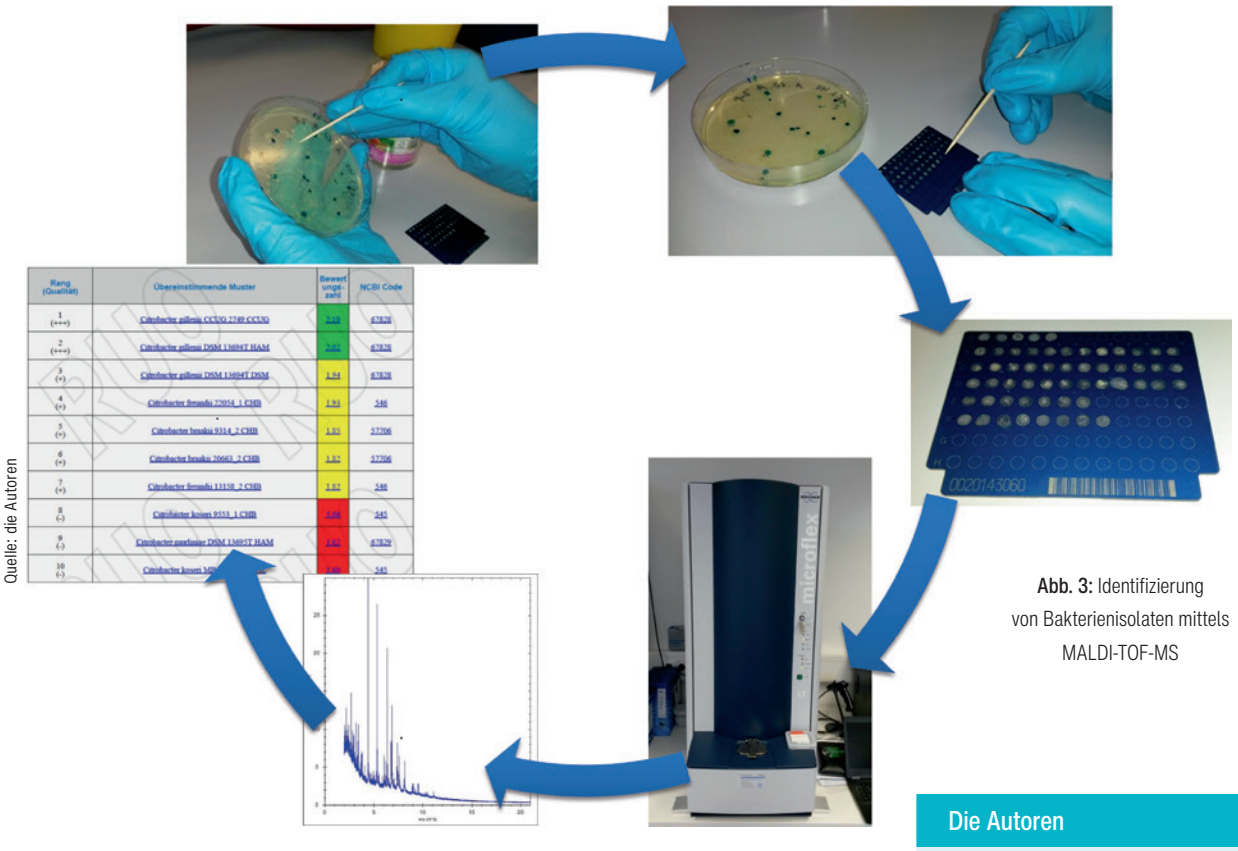
Abb. 2: Prinzip des Microbial Source Trackings. Sowohl *E. coli*-Bakterien (ovale Symbole) als auch *Bacteroides*-Bakterien (runde Symbole) werden durch alle Warmblüter ausgeschieden. *Bacteroides*-Bakterien weisen eindeutige Unterschiede in ihrer genetischen Information auf (dargestellt durch die unterschiedlichen Farben), die eine Herkunftsbestimmung von fäkalen Einträgen in Gewässer ermöglichen.

Fazit und Ausblick

Die Anwendung neuer mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden im Wasserbereich hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Diese neuen Methoden ergänzen die klassischen Verfahren und liefern wichtige zusätzliche Informationen. Eine häufigere und breitere Anwendung dieser Instrumente wird durch die zunehmende Erfahrung der Wasserversorgungsunternehmen, Gesundheitsbehörden und Analyselaboratorien mit den Analyseverfahren gefördert. Um diese neuen Möglichkeiten möglichst schnell adäquat nutzen zu können, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen wasserwirtschaftlicher Praxis, praxisorientierten Instituten und universitärer Forschung notwendig. Die verschiedenen Methoden zeichnen sich durch unterschiedliche Anwendungsbereiche aus. Es gibt keine allgemeingültigen Untersuchungsmethoden, sondern für bestimmte Fragestellungen geeignete „Werkzeuge“.

Danksagung

Die Autorinnen und Autoren danken dem DVGW für die finanzielle Förderung des Projektes „MoVe – Erweiterte Verfahren für die Überwachung mikrobiologischer Parameter beim Trinkwassermonitoring“ (DVGW-Zukunftsprogramm Wasser, Förderkennzeichen W 202214).



Quelle: die Autoren

Abb. 3: Identifizierung von Bakterienisolaten mittels MALDI-TOF-MS

Literatur

[1] Stange, C., Hügler, M., Ho, J., Stelmaszyk, L., Tiehm, A., Nocker, A., Bendinger, B.: Überwachung mikrobiologischer Parameter beim Trinkwassser-monitoring (DVGW Zukunftsprogramm Wasser – W 202214) – Abschlussbericht, 2024.

[2] Otto, J., Jurzik, L., Schneider, M., Stange, C., Hamza, I., Preuß, G., Tiehm, A.: Entwicklung und Validierung von molekularbiologischen PCR-Methoden zum quantitativen Nachweis von hygienerelevanten Bakterien und Viren im Wasser, in: DVGW energie | wasser-praxis, Ausgabe 10/2015, S. 58–62.

[3] Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., Camper, A. K.: Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology, in: Applied and environmental microbiology, vol. 73: 5111–5117, 2007.

[4] Schäfer, C., Ho, J., Lotz, B., Armbruster, J., Putz, A., Zou, H., Li, C., Ye, C., Zheng, B., Hügler, M., Tiehm, A.: Evaluation and application of molecular denitrification monitoring methods in the northern Lake Tai, China, in: Science of the total environment, vol. 663: 686–695, 2019.

[5] Hambsch, B., Ho, J., Bendinger, B.: Zukunft der mikrobiellen Risikobewertung (DVGW Vorhaben W202215) – Abschlussbericht, 2024.

[6] Ho, J., Stange, C., Suhrborg, R., Wurzbacher, C., Drewes, J. E., Tiehm, A.: SARS-CoV-2 wastewater surveillance in Germany. Long-term RT-digital droplet PCR monitoring, suitability of primer/probe combinations and biomarker stability, in: Water research, vol. 210: 117977, 2022.

[7] Stange, C., Yin, D., Xu, T., Guo, X., Schäfer, C., Tiehm, A.: Distribution of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China, in: Science of the total environment, vol. 655: 337–346, 2019.

[8] Stange, C., Tiehm, A.: Occurrence of antibiotic resistance genes and microbial source tracking markers in the water of a karst spring in Germany, in: Science of the total environment, vol. 742: 140529, 2020.

[9] Stelmaszyk, L., Stange, C., Tiehm, A.: Entwicklung von validen Verfahren zum Nachweis von Resistenzen (DVGW Vorhaben W201830) – Abschlussbericht, 2022.

[10] Leister, C., Hügler, M.: Genome Analysis of *Enterobacter asburiae* and *Lelliottia spp.* Proliferating in Oligotrophic Drinking Water Reservoirs and Lakes, in: Applied and environmental microbiology, vol. 88: e0047122, 2022.

[11] Nocker, A., Cheswick, R., La Dutheil de Rochere, P.-M., Denis, M., Léziart, T., Jarvis, P.: When are bacteria dead? A step towards interpreting flow cytometry profiles after chlorine disinfection and membrane integrity staining, in: Environmental technology, vol. 38: 891–900, 2017.

[12] Ho, J., Tiehm, A., Nocker, A., Bendinger, B., West, S., Trimbach, A.: Durchflusszytometrie als schnelle Detektionsmethode für Bakterien in Roh- und Trinkwasser, in: DVGW energie | wasser-praxis, Ausgabe 1/2020, S. 56–59.

[13] Stange, C., Tiehm, A.: Microbial Source Tracking – ein neuer Ansatz, um fäkale Eintragsquellen zu identifizieren, in: DVGW energie | wasser-praxis, Ausgabe 5/2019, S. 58–62.

[14] Hügler, M., Petzoldt, H., Korth, A.: Innovativer Ansatz zur Ursachenanalyse mikrobiologischer Belastungen, in: Veröffentlichungen aus dem Technologiezentrum Wasser, Band 70, ISSN 1434-5765, S. 45–57, 2015.

[15] Hügler, M., Reitter, C., Hambsch, B.: Falschpositive *E. coli*-Nachweise in Trinkwasserproben, in: DVGW energie | wasser-Praxis, Ausgabe 1/2019, S. 44–46.

[16] Leister, C., Reiner, J. E., Grießmeier, V., Gescher, J.,Hügler, M.: Gastropods as a source for fecal indicator bacteria in drinking water, in: Water research, vol. 244: 120494, 2023.

[17] Reitter, C., Petzoldt, H., Korth, A., Schwab, F., Stange, C., Hambsch, B., Tiehm, A., Lagkouvardos, I., Gescher, J., Hügler, M.: Seasonal dynamics in the number and composition of coliform bacteria in drinking water reservoirs, in: Science of the total environment, vol. 787: 147539, 2021.

Die Autoren

Dr. Claudia Stange und **Dr. Johannes Ho** sind wissenschaftliche Mitarbeitende in der Abteilung Wassermikrobiologie, Sachgebiet Umweltbiotechnologie und Molekularbiologie, am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Dr. Michael Hügler ist wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Wassermikrobiologie, Sachgebiet Trinkwassermikrobiologie, am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Prof. Dr. Andreas Tiehm ist Abteilungsleiter Wassermikrobiologie und Sachgebietsleiter Umweltbiotechnologie und Molekularbiologie am TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe.

Dr. Andreas Nocker ist stellvertretender Bereichsleiter Angewandte Mikrobiologie im IWW Zentrum Wasser in Mülheim an der Ruhr.

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